

DESENVOLVIMENTO DE PRIMERS *IN SÍLICO* DE COVID-19 PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR RT-PCR

Victor Aparecido Othonicar Bellé¹, Eric Junio Marandola², Marcela Funaki dos Reis³

^{1,2}Acadêmicos do Curso de Biomedicina, Campus Maringá/PR, Universidade Cesumar – UNICESUMAR.

¹Bolsista PIBIC/FA. victor.092014@hotmail.com, medsrp@gmail.com

³Orientadora, Doutora, Departamento de Ciências Biológicas, UNICESUMAR. Pesquisadora do Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação – ICETI. marcela.reis@unicesumar.edu.br

RESUMO

O objetivo dessa pesquisa foi desenvolver novos *primers* a serem utilizados na técnica de RT-PCR para diagnóstico do COVID-19. Primeiramente foi realizada uma pesquisa na literatura para identificação das áreas mais seguras e estáveis do genoma do vírus, as sequências encontradas foram consideradas genes candidatos e estavam depositadas no banco de dados do NCBI permitindo o acesso para análise. Utilizando a ferramenta FASTA foi realizado o alinhamento dessas sequências contra as mesmas sequências encontradas em outras regiões do mundo. Em seguida foi utilizada a ferramenta BLAST (Pick Primers) para o desenvolvimento dos *primers* a partir da sequência escolhida. Os dez pares de primers desenhados foram avaliados pelos parâmetros fornecidos pelo Pick Primer e com base no tamanho do amplicon gerado após reação de PCR o par seis foi escolhido e validado pela ferramenta OligoAnalyzer. Nesse sentido, é recomendado que o par de *primer* validado seja testado na prática para avaliar sua capacidade de identificação do vírus SARS-Cov-2 evitando resultados falso-negativo devido as mutações presentes no vírus;

PALAVRAS-CHAVE: Coronavirus; NCBI; Primer-BLAST.

1 INTRODUÇÃO

O vírus causador da COVID-19, o SARS-CoV-2, é um novo vírus do grupo coronavírus e o responsável por uma das maiores pandemias vistas até hoje no mundo moderno. Esse vírus foi relatado inicialmente na cidade de Wuhan, província de Hubei, na China (SHI, HESHUI et al., 2020; SHI, HESHUI et al., 2020). O SARS-CoV-2 se espalha rapidamente e muitas vezes silenciosamente, isso acontece por alguns motivos: por ser um vírus completamente novo (PHAN, TUNG, 2020), nenhuma pessoa possui anticorpos contra ele por nunca ter se infectado pelo mesmo, levando a um número grande de pessoas desenvolvendo a doença; o vírus possui um período de incubação de até 2 semanas, portanto muitas vezes pessoas podem estar contaminadas com o vírus e não ter conhecimento disso, facilitando a transmissão de pessoa para pessoa (JIANG; XUAN; RAYNER, 2020); por fim, o SARS-CoV-2 possui um número básico de reprodução mais alto, ou seja, sua capacidade de se reproduzir para infectar novas células é muito grande, apresentando um R0 médio de 3,28 (LIU; YING, 2020), número muito superior ao da gripe comum por exemplo. Em pouco tempo, o SARS-CoV-2 atingiu outras regiões da China, da Ásia propriamente dita e chegou ao ocidente, inicialmente em países da Europa com o primeiro caso confirmado em 24 de janeiro (LESCURE; FRANCOIS-XAVIER, 2020) e pouco tempo depois já havia se espalhado para as Américas.

O método de diagnóstico comumente utilizado para identificação do SARS-CoV-2 é o método sorológico através da identificação de imunoglobulinas M (IgM) e imunoglobulinas G (IgG), porém essas imunoglobulinas começam a ser produzidas apenas após o período latente da infecção do vírus, ou seja, durante o período de incubação não é possível identificar o vírus devido à ausência de IgM e IgG (CHEN et al., 2020). Nesses casos utiliza-se a técnica de diagnóstico por RT-PCR, sendo essa mais precisa e com a capacidade de identificar o vírus mesmo que em baixa carga viral e ainda em fase aguda, porém é um método mais demorado e requer mais trabalho, não substituindo o método sorológico em casos de necessidade de um diagnóstico mais rápido (CHAN et al., 2020). Essa técnica é

realizada a partir de uma amostra biológica do indivíduo e consiste na utilização da enzima transcriptase reversa para formar uma cadeia de DNA complementar a partir do RNA do vírus, para isso utiliza-se de primers, que são pequenas fitas de DNA complementares a uma região específica do RNA viral, eles se pareiam a essa sequência de nucleotídeos apontando para a transcriptase reversa o local onde ela deve iniciar a formação do DNAc, essa molécula de DNA formada passará pela PCR e será amplificada pela enzima Taq polimerase (FREEMAN; WALKER; VRANA, 2020), possibilitando a identificação do SARS-CoV-2. Porém, estudos já apontam que o vírus está sofrendo mutações (PHAN; TUNG, 2020) e essas podem interferir no diagnóstico através de RT-PCR promovendo resultados falso-negativos em pacientes na fase aguda da doença. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver *in silico* e avaliar um par de *primers* para identificar o vírus SARS-CoV-2 por meio de RT-PCR.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Por meio de análise da literatura foi considerado para este estudo o gene N que codifica a proteína do nucleocapsídeo viral como o mais conservado para SARS-Cov-2 com base nas informações registradas até este período. Para obtenção da sequência referência do gene N buscou-se a sequência depositada no Genbank, NCBI - The National Center for Biotechnology (NCBI, 2021) e utilizando a ferramenta FASTA (NCBI, 2021) foi realizado o alinhamento para confirmar a conservação. Em seguida, utilizando a ferramenta Pick Primer (NCBI, 2021) foram utilizados os parâmetros automáticos sugeridos para o gene N e em concordância com o proposto por Muniz et al. (2020). Após o design dos pares de *primers* foi realizada a análise de acordo com os dados fornecidos pelas ferramentas do Pick Primer (2021) e OligoAnalyzer (2021).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após avaliação dos artigos na etapa inicial de revisão bibliográfica foi possível concluir que a região mais conservada para o desenvolvimento de *primers* para RT-PCR é o gene N, pois mutações ao longo do genoma de SARS-Cov-2 ocorrem de maneira aleatória e podem causar resultados falso-negativos no exame por RT-PCR (KHAILANY; SAFDAR; OZASLAN, 2020; WANG et al., 2020; WOLOSHIN; PATEL, KESSELHEIM; 2020). Este gene apresenta 1269 nucleotídeos e se localiza *upstream* da região UTR-3 do genoma viral (NCBI, 2021).

Com o auxílio do BLAST foi selecionado a sequência de referência NC_045512.2 e 10 pares de *primers* foram desenhados no Pick Primer. Na etapa de avaliação dos *primers* foram considerados os parâmetros sugeridos por Muniz et al. (2020) com algumas modificações. A temperatura melting (T_m) dos dez pares de *primers* ficou entre 50 a 60 °C, no entanto é recomendado que a T_m permaneça abaixo destes valores para que não ocorra problemas durante o alinhamento dos *primers* na ciclagem da PCR (BURPO, 2001).

A T_m elevada é uma consequência direta da porcentagem de CG, e avaliando este parâmetro todos os *primers* apresentaram a mesma porcentagem de 50-55% de CG. A porcentagem de CG é um parâmetro que indica a quantidade de citosina e guanina no *template* molde e que requer mais temperatura de desnaturação durante a ciclagem da PCR para eu seja rompido as três pontes de hidrogênio que ligam este dímero (BURPO, 2001). E para diminuir a quantidade de CG é necessário escolher *primers* que e anelem em outras regiões do alvo, no entanto, os dez *primers* desenhados pelo Pick Primer.

Em relação ao tamanho da sequência de cada *primer* o ideal é que fiquem em torno de 18-25 nucleotídeos e neste caso todos os *primers* tiveram sequências de 20 nucleotídeos permanecendo dentro do tamanho ideal.

O tamanho do *amplicon* gerado após a PCR para estes *primers* apresentou variações fora do limite estabelecido entre 150 e 250 pb. Assim, o par de *primers* selecionado para validação foi o par seis que pode gerar um *amplicon* de 168pb (Figura 1).

Primer pair 6

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GTTGACCTACACAGGTGCCA	Plus	20	29263	29282	59.89	55.00	4.00	3.00
Reverse primer	TGTCTCTGCGGTAAGGCTTG	Minus	20	29430	29411	60.04	55.00	5.00	3.00
Product length	168								

Figura 1: Par de *primers* formados pela ferramenta Primer-BLAST com base nos parâmetros estabelecidos.

Fonte: Primer-BLAST, NCBI, acesso em 29/06/2021.

A sequência dos *primers* do par 6, ou seja, forward e reverse foram validados pela avaliação dos parâmetros relacionados a formação de dímeros na ferramenta OligoAnalyzer. Este par de *primers* com uma Tm 41,7 e 42,4°C pode formar diferentes Hairpin-Dimers, mas não forma Self e Hetero - Dimer em valores maiores que -10 kcal/mol¹ (Figura 2).

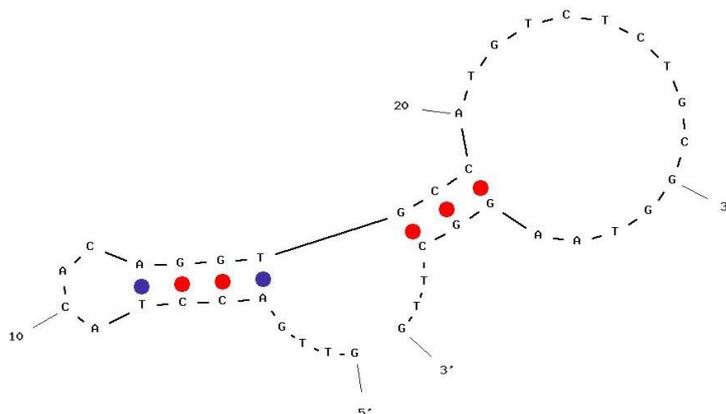


Figura 2: Hairpin-Dimer formado pelo par de primers 6 em uma Tm de 41,7. *primers* com uma TM 41,7 e 42,4°C pode formar diferentes Hairpin-Dimers

Fonte: Autores, OligoAnyzer, acesso em 30/07/2021.

Estes resultados são promissores, uma vez que as estruturas secundárias nos *primers* podem interferir na reação de PCR e sequenciamento gerando resultados errôneos em exames (WASSENAAR et al., 2019).

Nesse sentido, o par de *primers* desenhado para o diagnóstico de SARS-Cov-2 pode ser produzido para testes in vivo para avaliação da sua eficácia na prática.

4 CONCLUSÃO

O par de *primers* desenhado para PCR *in silico* teve seus parâmetros avaliados e validados em ferramentas de bioinformática que confirmam que *in silico* tem potencial de uso. É recomendado que respeitando os aspectos éticos fosse testado para fins de análise buscando sua eficácia em testes que devido a presença de mutações no vírus geram falsos negativos.

REFERÊNCIAS

ABD-ELSALAM, Kamel A. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *african Journal of biotechnology*, v. 2, n. 5, p. 91-95, 2003.

ALSAMMAN, Alsamman M.; IBRAHIM, Shafik D.; HAMWIEH, Aladdin. KASPSpoon: an in vitro and in silico PCR analysis tool for high-throughput SNP genotyping. **Bioinformatics**, v. 35, n. 17, p. 3187-3190, 2019.

BURPO, F.J. A critical review of PCR primer design algorithms and crosshybridization case study. **Biochemistry**, v. 218, p.1-12, 2001.

CHAN, Jasper Fuk-Woo et al. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/HeI real-time reverse transcription-PCR assay validated in vitro and with clinical specimens. **Journal of clinical microbiology**, v. 58, n. 5, 2020.

DUARTE, Phelipe Magalhães. COVID-19: Origem do novo coronavirus/COVID-19: Origin of the new coronavirus. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 2, p. 3585-3590, 2020.

FREEMAN, Willard M.; WALKER, Stephen J.; VRANA, Kent E. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. **Biotechniques**, v. 26, n. 1, p. 112-125, 1999.

GENBANK. In: National Center for Biotechnology Information [on line]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 5 maio 2020.

JAMSHAD, Humzah et al. Diagnostic and treatment strategies for COVID-19. **AAPS PharmSciTech**, v. 21, n. 6, p. 1-14, 2020.

JIANG, Xuan; RAYNER, Simon; LUO, Min-Hua. Does SARS-CoV-2 has a longer incubation period than SARS and MERS? **Journal of medical virology**, v. 92, n. 5, p. 476-478, 2020.

KHAILANY, Rozhgar A.; SAFDAR, Muhamad; OZASLAN, Mehmet. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. **Gene reports**, v. 19, p. 100682, 2020.

KHAILANY, Rozhgar A.; SAFDAR, Muhamad; OZASLAN, Mehmet. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. **Gene reports**, v. 19, p. 100682, 2020.

LESCURE, Francois-Xavier et al. Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 697-706, 2020.

LIU, Ying et al. The reproductive number of COVID-19 is higher compared to SARS coronavirus. **Journal of travel medicine**, 2020.

PHAN, Tung. Genetic diversity and evolution of SARS-CoV-2. **Infection, genetics and evolution**, v. 81, p. 104260, 2020.

Primer-BLAST. In: Integrated DNA Technologies [on line]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>. Acesso em: 5 maio 2020.

QUEIROZ, Jackson Alves da Silva et al. Desenho e Validação de Primers In Silico para Detecção do Vírus Sincicial Respiratório Humano. 2017.

SALES, Luiz Alfredo Torres et al. Avaliação de primers universais bacteriano em PCR in silico. **Revista de Investigação Biomédica**, v. 9, n. 2, p. 98-104, 2018.

SAN MILLÁN GUTIÉRREZ, Rosario María et al. Online exercise for the design and simulation of PCR and PCR-RFLP experiments. 2013.

SHI, Heshui et al. Radiological findings from 81 patients with COVID-19 pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **The Lancet infectious diseases**, v. 20, n. 4, p. 425-434, 2020.

STRAH, Rebeka; KUNEJ, Tanja. Molecular sexing assays in 114 mammalian species: in silico sequence reanalysis and a unified graphical visualization of diagnostic tests. **Ecology and evolution**, v. 9, n. 8, p. 5018-5028, 2019.

WANG, Changtai et al. The establishment of reference sequence for SARS-CoV-2 and variation analysis. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 6, p. 667-674, 2020.

WANG, Changtai et al. The establishment of reference sequence for SARS-CoV-2 and variation analysis. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 6, p. 667-674, 2020.

WASSENAAR, T.M.; WANCHAI, V.; BUZARD, G.S.; USSERY, D.W. *In silico* Selection of Amplification Targets for Rapid Polymorphism Screening in Ebola Virus Outbreaks. **Front. Microbiol.**, v.10, Article 857, 9p., 2019.

WOLOSHIN, Steven; PATEL, Neeraj; KESSELHEIM, Aaron S. False negative tests for SARS-CoV-2 infection—challenges and implications. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 6, p. e38, 2020.

WOLOSHIN, Steven; PATEL, Neeraj; KESSELHEIM, Aaron S. False negative tests for SARS-CoV-2 infection—challenges and implications. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 6, p. e38, 2020.