

Desenvolvimento in silico de método diagnóstico multiplex para pneumonias

In silico development of a multiplex diagnostic method for pneumonias

Maria Luisa Mobilio Braga¹ , Julio César Martins Ximenes² 

1. Discente do curso de Biomedicina, Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS), Fortaleza, CE, Brasil. 2. Pesquisador da Fundação Oswaldo Cruz, Centro Pasteur de Imunologia e Imunoterapia, (FIOCRUZ), Eusébio, CE, Brasil.

Resumo

Objetivo: este estudo propõe o desenho e a validação in silico de primers para PCR quantitativo multiplex, visando à detecção rápida de genes de resistência. **Métodos:** as sequências de genes de resistência foram obtidas do NCBI e alinhadas no ClustalW para identificar regiões conservadas. Os primers e probes foram desenhados no OligoArchitect™ Online e avaliados pelo OligoAnalyzer da IDT para evitar estruturas secundárias. **Resultados:** os genes blaSHV e ermA foram selecionados como alvos, com GAPDH como controle interno. Os primers e probes apresentaram variações estruturais, com diferenças em Tm e ΔG. Algumas sequências, como ermA-F e ermA-R, mostraram valores próximos ao limite inferior de GC, enquanto blaSHV-R apresentou múltiplas formações em hairpin. A análise de multiplexação revelou interações cruzadas, com ΔG variando de -0,2 a -7,2 kcal/mol, indicando estabilidade variável. **Conclusão:** os primers e probes projetados apresentaram bons índices de GC, Tm e energia livre de Gibbs, sugerindo potencial para diagnóstico molecular. No entanto, testes experimentais são necessários para confirmar sua eficácia em qPCR multiplex.

Palavras-chave: antibacterianos; bactérias; pneumonia.

Abstract

Objective: this study proposes the in silico design and validation of primers for multiplex quantitative PCR, aiming at rapidly detecting resistance genes. **Methods:** resistance gene sequences were obtained from NCBI and aligned using ClustalW to identify conserved regions. Primers and probes were designed with OligoArchitect™ Online and evaluated using IDT's OligoAnalyzer to prevent secondary structures. **Results:** the blaSHV and ermA genes were selected as targets, with GAPDH as an internal control. Primers and probes showed structural variations, with differences in Tm and ΔG. Some sequences, such as ermA-F and ermA-R, had GC values near the lower limit, while blaSHV-R exhibited multiple hairpin formations. The multiplexing analysis revealed cross-interactions, with ΔG values ranging from -0.2 to -7.2 kcal/mol, indicating variable stability. **Conclusion:** the designed primers and probes exhibited appropriate GC content, Tm, and Gibbs free energy values, suggesting potential for molecular diagnosis. However, experimental tests are required to confirm their effectiveness in multiplex qPCR.

Keywords: antibacterials; bacteria; pneumonia.

INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana adquirida aos antibióticos representa um problema sério e significativo nos hospitais. Estudos recentes indicam que um dos principais grupos de risco para o desenvolvimento de pneumonia são os pacientes em UTI. Atualmente, os fatores mais importantes envolvidos nas infecções hospitalares são o uso excessivo de antimicrobianos nos hospitais; a falha de muitos profissionais de saúde em adotar medidas básicas de controle de infecções hospitalares, como a higienização das mãos; por último, é representado por pacientes hospitalizados que possuem um sistema imunológico significativamente comprometido. Assim, para que a diminuição no número de casos de pneumonia seja mantida, é essencial a prescrição e a utilização adequada da antibioticoterapia, visando à redução nos casos de multirresistência^{1,2,3}.

A pneumonia é resultado de um processo complexo em que o sistema respiratório inferior é invadido por um microrganismo

causador de infecção. Essa condição pode ser contraída tanto na comunidade quanto no ambiente hospitalar, e a transmissão pode ocorrer por meio da aspiração ou inalação de agentes patogênicos. Quando não é adequadamente tratada, a pneumonia pode progredir para um estado mais sério, aumentando o risco de mortalidade para o paciente⁴.

A pneumonia pode ser identificada como Pneumonia Adquirida na Comunidade (PAC), Pneumonia Adquirida em Hospital (PAH) e a Pneumonia Adquirida em Ambiente Hospitalar por Ventilação Mecânica (PAV). Assim, a PAC é uma infecção aguda do parênquima pulmonar, que se desenvolveu fora do ambiente hospitalar, ou que se apresenta em até 48 horas após a internação. A PAH, que é o tipo mais grave, distingue-se por ser diagnosticada, pelo menos, 48 horas após a hospitalização. Estima-se que até 1,1% dos pacientes internados a desenvolve e, apesar da baixa incidência, apresenta mortalidade de até

Correspondente: Julio César Martins Ximenes. Endereço: R. São José, s/n - Precabura, Eusébio - CE, 61773-270 - Email: julio.ximenes@fiocruz.br

Conflito de interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesse
Recebido em: 24 Jun 2025; Revisado em: 11 Ago 2025; Aceito em: 9 Set 2025

2 Diagnóstico multiplex in silico de pneumonias

50%, particularmente quando vinculada a microrganismos multirresistentes¹. PAV, por sua vez, é a principal causa de morte em pacientes em estado crítico devido à natureza invasiva dos procedimentos de ventilação mecânica, e é definida como uma inflamação do parênquima pulmonar ocasionada por agentes infecciosos não presentes ou em incubação no momento do início da ventilação mecânica (VM). Difere de a PAH por seu desenvolvimento ocorrer após 48 horas da realização da intubação orotraqueal. Também, é subdividida em PAV precoce, quando se manifesta até 4 dias após o procedimento, e PAV tardia, quando se manifesta 5 dias após o procedimento^{1,5}.

A colonização bacteriana no trato respiratório é notadamente causada por bactérias como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter spp.* e *Pseudomonas aeruginosa*, todas frequentemente isoladas em Unidades de Terapia Intensiva (UTI). Além destas, a *Klebsiella pneumoniae* está relacionada à infecção em ambiente hospitalar via método de respiração mecânica. Entre os principais encontrados em UTI estão os bacilos Gram-negativos não fermentadores, como *Acinetobacter spp.* e *P. aeruginosa*. Estes microrganismos podem persistir em ambientes hospitalares por longos períodos devido à sua baixa demanda nutricional e à presença de fatores de virulência¹.

Em casos de pneumonia bacteriana, os antibióticos são frequentemente prescritos como a terapia principal. Embora a penicilina tenha sido amplamente empregada no tratamento de pneumonias adquiridas na comunidade, a resistência bacteriana a este medicamento tem exigido a incorporação de novos antibióticos para complementar os protocolos terapêuticos existentes⁶.

É compreendido que microrganismos que são resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos testados são classificados como multirresistentes ou resistentes às múltiplas drogas (MDR)⁷. Isso torna as infecções mais difíceis de serem tratadas e aumenta o risco de propagação de patógenos, levando a maior mortalidade^{8,9}.

Nos últimos dez anos, houve um significativo avanço no diagnóstico microbiológico de patógenos respiratórios através do desenvolvimento e implementação de testes de diagnóstico molecular para pneumonia. Esses testes moleculares auxiliam a identificação de agentes patogênicos específicos, na distinção entre infecções bacterianas e virais e fornecem dados sobre padrões de suscetibilidade aos antibióticos. Além disso, ajudam a monitorização da resposta à terapia antibiótica, na avaliação do prognóstico, na gestão antimicrobiana e disponibilizam dados para a vigilância da doença⁴.

De acordo com tudo o que foi exposto, o objetivo deste trabalho é realizar o desenho e validação *in silico* de primers para o desenvolvimento de diagnóstico em qPCR no formato multiplex para genes de resistência de interesse em pneumonias. Dessa forma, ajudando na escolha assertiva e rápida do conjunto de antibióticos que podem ser utilizados para o tratamento da

enfermidade.

MÉTODOS

Com base nos genes associados à resistência antimicrobiana e nos microrganismos selecionados durante o estudo, foi realizada uma busca na *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pelas sequências de interesse. O alinhamento múltiplo e a identificação das regiões conservadas e mais promissoras para o desenho dos primers foram realizados utilizando o programa *MEGA11* com a ferramenta do *ClustalW*^{10,11}.

O desenho dos sistemas dos primers (*forward* e *reverse*) das sondas foi realizado com a ferramenta *Dual-labeled Probe – Multiplexing da OligoArchitect™ Online* (<http://www.oligoarchitect.com/ShowToolServlet?TYPE=DPROBE>) utilizando os parâmetros de default do programa, como comprimento do primer entre 18 e 24 pares de base (pb), conteúdo de GC entre 30 e 80%, tamanho do amplicon entre 75 e 200 pb, temperatura de *melting* (Tm) entre 50 e 60 °C. Além disso, ao final dessa análise, obtiveram-se as informações referentes à estrutura dos primers e das sondas, posição do anelamento dentro dos genes de interesse, tamanho das sequências (b), porcentagem do conteúdo CG (%), valores de temperatura de *melting* (oC), e os valores de variação da energia livre de Gibbs (kcal.mol⁻¹) para a ocorrência de estruturas em *self-dimer*, *hairpin* e *cross dimer*.

Paralelamente, foi realizada outra análise mais detalhada para o parâmetro de *hairpin* na plataforma *Integrated DNA Technologies* (IDT) (<https://www.idtdna.com/page>) utilizando a ferramenta *PrimerQuest Tool do OligoAnalyzer*.

RESULTADOS

A partir de buscas utilizando artigos científicos, foram identificadas as principais bactérias associadas a doenças respiratórias, com foco específico nas pneumonias. Neste contexto, foram delineados os principais genes de resistência antimicrobiana relacionados a essa enfermidade, resultando nos genes *blaSHV* e *ermA*. Além disso, foi selecionado o gene *GAPDH*, um gene *housekeeping*, para servir de controle interno da reação, pois sua expressão é mantida de forma constante no organismo humano.

Utilizando as sequências de referência (RefSeq) disponíveis no banco de dados do NCBI, as sequências de nucleotídeos mais adequadas foram selecionadas no formato FASTA, visando à posterior realização do alinhamento. Optou-se por priorizar sequências que apresentassem similaridade no comprimento dos pares de bases. Assim, foram selecionadas oito sequências associadas ao gene *blaSHV* com o número de identificação de: NG_050001.1; NG_050128.1; NG_050126.1; NG_049995.1; NG_050085.1; NG_050127.1; NG_148673.1; NG_066766.1; cinco sequências relacionadas aos genes *ermA*: OR876252.1; KT803896.1; MF095625.1; MG778115.1; LC146992.1.; e cinco sequências para o gene *GAPDH*: NM_001256799.3;

3 Diagnóstico multiplex in silico de pneumonias

NM_002046.7; BC083511.1; BC023632.2; BC013310.2.

Com a utilização do programa *MEGA 11*, todas as sequências foram alinhadas por gene, separadamente, sendo padronizadas pelo método *ClustalW*. Em seguida, foram realizadas buscas pela região mais conservada. Após a identificação da sequência mais conservada, esta foi empregada como referência para o desenho dos *primers*.

Utilizando o programa *OligoArchitect™ Online*, foram realizados os desenhos das representações dos *primers forward*, *reverse* e da sequência *probe*. Ao final dessa análise, obtiveram-se as informações referentes à estrutura dos *primers* e sondas, posição do anelamento dentro dos genes de interesse, tamanho das sequências (b), porcentagem do conteúdo GC (%), valores de temperatura de *melting* (oC), os valores de variação da energia livre de Gibbs (kcal.mol⁻¹) para a ocorrência de estruturas em *self-dimer*, *hairpin* e *cross dimer* (tabela 1).

Os primers do gene *blaSHV forward* e *reverse* foram sintetizados para anelarem nas posições 364 e 487, respectivamente, enquanto a sequência da *probe* ficou em uma posição intermediária a partir da base 390; os *primers* foram sintetizados com tamanho, conteúdo GC, Tm e energia livre de Gibbs (ΔG) para *self dimer* com valores muito semelhantes entre si. A *probe*, pelo contrário, apresentou valores superiores aos primers, com exceção do valor de ΔG para *self dimer* que foi inferior. Ao avaliar os dados sobre o gene *ermA* e *GAPDH*, pode-se perceber que há um padrão característico similar, no qual os dados entre os *primers forward* e *reverse* são muito similares, e os valores da *probe* são superiores. Algumas exceções importantes de serem destacadas é o conteúdo GC das sequências de *ermA-F* e *ermA-R* com valores de 35% que é muito próximo do valor limite inferior de default do programa, o tamanho do *ermA-P* que apresentou um tamanho de 27 bases e o ΔG para *self dimer* do *GAPDH-F* que apresentou um valor bem mais baixo do que o seu par.

Tabela 1. Dados referentes ao desenho das sequências nucleotídicas dos primers forward (F), reverse (R) e probe (P) para os genes *blaSHV*, *ermA* e *GAPDH*.

Gene	Tipo	Sequência	Posição (pb)	Tamanho (b)	Conteúdo GC (%)	Tm (oC)	Self Dimer (ΔG) (kcal.mole ⁻¹)	Hairpin (ΔG) (kcal.mole ⁻¹)
<i>blaSHV</i>	F	5'-GCGAAAGATCCACTATC-3'	364	18	50	61,4	-2,1	-1,8
	R	5'-GCTGTTATCGCTCATGGTA-3'	487	19	47,4	63,5	-2,4	0
	P	5'-ATCTGGTGGACTCGCCG-3'	390	20	60	68,7	0	0
<i>ermA</i>	F	5'-TGGGTTTACTATTAATGCTG-3'	347	20	35	58,7	-3	0
	R	5'-GTCCTTCTTTGAAATCAATG-3'	483	20	35	58,7	-2,1	-0,8
	P	5'-ACAATCAATACAGACTCTACACTTGGGC-3'	446	27	40,7	68	-0,9	-0,9
<i>GAPDH</i>	F	5'-GGAAGCTTGTCATCAATG-3'	371	18	44,4	59,9	-5,5	-0,8
	R	5'-CCCCACTTGATTTGGAG-3'	440	18	50	61,8	-1,6	-1,6
	P	5'-ATCACCATCTCCAGGAGCGAG-3'	397	22	54,5	69,1	-1,4	0

Paralelamente, para obter informações mais detalhadas sobre as possíveis interações estruturais em *hairpin* e suas características, foi utilizada a ferramenta *PrimerQuest Tool do OligoAnalyzer* (Tabela 2). Nessa análise, o software avalia as diferentes formas estruturais possíveis em *hairpin* que essas sequências podem apresentar. Por isso, alguns *primers* como o *blaSHV-R* apresentam seis resultados diferentes, pois são as possíveis formatações que essa estrutura pode apresentar.

Os dados de ΔG para *hairpin* obtidos na tabela 2 corroboram os dados da tabela 1, em

que o primer *blaSHV-F* apresenta a estrutura com valores mais negativos -2,15 kcal.mole⁻¹ seguido pelo *GAPDH-R* com valores de -1,16 kcal.mole⁻¹. Os valores de entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) de todas as sequências são valores bastante negativos. Enquanto os valores de Tm variam bastante, com estruturas com uma Tm de 0,8 oC até 46,5 oC. Vale ressaltar que sequências com maiores valores de Tm, também, foram as que apresentam os menores de valores de ΔG , no caso *blaSHV-F* e *GAPDH-R* com 46,5 e 40 oC, respectivamente.

4 Diagnóstico multiplex in silico de pneumonias

Tabela 2. Dados referentes à análise de *hairpin* realizados na plataforma *OligoAnalyzer* utilizando o *PrimerQuest Tool*. A coluna estrutura indica os diferentes tipos de conformações estruturais que as sequências desenhadas podem obter. A coluna se refere às sequências *foward* (F), *reverse* (R) e *probe* (P); Tm = temperatura de *melting*, ΔG = Energia Livre de Gibbs, ΔH = entalpia e ΔS = entropia.

Gene	Tipo	Estrutura	ΔG (kcal.mole-1)	Tm (°C)	ΔH (kcal.mole-1)	ΔS (cal.k-1.mole-1)
<i>blaSHV</i>	F	1	-2,15	46,5	-31,9	-99,79
	R	1	0,44	17,9	-18,1	-62,2
	R	2	0,8	8,9	-14	-49,64
	R	3	0,84	9,5	-15,4	-54,48
	R	4	0,94	16,4	-31,7	-109,48
	R	5	1,28	0,8	-14,5	-52,92
	R	6	1,4	2,2	-16,9	-61,38
	P	1	-0,47	30,1	-28,3	-93,34
	P	2	-0,35	29,9	-21,3	-70,28
	P	3	-0,18	27,7	-19,8	-65,82
	P	4	-0,06	25,8	-22,2	-74,26
<i>ermA</i>	P	5	0,29	19,2	-14,8	-50,62
	F	1	-0,01	25,1	-22,6	-75,77
	F	2	0,83	7,3	-13,1	-46,71
	F	3	0,94	7,5	-15,1	-53,8
	R	1	-0,39	30,8	-20,4	-67,12
	P	1	-0,28	31,7	-12,7	-41,66
	P	2	-0,01	25,1	-43,3	-145,2
	P	3	0,16	23,4	-29,4	-99,15
	P	4	0,23	22,5	-27,1	-91,67
<i>GAPDH</i>	P	5	0,66	13,2	-16,1	-56,23
	F	1	-0,37	29,6	-24,4	-80,6
	F	2	0,23	21,2	-17,5	-59,46
	F	3	0,32	20,3	-20,3	-69,17
	F	4	0,39	19,7	-21,2	-72,4
	R	1	-1,16	40	-24,2	-77,29
	P	1	-0,83	38,4	-19,2	-61,63

No software *OligoArchitect™ Online* ainda foi realizada a multiplexação entre todas as sequências, gerando diversas combinações e resultando em múltiplos cruzamentos entre as os *primers forward*, *reverse* e as *probes*. Além disso, foi avaliada a energia livre de Gibbs (ΔG) para avaliar possíveis dimerizações cruzadas, ou seja, a probabilidade de dimerização entre as diferentes sequências (tabela 3).

Avaliando os dados da tabela 3, pode-se observar que há uma grande variedade de resultados entre as interações das

sequências desenhadas neste trabalho. Desde valores muito próximo de zero, como a interação entre *ermA-F* e *ermA-R* com -0,2 kcal.mole-1 até o par *GAPDH-P* e *blaSHV-R* com -7,2 kcal.mole-1. É possível observar que as sequências mais envolvidas em pares com valores mais negativos de ΔG para o *cross dimer*, ou seja, aqueles que mais têm chances de realizar uma ligação cruzada estável, foram as sequências de *ermA-R*, *GAPDH-R* e *GAPDH-P* com a maioria das suas interações ocorrendo com valores acima de -3 kcal.mole-1.

Tabela 3. Avaliação da Energia Livre de Gibbs (ΔG) na conformação de estrutura de dimerização cruzadas todas as combinações possíveis das sequências estudadas de estruturas *forward*, *reverse* e *probe* dos genes *blaSHV*, *ermA* e *GAPDH*.

Tipo de Análise	ΔG (kcal.mole ⁻¹)
<i>GAPDH-P - blaSHV-R</i>	-7,2
<i>GAPDH-P - ermA-F</i>	-5,8
<i>blaSHV-P - GAPDH-P</i>	-5,8
<i>ermA-R - GAPDH-R</i>	-5,5
<i>blaSHV-P - blaSHV-F</i>	-4,7
<i>ermA-P - GAPDH-R</i>	-4,3
<i>blaSHV-F - blaSHV-R</i>	-4,3
<i>GAPDH-P - GAPDH-F</i>	-4,2
<i>ermA-F - GAPDH-R</i>	-3,5
<i>blaSHV-P - GAPDH-R</i>	-3,3
<i>blaSHV-P - ermA-R</i>	-3,2
<i>blaSHV-F - ermA-R</i>	-3,1
<i>GAPDH-F - GAPDH-R</i>	-3,1
<i>GAPDH-P blaSHV-F</i>	-2,9
<i>GAPDH-P - GAPDH-R</i>	-2,9
<i>blaSHV-F - GAPDH-R</i>	-2,9
<i>ermA-P - blaSHV-R</i>	-2,7
<i>GAPDH-P - ermA-R</i>	-2,7
<i>blaSHV-P - ermA-P</i>	-2,5
<i>ermA-P - GAPDH-F</i>	-2,3
<i>ermA-R - GAPDH-F</i>	-2,2
<i>ermA-P - ermA-R</i>	-2,1
<i>blaSHV-R - GAPDH-F</i>	-1,8
<i>ermA-P - blaSHV-F</i>	-1,6
<i>blaSHV-F - ermA-F</i>	-1,6
<i>blaSHV-R - GAPDH-R</i>	-1,6
<i>ermA-P - GAPDH-P</i>	-1,6
<i>ermA-P - ermA-F</i>	-1,4
<i>blaSHV-F - GAPDH-F</i>	-1,4
<i>blaSHV-P - GAPDH-F</i>	-1,2
<i>blaSHV-R - ermA-R</i>	-0,9
<i>blaSHV-R - ermA-F</i>	-0,6
<i>ermA-F - GAPDH-F</i>	-0,6
<i>blaSHV-P - blaSHV-R</i>	-0,3
<i>ermA-F - ermA-R</i>	-0,2

DISCUSSÃO

Uma das abordagens para o desenho de *primers* envolve a utilização de programas de bioinformática como resultado da integração entre ciências computacionais e biológicas¹².

Os estudos que utilizaram PCR quantitativo em formato

multiplex (mqPCR) têm sido empregados para investigações relacionadas à resistência antimicrobiana. Esta técnica viabiliza a detecção e a quantificação simultânea de múltiplos alvos genéticos, apresentando-se como um método ágil e eficaz. Para alcançar sucesso em uma mq PCR, a concepção dos *primers* desempenha um papel crucial, uma vez que é essencial que sejam bastante específicos e meticulosamente projetados para permitir a detecção simultânea de múltiplos alvos em uma única reação¹³.

As sequências de nucleotídeos obtidas são importantes para garantir a especificidade da amplificação do DNA durante a reação da cadeia em polimerase (PCR). Quanto à posição, indica o local no gene alvo onde os *primers* e a *probe* se ligam. Isso ajuda a garantir que a amplificação seja feita na região correta do gene dentro de uma região conservada e previamente avaliada por meio do alinhamento múltiplo com sequências de referência obtidas em bancos de dados. O tamanho (b) representa o número de bases (nucleotídeos) presentes na sequência do *primer* ou *probe*. Segundo Brenda Thornton o ideal é que o tamanho esteja entre 18-25 nucleotídeos para garantir uma boa especificidade e eficiência na reação de PCR. Acerca do conteúdo GC (%), se refere ao percentual de guanina (G) e citosina (C) no *primer*. Segundo John Burpo, a porcentagem de GC ideal para *primers* usualmente é de 40% a 60%. Um conteúdo muito baixo ou muito alto pode afetar a eficiência de ligação do *primer* ao DNA^{14,15}. Essa predominância do GC na composição da fita se explica pelo fato de que existe uma ligação mais estável entre esses nucleotídeos, através de três pontes de hidrogênio, em comparação com as duas pontes presentes entre AT. Por isso, as ligações GC tornam-se mais difíceis de ser desfeitas do que as ligações AT¹⁰. Neste trabalho o conteúdo GC foi de no mínimo 35% e no máximo de 54,5%.

A temperatura de *melting* (T_m) indica a temperatura em que 50% das moléculas do *primer* se desassociam do DNA. Ela é essencial para ajustar as condições de PCR. A T_m ideal dos *primers* deve variar entre 52 e 58 °C¹⁶ ou entre 60 e 65 °C¹⁰. Idealmente, *primer forward* e *reverse* devem ter T_m similares, dentro de um intervalo de variação entre 1-3°C, para garantir eficiência na PCR, favorecendo uma boa amplificação^{14,17}.

Os dados de *self-dimer* referem-se a alterações na estrutura dos *primers* e *probes*. O *self-dimer* está relacionado com a energia livre associada à formação de dímeros, no qual duas moléculas com sequências nucleotídicas iguais se ligam entre si, ao invés de ligarem-se ao DNA-alvo. Valores de ΔG muito negativos indicam uma maior probabilidade de formação de dímeros, o que é indesejável, pois irá ocorrer uma competição entre os sítios de ligação¹⁸.

Ao analisar os dados na tabela 1 a *probe* para o gene *blaSHV*, nota-se que a concentração de GC de 60% contribui para o aumento da temperatura de *melting*, que é de 68,7 °C indicando uma forte ligação ao DNA. Essa correlação já foi relatada na literatura devido à estabilidade das ligações de bases GC^{18,19}. Comparado aos dados citados anteriormente, em

6 Diagnóstico multiplex in silico de pneumonias

relação ao gene *blaSHV*, o *primer forward* e reverse apresentam um conteúdo GC menor do que a *probe*, uma T_m com baixa variação entre si e baixa propensão para formação de dímeros. Os *primers* e a *probe* desenhados para o gene *ermA* apresentam conteúdo GC mais baixo que todas as outras sequências, o que pode diminuir a estabilidade das interações. No entanto, suas T_m são adequadas (58,7°C), e os valores de ΔG mostram uma baixa probabilidade de formar dímeros e estruturas em *hairpin*, o que é positivo^{20,21}. O gene *GAPDH* tem *primers* com um conteúdo GC intermediário, T_m com valores razoáveis, e baixas chances de formação de dímeros e *hairpins*, o que sugere bom desempenho nas reações de PCR¹⁸.

Avaliando coletivamente os resultados da presente na tabela 1, é possível observar que o valor de T_m das *probes* dos genes *blaSHV*, *ermA* e *GAPDH* é muito parecido com a variação de apenas 1,1 oC entre si e, aproximadamente, 5 a 10 oC superior a T_m dos *primers*. Essa condição é interessante para garantir a especificidade e a eficiência da reação. Os *primers* precisam hibridizar ao DNA-alvo antes da extensão pela DNA polimerase. Normalmente, a T_m dos *primers* é projetada para estar em torno de 55–65°C, garantindo uma ligação estável durante a etapa de anelamento. Entretanto, a sonda é projetada para hibridizar a uma sequência dentro da região amplificada pelos *primers*. A T_m da sonda deve ser 5–10°C maior do que a dos *primers*, para garantir que ela permaneça ligada ao DNA-alvo durante a etapa de extensão. Esse diferencial de T_m ajuda a evitar que a sonda se desestabilize ou que ocorra emissão de fluorescência em momentos inadequados, o que poderia comprometer a especificidade e a sensibilidade da detecção. Se a T_m da sonda for menor que a dos *primers*, há o risco de ela se desanexar antes da detecção, reduzindo a eficiência da reação^{19,22-24}.

Outra avaliação sistêmica importante é que há uma baixa variação na T_m entre os pares de *primers* de cada gene alvo. Isso é importante, pois a reação ocorre em uma única temperatura de anelamento. Se as T_m forem muito discrepantes, pode comprometer a eficiência de amplificação de alguns alvos, causando amplificação preferencial de outros. Além disso, diferenças extremas nas T_m podem levar a hibridizações inespecíficas, reduzindo a especificidade²⁵⁻²⁷.

A estrutura em *hairpin* é relacionada com alterações na estrutura primária das sequências nucleotídicas. Neste caso, a sequência em análise irá formar estrutura em estruturas secundárias em laço impedindo a função dessa sequência de se ligar do DNA-alvo. Neste trabalho, foi abordada a análise de *hairpin* em duas plataformas de análises diferentes. Dessa forma, para esta análise foram abordados os parâmetros Energia Livre de Gibbs (ΔG) que determinam a espontaneidade do processo, no qual valores muito negativos indicam que a formação do *hairpin* é termodinamicamente favorável, o que pode interferir na eficiência do *primer* ou *probe*; a entalpia (ΔH) que se refere à energia total liberada ou absorvida na formação do *hairpin*; e entropia (ΔS) que representa a mudança na desordem molecular^{18,19,21,27}.

Quanto ao gene *blaSHV*, o *primer forward* apresenta valores

mais negativos, mesmo que ainda sejam valores aceitáveis. No entanto, isso pode indicar maior estabilidade de *hairpins*, o que pode interferir no anelamento correto à fita molde e seriam menos desejáveis. As demais estruturas apresentam valores pouco negativos e até positivos, o que indica a baixa probabilidade de formação de *hairpins*, sendo mais adequadas. As estruturas nucleotídicas para o gene *ermA* apresentam resultados bem favoráveis a não formação de *hairpin*, enquanto no gene *GAPDH* o *primer reverse* também possui valores consideravelmente mais negativos que as demais sequências desenhadas, podendo apresentar um risco moderado para a sua eficiência. No entanto, as demais estruturas apresentam baixa propensão à formação de *hairpins*. Outro dado relevante para o *blaSHV-F* e *GAPDH-R* é que as T_m dessas estruturas são relativamente mais altas e podem indicar uma estabilidade moderada dessas estruturas dentro do meio reacional^{18,19,21,27}.

A dimerização cruzada ocorre quando *primers* diferentes se ligam entre si, em vez de se ligarem ao DNA alvo, e isso pode afetar a eficiência da amplificação. Valores mais negativos de ΔG indicam maior estabilidade das estruturas secundárias formadas por dimerização entre os *primers*, o que pode comprometer a reação de PCR, pois os *primers* podem se ligar entre si de forma mais estável. No entanto, valores ligeiramente negativos (ex: -1,4 kcal/mol) indicam interações fracas e não prejudiciais^{10,28,29}. Nesta análise, pode-se observar que sequências mais envolvidas em combinações que podem apresentar dimerizações cruzadas são a de *blaSHV-F*, *GAPDH-R* e *GADPH-P*. Por outro lado, a maioria das combinações não apresentam interações cruzadas fortes ou estáveis. Esses valores ajudam a avaliar a qualidade do *primer* em termos de estabilidade e a evitar interferências indesejadas, como *dimers*, que podem comprometer a amplificação correta do DNA alvo. *Primer* com valores muito negativos precisam ser ajustados ou redesenhados para garantir reações mais eficientes^{18,19,28,29}.

Avaliando os resultados de uma maneira geral, os programas de bioinformática utilizados atenderam bem às necessidades para o desenho dos *primers* e *probes*. No entanto, não é possível atender a todos os parâmetros, simultaneamente, nas suas condições ótimas. Dessa forma, é importante destacar as sequências *blaSHV-F* que apresentam o maior risco de formação de *hairpin*, *GAPDH-P* com uma grande quantidade de interações estáveis em ligações cruzadas com outras moléculas e, principalmente, a sequência de *GADPH-R* que apresentou maior propensão a *hairpin* e ligações do tipo *cross dimer*. Por outro lado, a situação das sequências de *GAPDH* são menos preocupantes, pois, como se trata de genes *housekeeping* de referência, é possível encontrar outros pares de *primers* e *probes* já descritos na literatura. Dessa forma, caso, experimentalmente, essas sequências de *GAPDH* falhem, é possível avaliar alternativas³⁰.

CONCLUSÃO

Foi possível realizar o desenho e a validação *in silico*, utilizando diferentes ferramentas de bioinformática, dos *primers* e *probes* para os genes de resistência *blaSHV* (beta-lactâmico), *ermA*

7 Diagnóstico multiplex in silico de pneumonias

(macrolídeos) e *GAPDH* (*gene housekeeping de referência*) com bons índices de conteúdo CG, temperatura de *melting* e energia livre de Gibbs para alterações estruturais como *self dimer*, *cross dimer* e *hairpin*. No entanto, é interessante a confecção e os testes experimentais com esses *primers* e *probes* a fim de

determinar a eficiência durante uma reação de m_qPCR.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Centro Universitário Christus – Unichristus por proporcionar o espaço para o desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- Assunção RG, Pereira WA, Abreu AG. Pneumonia bacteriana: aspectos epidemiológicos, fisiopatologia e avanços no diagnóstico. Rev. Investig. Bioméd [Internet]. 2018 [acesso 2024 Set 05]; 10(1): 83–91. Disponível em: <http://www.ceuma.br/portalderevistas/index.php/RIB/article/view/211>.
- Oliveira AC, Damasceno QS. Superfícies do ambiente hospitalar como possíveis reservatórios de bactérias resistentes: uma revisão. Rev Esc Enferm USP. 2010 Dec; 44(4): 1118–23. doi: <https://doi.org/10.1590/s0080-62342010000400038>.
- Zhou ZC, Liu Y, Lin ZJ, Shuai XY, Zhu L, Xu L, et al. Spread of antibiotic resistance genes and microbiota in airborne particulate matter, dust, and human airways in the urban hospital. Environ Int. 2021 Aug; 153: 106501. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106501>.
- Cilloniz C, Martin-Loeches I, Garcia-Vidal C, San Jose A, Torres A. Microbial etiology of pneumonia: epidemiology, diagnosis and resistance patterns. Int J Mol Sci. 2016 Dec; 17(12): 2120. doi: [10.3390/ijms17122120](https://doi.org/10.3390/ijms17122120). Pubmed PMID: 27999274.
- Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. 2002; 165(7): 867-903. doi: [10.1164/ajrccm.165.7.2105078](https://doi.org/10.1164/ajrccm.165.7.2105078). Pubmed PMID: 11934711.
- Pneumonia [Internet]. Rio de Janeiro: Fiocruz. [acesso 2024 Set 05]. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/pneumonia>.
- Mota FS, Oliveira HA, Souto RC. Profile and prevalence of antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated from intensive care patients. Rev Bras Anal Clin. 2018; 50(3): 270-7. doi: <https://doi.org/10.21877/2448-3877.201800740>.
- Corrêa JS, Zago LF, Silva-Brandão RR, Oliveira SM, Fracolli LA, Padoveze MC, et al. Antimicrobial resistance in Brazil: an integrated research agenda. Rev Esc Enferm USP. 2022 Feb; 56: e20210589. doi: <https://doi.org/10.1590/1980-220x-reusp-2021-0589>.
- Larsson DG, Flach CF. Antibiotic resistance in the environment. Nat Rev Microbiol. 2022 May; 20(5): 257-269. doi: [10.1038/s41579-021-00649-x](https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x). Pubmed PMID: 34737424.
- Bustin S, Huggett J. qPCR primer design revisited. Biomol Detect Quantif. 2017 Dec; 14: 19-28. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001>
- Chuang LY, Cheng YH, Yang CH. Specific primer design for the polymerase chain reaction. Biotechnol Lett. 2013 Oct; 35(10): 1541-9. doi: [10.1007/s10529-013-1249-8](https://doi.org/10.1007/s10529-013-1249-8). Pubmed PMID: 23794048.
- Paulus GK, Hornstra LM, Medema G. International tempo-spatial study of antibiotic resistance genes across the Rhine River using newly developed multiplex qPCR assays. Sci Total Environ. 2020 Mar; 706:135733. doi: [10.1016/j.scitotenv.2019.135733](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135733). Pubmed PMID: 31818563.
- Paruch L. Molecular diagnostic tools applied for assessing microbial water quality. Int J Environ Res Public Health. 2022; 19(9): 5128. doi: [10.3390/ijerph19095128](https://doi.org/10.3390/ijerph19095128). Pubmed PMID: 35564522.
- Thornton B, Basu C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. Biochem Mol Biol Educ. 2011 Mar-Apr; 39(2): 145–54. doi: [10.1002/bmb.20461](https://doi.org/10.1002/bmb.20461). Pubmed PMID: 21445907.
- Apte A, Daniel S. PCR primer design. Cold Spring Harb Protoc. 2009 Mar; 2009(3): pdb.ip65. doi: <https://doi.org/10.1101/pdb.ip65>.
- Borah P. Primer designing for PCR. Science Vision. 2011;11(3):134-6.
- Owczarzy R, Moreira BG, You Y, Behlke MA, Walder JA. Predicting stability of DNA duplexes in solutions containing magnesium and monovalent cations. Biochemistry. 2008 May; 47(19): 5336-53. doi: [10.1021/bi702363u](https://doi.org/10.1021/bi702363u) Pubmed PMID: 18422348.
- SantaLucia J Jr, Hicks D. The thermodynamics of DNA structural motifs. Annu Rev Biophys Biomol Struct. 2004; 33: 415-40. doi: [10.1146/annurev.biophys.32.110601.141800](https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.141800).
- Owczarzy R, Moreira BG, You Y, Behlke MA, Walder JA. Predicting stability of DNA duplexes in solutions containing magnesium and monovalent cations. Biochemistry. 2008 May; 47(19): 5336-53. doi: [10.1021/bi702363u](https://doi.org/10.1021/bi702363u).
- Queiroz JA, Alves LS, Dall'acqua DS, Souza LF. Desenho e validação de primers in silico para detecção do vírus sincicial respiratório humano. FIMCA. 2017 Dec; 4(1): 17-30. doi: <https://doi.org/10.37157/fimca.v4i1.6>.
- Markham NR, Zuker M. UNAFold: software for nucleic acid folding and hybridization. Methods Mol Biol. 2008; 453: 3-31. doi: [10.1007/978-1-60327-429-6_1](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-429-6_1). PMID: 18712296.
- Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MW, Meyer RB, Hedgpeth J. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. Nucleic Acids Res. 2000 Jan; 28(2): 655-61. doi: [10.1093/nar/28.2.655](https://doi.org/10.1093/nar/28.2.655). PMID: 10606668
- VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. Biotechniques. 2008 Apr; 44(5): 619-26. doi: [10.2144/000112776](https://doi.org/10.2144/000112776). PubMed PMID: 18474036.
- Weaver S, Dube S, Mir A, Qin J, Sun G, Ramakrishnan R, et al. Taking qPCR to a higher level: Analysis of CNV reveals the power of high throughput qPCR to enhance quantitative resolution. Methods. 2010 Apr; 50(4): 262-70. doi: [10.1016/j.ymeth.2010.01.003](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.003). PubMed PMID: 20079846.
- Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. Nucleic Acids Res. 1990 Nov; 19(3): 698. doi: [10.1093/nar/18.21.6409](https://doi.org/10.1093/nar/18.21.6409). PMID: 2243783
- Chen L, Mediavilla JR, Endimiani A, Rosenthal ME, Zhao Y, Bonomo RA, et al. Multiplex real-time PCR assay for detection and classification of Klebsiella pneumoniae carbapenemase gene (bla KPC) variants. J Clin Microbiol. 2011 Feb; 49(2): 579-85. doi: [10.1128/JCM.01588-10](https://doi.org/10.1128/JCM.01588-10). PubMed PMID: 213043520.
- Sheikh AA, Schneiderman D, Sykes EME, Kumar A, Chen W, Lapen DR, Khan IUH. Three novel multiplex PCR assays for rapid detection of virulence, antimicrobial resistance, and toxin genes in Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex species. Lett Appl Microbiol. 2024 Mar; 77(3): ovae027. doi: [10.1093/lambio/ova027](https://doi.org/10.1093/lambio/ova027). Pubmed PMID: 38460955.
- Burpo JF. A critical review of PCR primer design algorithms and cross-hybridization case study. Biochemistry. 2001 Jan; 218: 1-12.
- Vallone PM, Butler JM. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. Biotechniques. 2004 Aug; 37(2): 226-31. doi: [10.2144/04372ST03](https://doi.org/10.2144/04372ST03). PMID: 15335214.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M,

8 Diagnóstico multiplex in silico de pneumonias

Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-

time PCR experiments. Clin Chem. 2009 Apr; 55(4): 611-22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797. PMID: 19246619.

Como citar este artigo/ How to cite this article:

Braga MLM, Ximenes JCM. Desenvolvimento in silico de método diagnóstico multiplex para pneumonias. J Health Biol Sci. 2025; 13(1):e5323.