

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

PAULO VICTOR GONÇALVES SOUSA

Diversidade nucleotídica do gene N do nucleocapsídeo do vírus da cinomose (CDV) e o impacto em sequências de oligonucleotídeos e sondas de RT-qPCR.

Uberlândia

2024

PAULO VICTOR GONÇALVES SOUSA

Diversidade nucleotídica do gene N do nucleocapsídeo do vírus da cinomose (CDV) e o impacto em sequências de oligonucleotídeos e sondas de RT-qPCR.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Profa. Dra. Aline Santana da Hora

Uberlândia

2024

PAULO VICTOR GONÇALVES SOUSA

Diversidade nucleotídica do gene N do núcleocapsídeo do vírus da cinomose (CDV) e o impacto em sequências de oligonucleotídeos e sondas de RT-qPCR.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Uberlândia, 2024

Banca Examinadora:

Aline Santana da Hora – Professora Doutora (UFU)

Diego José Zanzarini Delfiol – Professor Doutor (UFU)

Nathana Beatriz Martins – Mestre (UFU)

AGRADECIMENTO

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a Deus, fonte de toda sabedoria e inspiração. Agradeço também à minha família, em especial à minha esposa, Maria Gabriela, por compartilhar comigo os momentos de alegria e frustração, e por sempre me apoiar em todas as minhas decisões. Agradeço aos meus pais, Alexandre e Keila, por terem me educado e me proporcionado todas as oportunidades para chegar até aqui. Agradeço a minha orientadora, Aline Santana, pela dedicação, paciência e pelos valiosos ensinamentos. Por fim, agradeço a todos os amigos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

O vírus da cinomose canina (*CDV*) é um agente infeccioso de alta relevância em saúde animal, ocasiona surtos com alta morbidade e mortalidade, especialmente em cães não vacinados. A *RT-qPCR* (*Reverse Transcriptase - quantitative Polimerase Chain Reaction*) é a técnica de referência para o diagnóstico preciso da cinomose, sendo a escolha de *primers* e sondas crucial para um diagnóstico acurado. Este estudo teve como objetivo avaliar a diversidade nucleotídica do gene da nucleocapsídeo (N) de *CDV* nas regiões alvo dos *primers* e sonda utilizados na *RT-qPCR*. Para isso, foi realizado um levantamento de 62 sequências completas e incompletas do gene N do *CDV* no banco de dados GenBank, seguido de um alinhamento múltiplo das sequências obtidas do GenBank juntamente com os *primers* e sonda de literatura, para averiguar a existência ou não de diversidade nucleotídica. Os resultados demonstraram a presença de diversidade nucleotídica nas regiões alvo dos *primers* e sonda descritos em literatura, o que pode comprometer a especificidade da reação. Diante disso, foram projetados novos *primers* e sonda em uma região conservada do gene N, visando maior especificidade e menor risco de amplificação de sequências inespecíficas. A validação *in silico* dos novos *primers* e sonda indicou alta especificidade para a detecção do vírus da cinomose. Conclui-se que, a diversidade genética do *CDV* impacta diretamente na eficácia dos *primers* e sonda utilizados na *RT-qPCR*. O desenvolvimento de novos *primers* e sonda, baseados em regiões conservadas do gene N, representa um avanço significativo para o diagnóstico molecular do vírus da cinomose canina, garantindo maior precisão e confiabilidade dos resultados.

Palavras-chave: primer, biologia molecular, bioinformática, diagnóstico molecular.

ABSTRACT

Canine distemper virus (CDV) is a highly relevant infectious agent in animal health, causing outbreaks with high morbidity and mortality, especially in unvaccinated dogs. RT-qPCR (Reverse Transcriptase - quantitative Polymerase Chain Reaction) is the reference technique for the accurate diagnosis of distemper, and the choice of primers and probes is crucial for an accurate diagnosis. This study aimed to evaluate the nucleotide diversity of the nucleocapsid (N) gene of CDV in the target regions of the primers and probe used in RT-qPCR. For this purpose, a survey of 62 complete and incomplete sequences of the CDV N gene was performed in the GenBank database, followed by a multiple alignment of the sequences obtained from GenBank together with the primers and probe from the literature, to verify the existence or not of nucleotide diversity. The results demonstrated the presence of nucleotide diversity in the target regions of the primers and probe described in the literature, which may compromise the specificity of the reaction. In view of this, new primers and probe were designed in a conserved region of the N gene, aiming at greater specificity and a lower risk of amplification of non-specific sequences. The in-silico validation of the new primers and probe indicated high specificity for the detection of the distemper virus. It is concluded that the genetic diversity of CDV directly impacts the efficacy of the primers and probe used in RT-qPCR. The development of new primers and probe, based on conserved regions of the N gene, represents a significant advance for the molecular diagnosis of canine distemper virus, ensuring greater accuracy and reliability of the results.

Keywords: primer, molecular biology, bioinformatics, molecular diagnosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1. País de amostragem e quantidade de sequências gênicas de cinomose obtidas por meio do GenBank.	15
Tabela 2. Sequência de primers e sonda de hidrólise descritos em literatura para a amplificação do gene que codifica o nucleocapsídeo do vírus da cinomose.	16
Tabela 3. Quantidade de degenerações, localização e tamanho do amplicon, <i>primers</i> e sondas de Elia et al (2006) com nucleotídeos degenerados identificados na sequência consenso por meio do BioEdit.	17
Tabela 4. Seleção da região parcialmente conservada da sequência consenso para desenho de <i>primers</i> e sonda.	18
Tabela 5. Sequência, tamanho e localização na sequência consenso dos <i>primers</i> e sonda desenhados neste estudo com o uso do <i>Primer-BLAST</i>	19
Tabela 6. Sequência, tamanho e localização na sequência consenso do amplicon dos <i>primers</i> e sonda desenhados nesse estudo.	20
Imagem 1. Fluxograma de etapas e processos realizados neste estudo para análise e desenho de <i>primers</i> e sondas.	21

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. MATERIAL, MÉTODOS E RESULTADOS	14
2.1 Formação do dataset.....	14
2.2 BioEdit	16
2.3 Primer-Blast	19
2.4 BLAST	20
2.5 OligoAnalyzer Tool.....	21
3. DISCUSSÃO.....	22
4. CONCLUSÃO.....	24
ANEXO A – DATASET CINOMOSE.....	27

1. INTRODUÇÃO

Dentre os vírus que mais acometem os cães, destaca-se o vírus da cinomose canina (*CDV - canine distemper virus*). Representa uma ameaça para todos os cães, uma vez que, é disseminado pela via respiratória, tendo a capacidade de provocar uma imunossupressão significativa, resultando em grandes surtos com alta taxa de morbidade e mortalidade (BEINEKE et al., 2009). No entanto, a suscetibilidade à cinomose canina é particularmente maior em cães que não foram vacinados e vivem em ambientes de aglomeração de animais (DAY et al., 2020).

Consequente, é de suma importância o diagnóstico acurado desta enfermidade, atualmente, utiliza-se como forma de diagnóstico a *RT-qPCR (Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction)*, sendo uma técnica sensível e específica para detectar e quantificar o vírus da cinomose canina (ELIA et al., 2006).

A técnica de *RT-qPCR* consiste inicialmente na síntese de DNA complementar (cDNA) a partir do RNA viral pela transcriptase reversa. Os oligonucleotídeos são utilizados para identificar o trecho de interesse do DNA que deverá ser amplificado e, a enzima termoestável *TaqDNA* polimerase amplifica o fragmento de DNA de fita simples identificado pelo primer (NAVARRO et al., 2015).

A sonda de hidrólise utilizada na reação é específica para o gene de interesse, pode detectar e diferenciar moléculas de DNA marcadas com diferentes fluoróforos, sendo utilizada na qPCR para identificar moléculas de DNA complementares, emitindo fluorescência visível quando hidrolisada (HAAS et al., 2020).

Para que seja possível realizar um diagnóstico assertivo é necessário que os primers e sondas utilizados em *RT-qPCR* na técnica de pesquisa por *CDV* estejam compatíveis com as cepas de campo atuais. Justificando o presente estudo, uma vez que, o vírus da cinomose possui genoma RNA com uma alta taxa de mutação, seja em decorrência de interferências internas, como as alterações celulares, ou mesmo externas, como pressão de seleção que geram diferentes cepas para uma melhor adaptação ao hospedeiro (ELIA et al., 2006).

Uma vez observada a diversidade no gene que codifica o nucleocapsídeo (*N*) para *CDV* em relação a extensão das regiões alvo para oligonucleotídeos e sonda, novos primers e sonda podem ser desenhados em regiões conservadas ou parcialmente conservadas, evitando ou reduzindo a utilização de nucleotídeos degenerados, a fim

de, trazer mais especificidade para a técnica de detecção de *CDV*, pois, *primers* e sonda sem degenerações apresentam valores próximos a 100% de complementariedade com a região alvo (BUSTIN; HUGGETT, 2017).

O artigo escolhido para análise da diversidade nucleotídica do gene que codifica o nucleocapsídeo de *CDV*, com relação às regiões alvos para oligonucleotídeos e sondas usados em *RT-qPCR* neste estudo foi o de Elia *et al* (2006). Esta escolha foi realizada com base no ano de publicação do artigo utilizado como referência e devido a sua relevância internacional.

Caso não haja possibilidade de desenhar novos *primers* e sonda sem nucleotídeos degenerados, é preferível a atualização dos oligonucleotídeos e sonda já existentes descritos por Elia *et al* (2006). Porém, o uso de *primers* degenerados implicam em maior risco de amplificar sequências inespecíficas (LINHART; SHAMIR, 2005).

O objetivo deste estudo foi de verificar a diversidade nucleotídica do gene que codifica a proteína do nucleocapsídeo de *CDV* com relação às regiões alvos para oligonucleotídeos e sondas usados em *RT-qPCR*.

2. MATERIAL, MÉTODOS E RESULTADOS

2.1 Formação do dataset

Para a elaboração deste trabalho, foi necessário o levantamento de sequências gênicas, realizado a partir do banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), da Biblioteca Nacional de Medicina (NIH), uma coleção de sequências anotadas disponíveis publicamente. Faz parte da Colaboração Internacional de Banco de Dados de Sequências de Nucleotídeos, que compreende o Banco de Dados de DNA do Japão (DDBJ), o Arquivo Europeu de Nucleotídeos (ENA) e o GenBank do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Essas três organizações trocam dados diariamente (NCBI, 2022).

Para realizar a formação do *dataset*, foi necessário acessar o site do NCBI, mudar a categoria de pesquisa de *All Databases* para *nucleotide*. Já na aba de pesquisa por nucleotídeo, os termos utilizados para a formação do *dataset* foram, “*Morbillivirus canis*”, “*Canine Distemper Virus*”, também foi incluído no *dataset* o gene que o primer tem como alvo, sendo os termos pesquisados, “N gene *CDV*” e “*Morbillivirus canis N gene*”. Das sequências pesquisadas, foi possível obter informações como, número de acesso, país de ocorrência, data, se a cepa em questão é vacinal ou de campo e o código FASTA.

Para a realização da checagem completa do genoma do vírus da cinomose e melhor entendimento da zona de estudo, observou-se que o genoma completo da *CDV* possui 15.690 nucleotídeos (GenBank ID KJ466106.1). O gene alvo de estudo foi o gene do nucleocapsídeo (N) para *CDV*, com 1.572 nucleotídeos.

As sequências obtidas de diversas pesquisas realizadas em diferentes países, foram exportadas no formato FASTA, conseguinte, organizadas no bloco de notas (editor de texto simples do sistema operacional Windows), de acordo com a documentação do BioEdit (HALL, 1999). Originando um banco de sequências com 47 sequências gênicas completas e 15 sequências gênicas parciais do nucleocapsídeo (N) para *CDV* (Anexo A).

Tabela 1. País de amostragem e quantidade de sequências parciais e completas do gene da nucleoproteína do vírus da cinomose obtidas por meio do GenBank.

Local	Sequências
ÁFRICA DO SUL	2
ARGENTINA	1
AUSTRÁLIA	1
BANGLADESH	2
BRASIL	17
CAZAQUISTÃO	1
CHINA	17
ESTADOS UNIDOS	5
HUNGRIA	1
ÍNDIA	2
ITÁLIA	3
JAPÃO	3
MONGÓLIA	3
RÚSSIA	1
TAILÂNDIA	2
VIETNAM	1

Fonte: Autoria própria, 2024.

Utilizou-se *primers* e sondas que amplificam 218pb e foram previamente descritos por Elia *et al.*, 2006 (Tabela 2) para a verificação da diversidade nucleotídica presentes nos sítios de anelamento. Fez-se necessário adicionar as sequências de oligonucleotídeos e sonda alvos de estudo no *dataset* previamente formado, o *primer - Forward* e sonda em sentido 5' – 3' e o *primer - Reverse* foi adicionado após realização da inversão da sequência por reverso-complemento.

Também foram adicionadas todas as sequências de interesse extraídas do GenBank, para então, dar continuidade no BioEdit comparando os *primers* e sonda com o *dataset* completo. As sequências de *primers* e sonda alvos de estudo estão disponíveis na Tabela 2.

Tabela 2. Sequência de primers e sonda de hidrólise descritos em literatura para a amplificação parcial do gene que codifica o nucleocapsídeo do vírus da cinomose.

Primer/Sonda	Sequência 5' – 3'	Tamanho
Primer CDV-F	AGCTAGTTTCATCTTAACTATCAAAT	26
Primer CDV-R	TTAACTCTCCAGAAAACATG	24
Sonda CDV	ACCCAAGAGCCGGATACATAGTTTCAATGC	30

Fonte: G. Elia et al. / Journal of Virological Methods 136 (2006) 171–176, 2023.

2.2 BioEdit

Após a extração de sequências do GenBank e a organização no bloco de notas, foi realizado alinhamento, a fim de, verificar a existência de diversidade nucleotídica dos *primers* e sonda utilizados como referência. O BioEdit foi utilizado na versão 7.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), sendo, um *software* para estudos de biologia molecular, desenvolvido inicialmente como um editor de alinhamento de sequências biológicas para Windows. Logo, foi o programa de escolha por aceitar uma grande variedade de formatos que são comumente usados com outras aplicações de bioinformática. Permitindo a troca de arquivos de dados entre o BioEdit e outros programas (HALL, 1999).

Após importar para o *software* as sequências completas e parciais do nucleocapsídeo (N) para *CDV* extraídas do GenBank e os *primers* e sondas descritos por Elia *et al.*, 2006, o *primer – Forward* e sonda foram inseridos no sentido 5'- 3', enquanto, o *primer – Reverse* foi adicionado após inversão da sequência por reverso-complemento, foi possível iniciar o alinhamento de todas as sequências.

O alinhamento de múltiplas sequências foi realizado com o *ClustalW*, que consistiu no processo de contrastar sequências gênicas para comparar os pares de bases nitrogenadas. Dentre as 62 sequências gênicas obtidas no GenBank de vários países, todas as sequências compreendiam a região do alinhamento comparativo para os *primers* e sonda descritos por Elia *et al.*, 2006.

No processo de alinhamento foi possível observar a localização dos *primers* e sonda descritos em literatura por Elia *et al.*, 2006. Este processo pôde ser feito de forma

manual dentro do próprio *software* e não foram observadas lacunas na região amplificada.

Os *primers* e a sonda, que foram utilizados como referência, foram identificados manualmente na sequência consenso. Esta identificação foi realizada com o propósito de verificar a existência de diversidade nucleotídica nos *primers* e sonda de literatura. Para os *primers* e sonda descritos por Elia *et al* (2006), no *primer* – *Forward* foram observados sete nucleotídeos degenerados ao longo de 28 nucleotídeos na sequência consenso e 73% de homologia com a região alvo.

No *primer* – *Reverse* com cinco nucleotídeos degenerados ao longo de 22 nucleotídeos e 77% de homologia ao longo de sua extensão e, quanto a sonda, apresentou oito nucleotídeos degenerados ao longo de 30 nucleotídeos e 73% de homologia com a região alvo. Com este resultado, foi preferível o desenho de novos *primers* e sonda a partir de uma região conservada ou parcialmente conservada, isso pode ser visto na Tabela 3.

Tabela 3. Apresentação dos nucleotídeos degenerados, localização e tamanho do amplicon gerado pela análise dos *primers* e sonda de Elia *et al* (2006).

Primer/Sonda	Sequência	Tamanho	Posição	Degenerações
Primer CDV-F	AGCBAGYTTTCATMYTRACBATCAART	26	798-823	7
Primer CDV-R	CATGARTTYTCYGGRGARTTAA	22	859-880	5
Sonda CDV	ACAGRATYGCYGAGGACYTRTCYYTGAGRC	30	662-691	8
Amplicon de literatura	ACAGRATYGCYGAGGACYTRTCYYTGAGRC GDTTYATGGTRGCACTYATYYTGGAYATYA AAMGATCYCCRGGRAAYAARCCYAGAATY GCTGARATGATTTGTGAYATAGATAAYTAY ATTGTDGARGCTGGDTTAGCBAGYTTTCATM YTRACBATCAARTTTGGCATTGARACTATGT ATCCRGCBCTYGGGTTGCATGARTTYTCYGG RGARTTAA	219	662-880	46

Após a constatação da diversidade nucleotídica dos *primers* e sonda utilizados como referência. Fez-se necessário avaliar as sequências gênicas alinhadas, também de forma manual, com a finalidade de buscar por regiões conservadas para o desenho de um novo conjunto de *primers* e sonda sem degenerações para diminuir o risco de amplificar sequências inespecíficas.

Foi realizada também a busca de novas áreas conservadas no gene *N*, por meio de uma análise observacional da sequência consenso, visando o desenho de *primers* e sonda. A região conservada de escolha deveria apresentar no mínimo 80 nucleotídeos, porém, não foi possível encontrar uma região completamente conservada sem degenerações. Foi possível localizar somente uma área parcialmente conservada que, viabilizasse o desenho de primers e sonda sem nucleotídeos degenerados.

De acordo com Bustin *et al* (2017), o produto gerado deve possuir uma extensão de 80–150 nucleotídeos para RT-qPCR portanto, optou-se por uma região que apresentasse o menor número de degenerações, com o tamanho mínimo de 80 nucleotídeos, a fim de, viabilizar o desenho de novos *primers* e sonda no primer-BLAST, a região escolhida se inicia no nucleotídeo 337 da sequência consenso, termina no nucleotídeo 425 (Tabela 4).

Tabela 4. Região parcialmente conservada da sequência consenso de um fragmento do gene da nucleoproteína do vírus da cinomose para desenho de *primers* e sonda deste estudo.

Região parcialmente conservada	Sequência	Tamanho	Posição
CDV	GGTCTTACATTTGCATCCAGAGGA GCAAGTYTGGATTCTGAGGCAGAT GAGTTCTTCAAATTRYAGAYGAA GGGTCGAAAGCTCAAGG	89	337-425

Fonte: Autoria própria, 2024.

Dentre as 62 sequências gênicas totais no *dataset*, 51 sequências compreendiam a região parcialmente conservada escolhida para o desenho de novos *primers* e sonda, 11 sequências não foram incluídas devido a sua curta extensão.

2.3 Primer-Blast

Com a obtenção da região conservada (Tabela 3), utilizou-se o *Primer-BLAST* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), seguindo os parâmetros já descritos anteriormente para a obtenção de primers e sonda, a sequência conservada foi exportada para o site e o campo “*Primer melting temperatures*” foi preenchido especificando qual deveria ser a faixa de temperatura de anelamento, ficando entre 57 e 63 graus Celsius, com variação máxima de temperatura em 2 graus Celsius.

Os campos “*PCR product size*” e “*# of primers to return*” foram mantidos em configuração padrão. Após retorno da ferramenta, foi possível salvar as sequências de *primers* e sonda gerados e estão disponíveis na Tabela 5.

Tabela 5. Apresentação da sequência, localização e tamanho dos *primers* e sonda desenhados neste estudo que amplificam uma região parcialmente conservada da nucleoproteína do vírus da cinomose.

Primer/Sonda	Sequência (5'-3')	Tamanho	Posição
Primer CDV-F	ACATTTGCATCCAGAGGAGC	20	343-362
Primer CDV-R	GAAGGGTCGAAAGCTCAAGG	20	406-425
Sonda CDV	TGGATTCTGAGGCAGATGAGTTCT	24	368-391

Fonte: Autoria própria, 2024.

Os *primers* e sonda desenhados não ficaram localizados nas regiões com degenerações, permitindo a atualização dos *primers* e sonda sem a utilização de nucleotídeos degenerados. A sequência consenso do amplicon dos *primers* e sonda desenhados nesse estudo podem ser observadas na Tabela 6.

Tabela 6. Apresentação da sequência, localização e tamanho do amplicon gerado pela análise dos *primers* e sonda desenhados neste estudo.

Sequência consenso	Sequência	Tamanho	Posição
<i>Primers e sonda desenhados</i>	ACATTTGCATCCAGAGGAGCAAG TYTGGATTCTGAGGCAGATGAGT TCTTCAAAATTRYAGAYGAAGGG TCGAAAGCTCAAGG	83	343-425

Fonte: Autoria própria, 2024.

2.4 BLAST

O BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) é uma ferramenta desenvolvida pelo NCBI que encontra regiões de similaridade local entre sequências biológicas. O programa compara sequências de nucleotídeos ou proteínas com bancos de dados de sequências e calcula a significância estatística das correspondências. Com a obtenção dos pares de *primers* e sonda, foi necessário realizar um “Blastn”, a fim de, verificar a identidade e cobertura dos *primers* e sonda desenhados com sequências gênicas disponíveis no GenBank.

Para isto, os produtos gerados do *Primer-BLAST* foram exportados no formato FASTA para o BLAST, adicionado o organismo alvo de estudo *CDV* (taxid:3052342) e *Morbillivirus canis* (taxid:3052342). A opção escolhida para que a ferramenta execute a procura foi “Blastn”.

Após o retorno da ferramenta foi possível observar que, os *primers* e sonda desenhados apresentaram 100% de identidade e cobertura para as duas consultas realizadas, se anelando com as 100 sequências pesquisadas disponíveis para *CDV* no GenBank, incluindo as sequências do Brasil que foram consultadas.

Também foi realizada pesquisa no BLAST no modo “Blastn” e “discontiguous megablast” com a exclusão de *CDV* (taxid:3052342) e *Morbillivirus canis* (taxid:3052342), a fim de, verificar se os produtos gerados poderiam se anelar em outros patógenos conhecidos por parasitar cães ou até mesmo no DNA do hospedeiro. Após o retorno da ferramenta online, nenhuma semelhança significativa foi encontrada.

2.5 OligoAnalyzer Tool

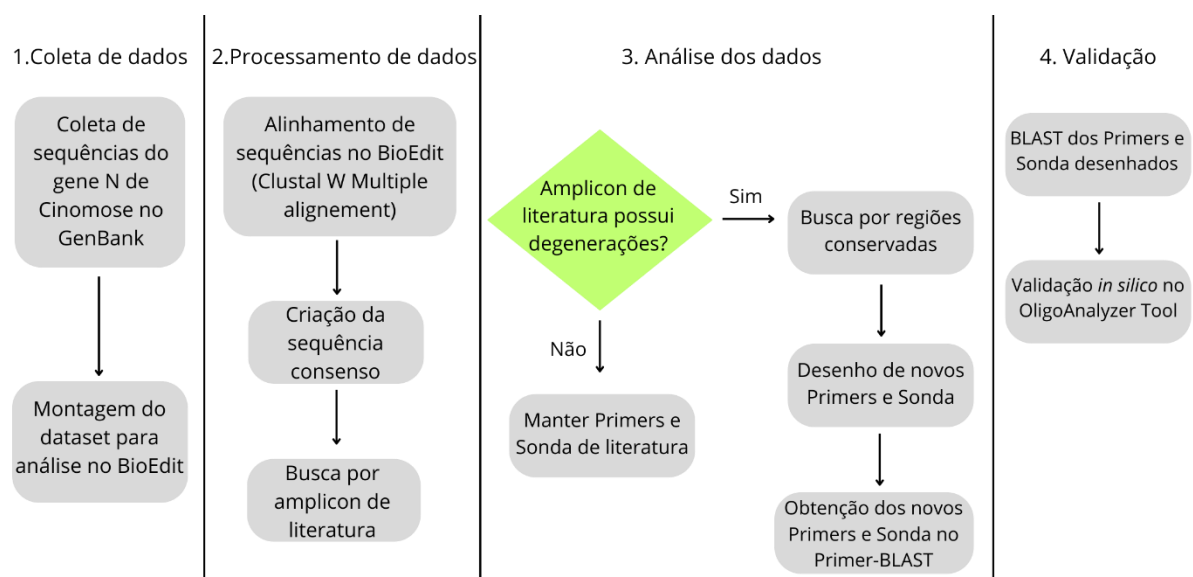
Com a obtenção dos *primers* e sonda no *primer-BLAST*, fez-se necessária a validação *in silico* dos produtos gerados, a ferramenta online gratuita *OligoAnalyzer Tool* (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) foi utilizada para este fim.

Para realizar a validação *in silico*, é necessário cadastro gratuito no site e exportar os *primers* e sonda obtidos, após analisar os *primers* anteriormente desenhados, os resultados obtidos foram de 20 nucleotídeos para cada *primer*, proporção de Guanina e Citosina em 50% para *Forward* e 55% para *Reverse* e temperatura de anelamento em 60 graus Celsius para ambos os *primers*.

Enquanto, a sonda apresentou um comprimento de 24 nucleotídeos, proporção de Guanina e Citosina em 45% e temperatura de anelamento em 65 graus Celsius. Os *primers* e sonda gerados apresentaram um amplicon final de 83 nucleotídeos, respeitaram os parâmetros e podem ser utilizados.

Com o intuito de facilitar as tomadas de decisões, um fluxograma de processos foi criado para servir como guia, expondo os processos, destacando cada etapa individual e as decisões tomadas ao longo do caminho. Ajudando a entender como o processo funciona atualmente e pontos de melhorias. O fluxograma pode ser observado na Imagem 1.

Imagem 1. Fluxograma de etapas e processos realizados neste estudo para análise e desenho de *primers* e sondas.



3. DISCUSSÃO

A detecção do vírus da cinomose em amostras de animais clinicamente suspeitos através da *RT-qPCR* é um método sensível e específico conforme relatado em estudo anterior (ELIA *et al.*, 2006). O gene N é uma das regiões mais indicadas para amplificar e detectar o vírus da cinomose devido a sua estabilidade, contudo, existem variações do gene N que podem dificultar a detecção molecular do vírus (ROSA *et al.*, 2012).

Para que um *primer* e sonda sejam eficazes, é necessário que apresentem complementariedade com a região alvo, o uso de nucleotídeos degenerados é uma alternativa, porém, a probabilidade de amplificar sequências inespecíficas aumenta conforme a maior adição de nucleotídeos degenerados (LINHART; SHAMIR, 2005).

Caso exista a possibilidade da utilização de *primers* e sondas sem degenerações, deve-se optar em não utilizar nucleotídeos degenerados, uma vez que, sequências sem degenerações apresentam valores próximos a 100% de complementariedade com a região alvo (BUSTIN; MUELLER; NOLAN, 2019).

Os *primers* e sonda descritos por Elia *et al* (2006) apresentaram, 73% de homologia com a região alvo para o *primer* - F, 82% de homologia para o *primer* - R e 80% de homologia para a sonda, justificando a procura por regiões conservadas e o desenho de novos *primers* e sonda, a fim de, obter valores de complementariedade próximos a 100% (BUSTIN; HUGGETT, 2017).

Com a necessidade de atualização de *primers* e sonda para obter valores de complementariedade próximos a 100%, buscou-se por regiões conservadas e somente uma região apresentou homologia necessária de acordo com Bustin *et al* (2017), as outras sequências analisadas não possuíam extensão mínima exigida segundo os padrões do *Primer-BLAST* (NCBI, 2024).

Para o desenho de *primers* e sonda na ferramenta *Primer-BLAST*, foram seguidos os padrões de temperatura de anelamento e quantidade de Guanina e Citosina recomendados por Rodríguez *et al* (2015). Após a obtenção dos *primer* e sonda, foi possível observar que os produtos gerados se encaixavam na literatura de Rodríguez *et al* (2015).

Para validar os *primer* e sonda gerados, a ferramenta *OligoAnalyzer Tool* foi utilizada e os resultados foram satisfatórios, indicando que, cada *primer* gerado

apresentou uma extensão de 20 nucleotídeos, tamanho de acordo com literatura (RODRÍGUEZ *et al.*, 2015). Proporção de Guanina e Citosina em 50% para *Forward* e 55% para *Reverse* e temperatura de anelamento em 60 graus Celsius, valores dentro do esperado em literatura (BUSTIN; MUELLER; NOLAN, 2019).

Enquanto, a sonda apresentou um comprimento de 24 nucleotídeos, proporção de Guanina e Citosina em 45% e temperatura de anelamento em 65 graus Celsius, valores já descritos em literatura (BUSTIN; HUGGETT, 2017). Os novos *primers* e sonda gerados apresentaram 100% de identidade com as regiões alvo por não apresentarem nucleotídeos degenerados.

As ferramentas utilizadas neste estudo se mostraram suficiente para análise da diversidade nucleotídica em sequências de oligonucleotídeos e sondas de *RT-qPCR*, permitindo a atualização de componentes da técnica. Todos os programas utilizados são de acesso gratuito e podem ser facilmente obtidos, embora necessitem de uma compreensão prévia em bioinformática. A metodologia apresentada proporciona caminhos para examinar a variabilidade genômica e as mutações existentes em áreas específicas.

4. CONCLUSÃO

Este estudo identificou diversidade nucleotídica nas regiões dos primers e sonda descritos em literatura para *RT-qPCR* para detectar vírus da cinomose canina. A diversidade encontrada não inviabiliza o uso de *primers* degenerados.

Entretanto, foi possível realizar o desenho de novos *primers* e sonda utilizando uma região mais conservada. A atualização contínua desses componentes é essencial para garantir diagnósticos precisos e eficazes, contribuindo para o controle e prevenção da doença.

REFERÊNCIAS

- BEINEKE, Andreas et al. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Germany, v. 127, p. 1-18, 15 jan. 2009. DOI <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.09.023>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242708003668>. Acesso em: 11 out. 2024.
- BUSTIN, Stephen Andrew; MUELLER, Reinhold; NOLAN, Tania. Parameters for Successful PCR Primer Design. *Methods in Molecular Biology*, New York, v. 2065, p. 5-22, 2 out. 2019. DOI https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9833-3_2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31578684/>. Acesso em: 3 out. 2024.
- BUSTIN, Stephen; HUGGETT, Jim. QPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*, United Kingdom, v. 14, 2017. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221475351730181X?via%3Dihub>. Acesso em: 23 maio 2024.
- DAY, M. J. et al. Recommendations on vaccination for Latin American small animal practitioners: a report of the WSAVA Vaccination Guidelines Group. *Journal of Small Animal Practice*, Inglaterra, v. 61, n. 6, p. 1-39, 30 mar. 2020. DOI: 10.1111/jsap.13125. Disponível em: <https://wsava.org/wp-content/uploads/2020/08/Recommendations-on-vaccination-for-Latin-American-small-animal-practitioners-Portuguese.pdf>. Acesso em: 7 out. 2023.
- ELIA, Gabriella et al. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, Itália, v. 136, p. 171-176, 5 jun. 2006. DOI 10.1016/j.jviromet.2006.05.004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016609340600156X>. Acesso em: 7 out. 2023.
- GREENE, Craig E. *Doenças infecciosas em cães e gatos*. 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.
- HAAS, Dionei Joaquim; TORRES, Ana Caroline Doyle. Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, [S.l.], n. 34, 2020. Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/5D3Iu05EHeEnqPl_2017-1-12-8-29-47.pdf. Acesso em: 17 out. 2023.
- HALL, Tom; ALZOHAIY, Ahmed M. BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*, Egypt, v. V. 02, p. 60-61, 1 fev. 2011. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/258565830_BioEdit_An_important_software_for_molecular_biology. Acesso em: 7 out. 2023.
- LINHART, Chaim; SHAMIR, Ron. The Degenerate Primer Design Problem: Theory and Applications. *Journal of Computational Biology*, ISRAEL, v. 12, n. 4, 2004. DOI

<https://doi.org/10.1089/cmb.2005.12.431>. Disponível em:
<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/cmb.2005.12.431>. Acesso em: 20 jun. 2024.

NAVARRO, Elena et al. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*, Spain, v. 439, p. 231-250, 2015. DOI <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898114004483>. Acesso em: 30 set. 2024.

RODRÍGUEZ, Alicia et al. Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. *PCR Primer Design*, New York, v. 1275, p. 31-56, 10 jan. 2015. DOI https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_3. Disponível em:
https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-2365-6_3. Acesso em: 1 out. 2024.

ROSA, G. N. et al. Detecção molecular e análise filogenética do gene H de amostras do vírus da cinomose canina em circulação no município de Campinas, São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, n. 1, p. 72-77, jan. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000100012>. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/pvb/a/wVyksTrGbk6PpcLgNSKdPnv/abstract/?lang=pt#>. Acesso em: 21 out. 2023.

SAIKI, Randall et al. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, [s. l.], v. 239, ed. 4839, p. 487-491, 1988. DOI <https://doi.org/10.1126/science.2448875>. Disponível em:
<https://www.science.org/doi/10.1126/science.2448875>. Acesso em: 5 ago. 2024.

ANEXO A – DATASET CINOMOSE

<https://github.com/PauloVictorGS/dataset-cdv/>