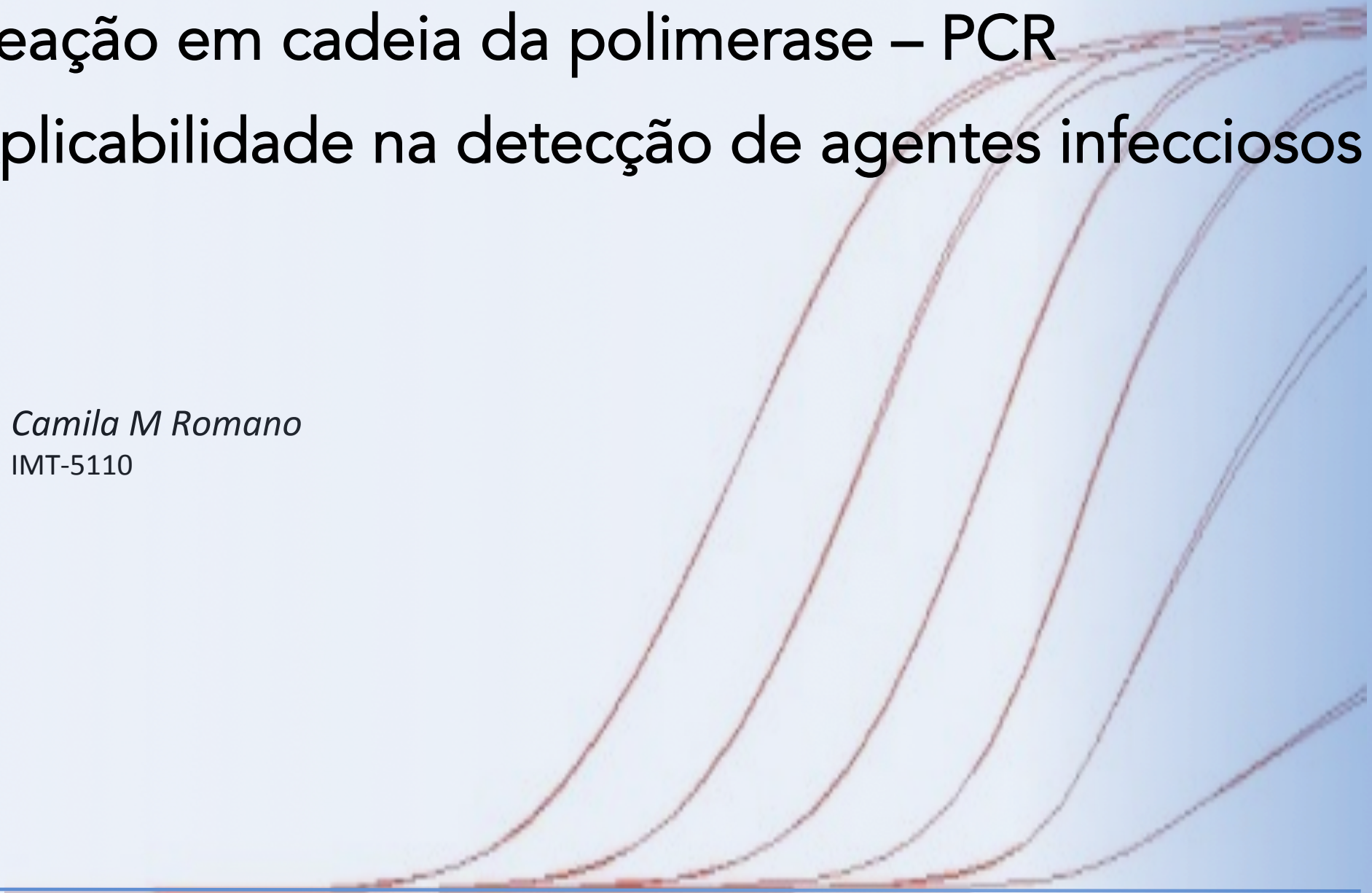




Reação em cadeia da polimerase – PCR

Aplicabilidade na detecção de agentes infecciosos

Camila M Romano
IMT-5110



cT



Definição: Reação que permite amplificar in vitro milhares/milhões de vezes uma região pré-determinada de ácido nucleico

PCR - Possibilidades

Diagnóstico de doenças genéticas (PCR alelo-específico)

Ciência forense: DNA fingerprints (por short tandem repeats, cada pessoa tem um padrão e pode ser diferenciado)

Sexagem – PCR para cromossomo Y

Quantificação de ácido nucleico (total ou de agente infeccioso – por pcr em tempo real; end point dilution...)

Expressão gênica

Identificação de OGM em agricultura/pesquisa

Mutagênese

Pré amplificação para sequenciamento

Contaminação de comida ou ambiental

Diagnóstico de agentes infecciosos

Métodos laboratoriais (para a investigação de doenças infecciosas)

Métodos **DIRETOS**

- Busca detectar **o agente**

Métodos **INDIRETOS**

- Detecta a **resposta do hospedeiro** ao agente



Diferentes métodos dentro da biologia molecular



Genericamente classificados em

- ✓ Métodos de hibridização
- ✓ Métodos de Amplificação
- ✓ Sequenciamento
- ✓ Métodos enzimáticos

Aplicações mais comuns em microbiologia

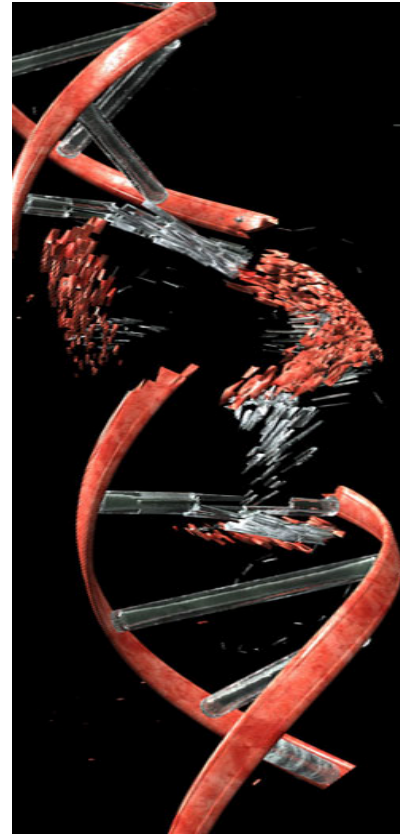
- Diagnóstico rápido de agentes infecciosos;
- Detecção de agentes não cultiváveis ou fastidiosos: ie. HPV, HCV, HBV, HIV... Mycobacterium tuberculosis, Legionella etc.
- Detecção in situ de agentes infecciosos: e. H. pylori, HPV...
- Infecções ainda em janela imunológica;
- Diferenciar agentes antigenicamente semelhantes: zika e dengue; tipagem HPV...
- Quantificação (CV)
- Acompanhamento de tto: Sequenciamento para avaliar resistência: HIV;
- Para fins de epidemiologia molecular: e. Identificar fontes pontuais para surtos hospitalares e comunitários

O que é necessário: Controle de qualidade

- **AMOSTRA**

Coleta; transporte e processamento

- **Manter a integridade do ácido nucléico**
 - Método de extração apropriado (DNA, RNA, ou ambos dependendo do material biológico os reagentes podem variar)
-
- Exemplo: extração de DNA de fezes ≠ sangue ≠ liquor ≠ plantas



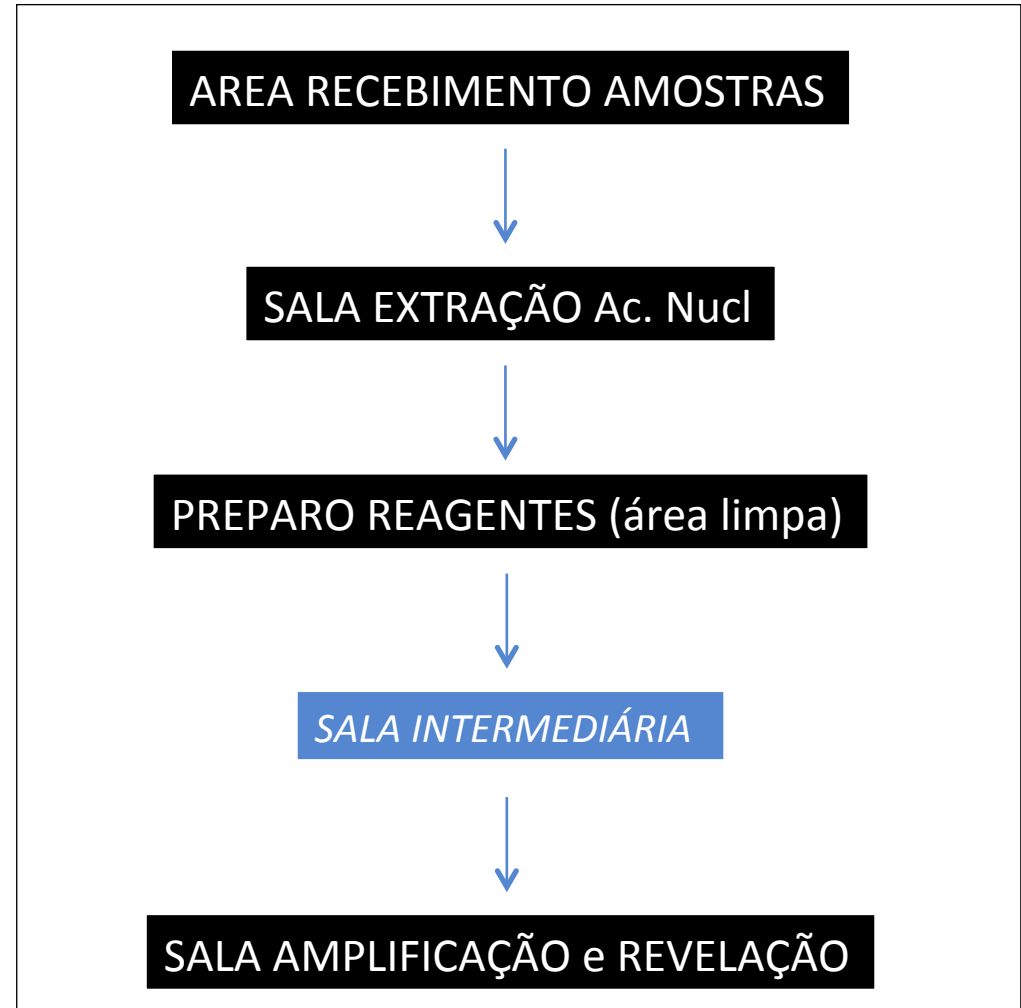
Controle de qualidade

CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO

Paramentação adequada

Estabelecer fluxo unidirecional

**UTILIZAR CONTROLES POSITIVOS E
NEGATIVOS– mais de 1 (-)**



Métodos de Amplificação

- ✓ PCR convencional
- ✓ PCR em tempo real
- ✓ RT-PCR
- ✓ Nested / semi-nested PCR
- ✓ Multiplex
- ✓ Isotérmicas:
- ✓ Rolling Circle Amplification
- ✓ PCR digital
- ✓ Fully Automated system*

Adicionando o P da PCR

1953 – Descoberta da estrutura do DNA Watson e F. Crick

Década de 50 – Estudando o mecanismo de replicação, descobriu-se a DNA polimerase em E. coli

Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid

I. PREPARATION OF SUBSTRATES AND PARTIAL PURIFICATION OF AN ENZYME FROM *ESCHERICHIA COLI*

I. R. LEHMAN,* MAURICE J. BESSMAN,† ERNEST S. SIMMS, AND ARTHUR KORNBERG

From the Department of Microbiology, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri

(Received for publication, October 10, 1957)

Adicionando o P da PCR

Início de 1960, Gobind Khorana usou pela primeira vez oligos sintéticos e polimerase pra sintetizar DNA

Em 1969, Thomas Brock descreve o isolamento de uma bactéria de fontes thermais do parque Yellow Stone, a *Thermophilus aquaticus*

Década de 70, outros pesquisadores foram otimizando as Polimerases (ainda se usava a da E coli



Adicionando o P da PCR

Década de 70, emprego de um par de oligos para restringir o trecho a ser amplificado – mas nunca foi publicado (briga de patentes até hoje)

Só em 1976 a Taq (Thermoph. Aquaticos) foi isolada para tal finalidade

Em 1980, todos os componentes necessários para uma PCR já eram conhecidos

Em 1983 Kary Mullis estava tentando otimizar o sequenciamento Sanger para um trecho específico de DNA, e teve a idéia...

Polymerase Chain Reaction (PCR)



Nobel de química em 1993

Kary Mullis

- Químico em 1966
- Doutor em 1972
- Mais 2 anos de pos doc

- Foi dono de padaria e escritor de ficção científica

- 1983 – teve a ideia de usar um par de primers pra ‘amplificar’ DNA, enquanto passeava com a namorada – trabalhava na Cetus Corporation na época (primeira empresa de biotecnologia, nos EUA)

- Levou 1 ano para padronizar – seus produtos de PCR não eram visíveis em gel de agarose

- No final de 1984, finalmente em experimento de Southern Blot o aumento de DNA de 110pb pode finalmente ser visualizado!

- Perdeu a namorada

- 1985/6 – Emprego da enzima Taq (Thermus aquaticus) – automatizando a técnica

curiosidades: surfista, divorciou 3 x, na manhã que ganharia o Nobel, quase foi preso, acha que HIV não causa AIDS, usou muito LSD e garante que isso o ajudou a descobrir a tal técnica

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Reação em cadeia da polimerase - Usado para amplificar um trecho específico de DNA

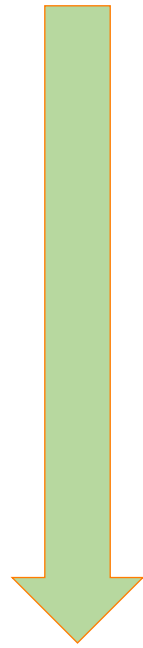
Pros:

- Simples e rápido, resultados em 1 dia
- Não requer organismo vivo/viável
- Sensível – detecta poucas moléculas na amostra

Cons:

- Sensível – de fácil contaminação
- A depender do organismo/teste, não distingue entre espécies
- Depende da presença do agente em quantidade suficiente

PCR



1-EXTRAÇÃO

2-AMPLIFICAÇÃO

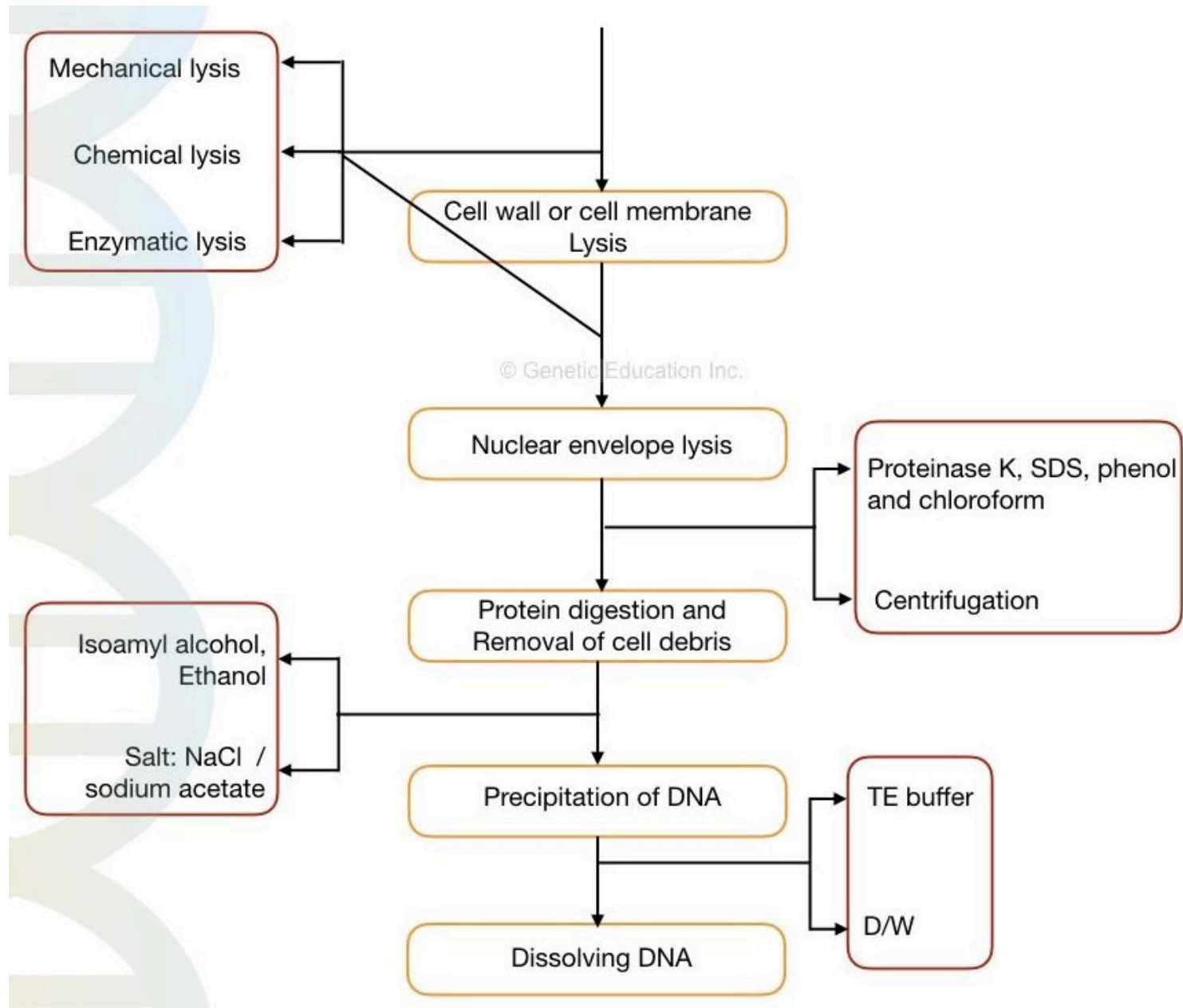
3-DETECÇÃO

1-EXTRAÇÃO



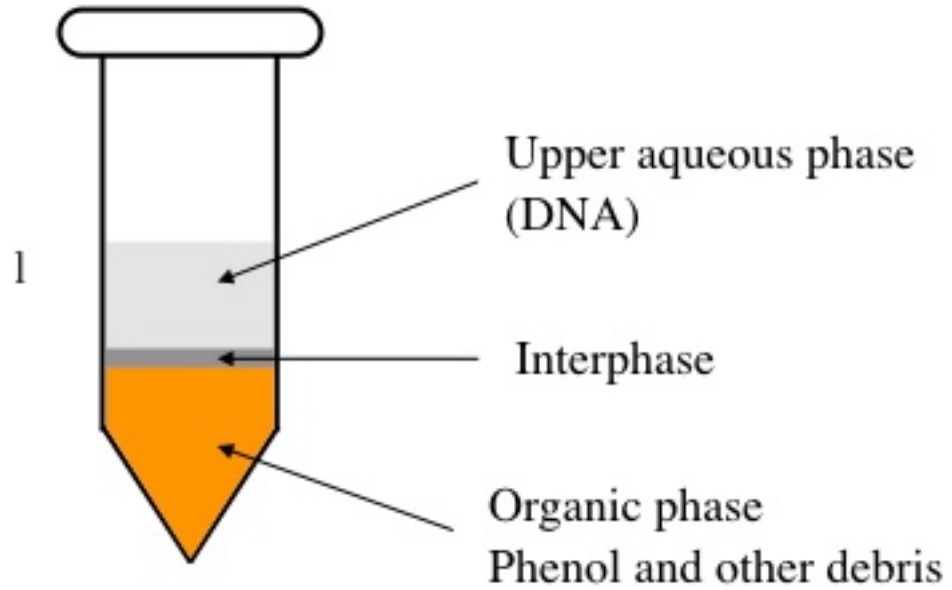
1-EXTRAÇÃO

- LISE
- PRECIPITAÇÃO
- PURIFICAÇÃO



LISE

Método PCI (Phenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico)



LISE

Primeiro passo – lisar membrana celular e nuclear capsídeos? Paredes?

Mecânica; química ou enzimática (calor)

O Tampão usado para lise varia de acordo com o tipo de célula/tecido original

Funções atribuídas

Romper as membranas; manter integridade do ac. nucléico; separar o DNA de detritos celulares;

TRIS; EDTA; Triton; SDS

Íons MG, NA...

Proteinase K

Aumenta a pureza e qualidade do material extraído
(peptidase)

K – keratin (proteína de pelos/cabelos e carapaças)

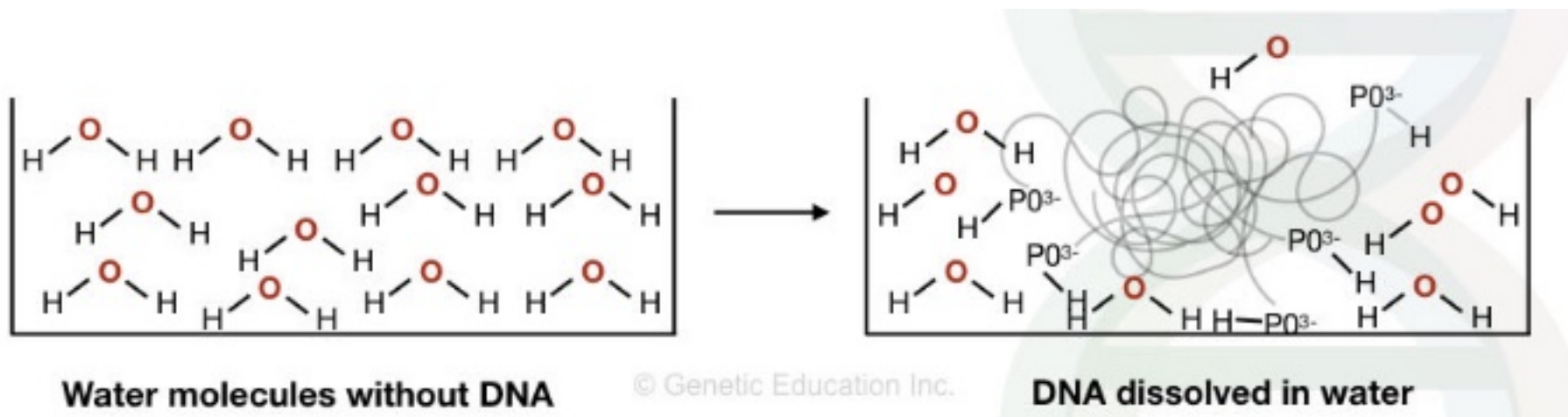
Digere proteínas em geral, incluindo nucleases
Ativada por íons de Calcio

Porque a T ideal é pxma de 50oC – embora seja ativa em temp mais baixas, a temp de 50C abre /quebra estrutura quaternaria de outras proteínas e ajuda na sua digestão

Cuidado – é inativada a 55!

PRECIPITAÇÃO

- DNA está solto na solução, é hidrofílico.



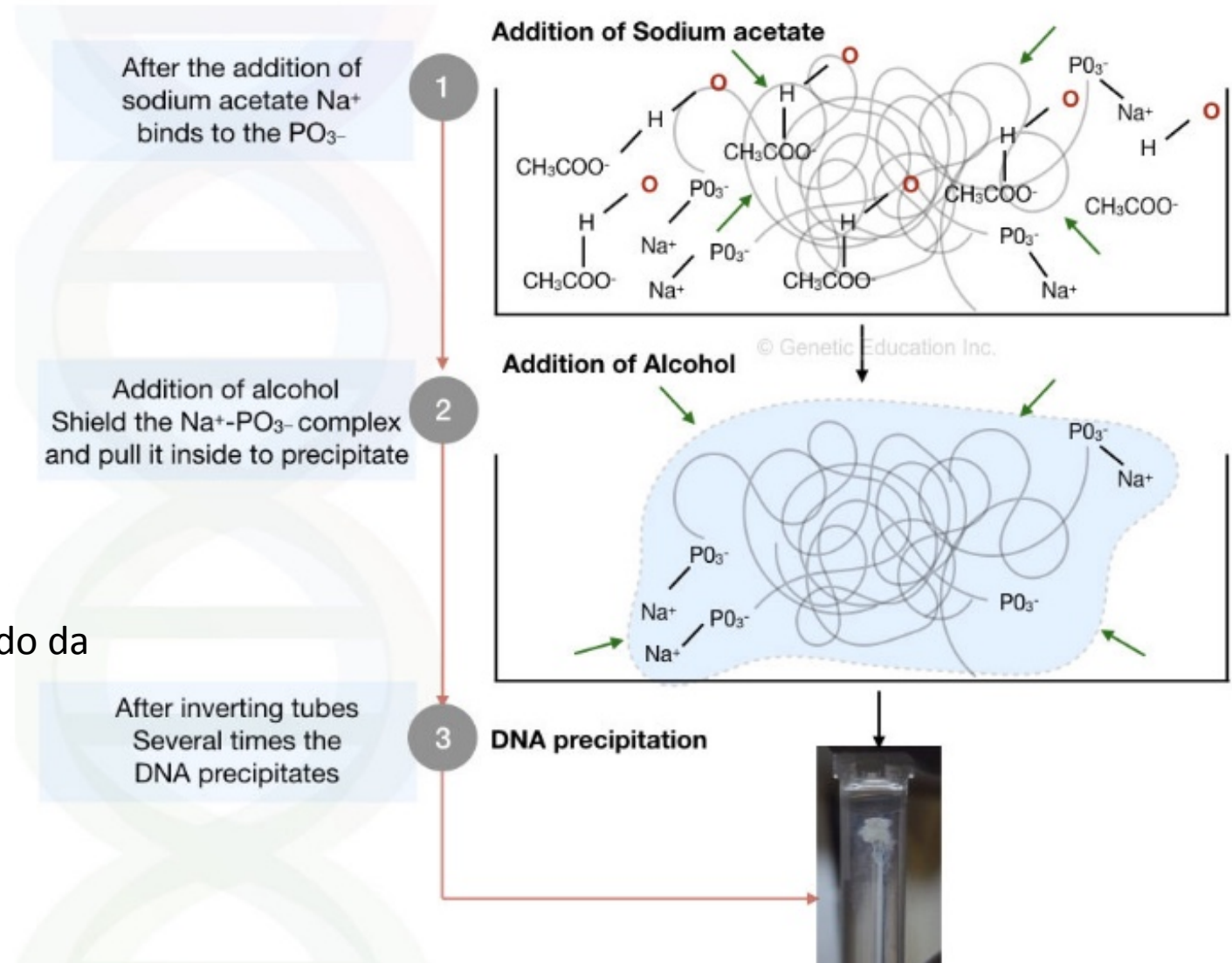
Interação entre cargas positivas da água com as negativas do DNA. Porém, interação é fraca.

PRECIPITAÇÃO

- O álcool + sal é capaz de precipitá-lo!

O Sal na solução (carga +) tem interação mais forte com o DNA do que a água – e torna o DNA hidrofóbico

- Álcool sequestra o complexo Sal+DNA, o protegendo da água
- Quanto mais agita, > carga + do sal > interação => precipitação



PASSO 1- A escolha dos primers

- Um iniciador é uma seq de ~18-28 bp, que deve ser específica a uma determinada região. É necessário um iniciador ancorando em uma fita, e outro na outra para que ocorra a amplificação de um trecho.

```
1 gcgagtacaa aaccgtcate ccgtctccgt acgtgaaatg ctgCGGTACA gcagagtgca
61 aggacaaaaa tctacctgac tacagctgta aggtcttcac cggcgtctac ccatttatgt
121 ggggcggcgc ttactgcttc tgcgacgctg aaaacacgca attgagcgaa gcacatgtgg
181 agaagtccga atcatgcaaa acagaatttg catcagcata cagggctcat acagcatccg
241 catcagctaa gctccgcgtc ctttaccaag gaaataacat cactgtaact gcctatgcaa
301 acggcgacca tgccgtcaca gtcaaggacg ccaaattcat tgtggggcca atgtcttcag
361 cctggacacc tttcgacaac aaaattgtgg tgtacaaagg tgacgtctat aacatggact
421 acccgccctt tggcgcagga agaccgggac aatttggcga catccaaagt cgcacacctg
481 agagtaaaga cgtctatgct aatacacaac tgggtgctgca gagaccggct gtgggtacgg
541 tacatgtgcc atactctcag gcaccgtctg gctttaagta ctggctgaag gaacgagggg
601 cgccgctgca gcacacagca ccatttggct gtcaaatagt aacaaacccg gtaagagcgg
661 tgaactgcgc cgtagggaac atgcccattt c
```

Senso – 5'-TCT ACC TGA CTA CAG CTG TAA G-3'

Anti senso – 5'CCG CTC TTA CCG GGT TTG TTA C-3' (rev comp!)

Mas esses iniciadores tem que ser específicos! Únicos no genoma... Certo?

- Por exemplo, existe $\frac{1}{4}$ de chance de encontrar um A, G, C ou T em uma posição do DNA;
- 1:16 de chance de encontrar qualquer sequência dinucleotídica (por exemplo, AG);
- 1:256 chance de encontrar uma determinada sequência de 4 bases (ex AATG);
- **Assim, uma sequência de 16 bases estará estatisticamente presente apenas uma vez em cada 4.2 bilhões: isto é mais do que o tamanho do genoma humano (3.2b) e 1000x maior que o tamanho do genoma de E. coli.**

Primer3Plus

pick primers from a DNA sequence

[Primer3Manager](#)

[Help](#)

[About](#)

[Source Code](#)

Task:

Select primer pairs to detect the given template sequence. Optionally targets and included/excluded regions can be specified.

Main

General Settings

Advanced Settings

Internal Oligo

Penalty Weights

Sequence Quality

Sequence Id:

[Paste source sequence below](#)

Or upload sequence file: Nenhum arquivo escolhido

Mark selected region:

[Excluded Regions:](#) < >

[Targets:](#) []

[Included Region:](#) { }

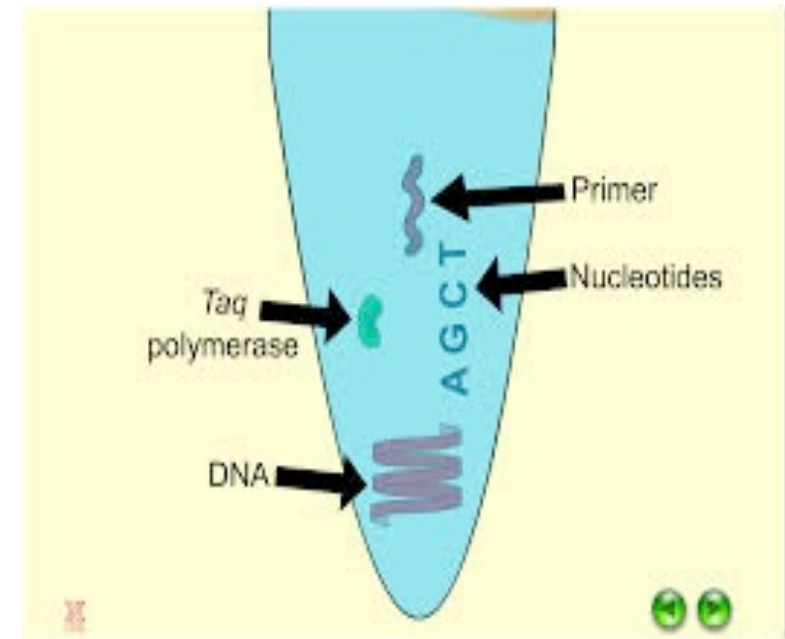
Pick left primer
or use left primer below.

Pick hybridization probe
(internal oligo) or use oligo below.

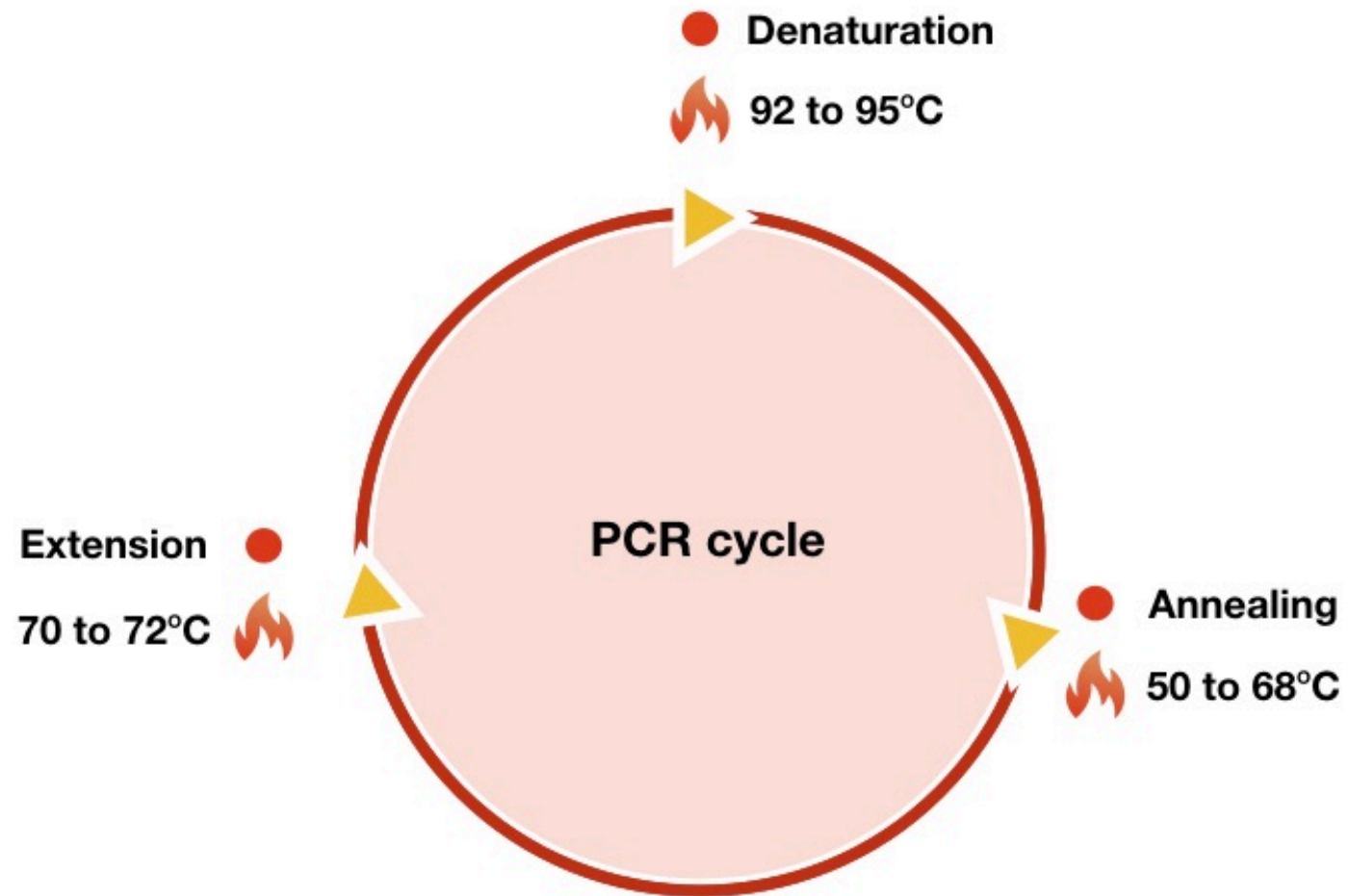
Pick right primer or use right primer
below (5'→3' on opposite strand).

PCR

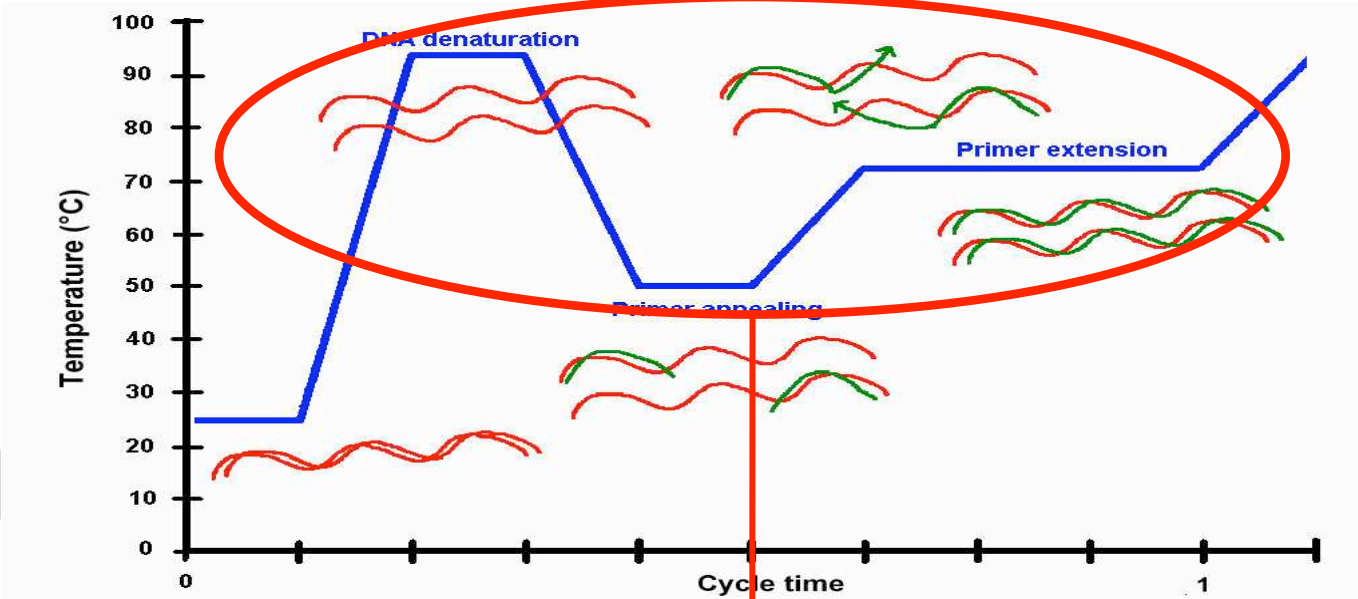
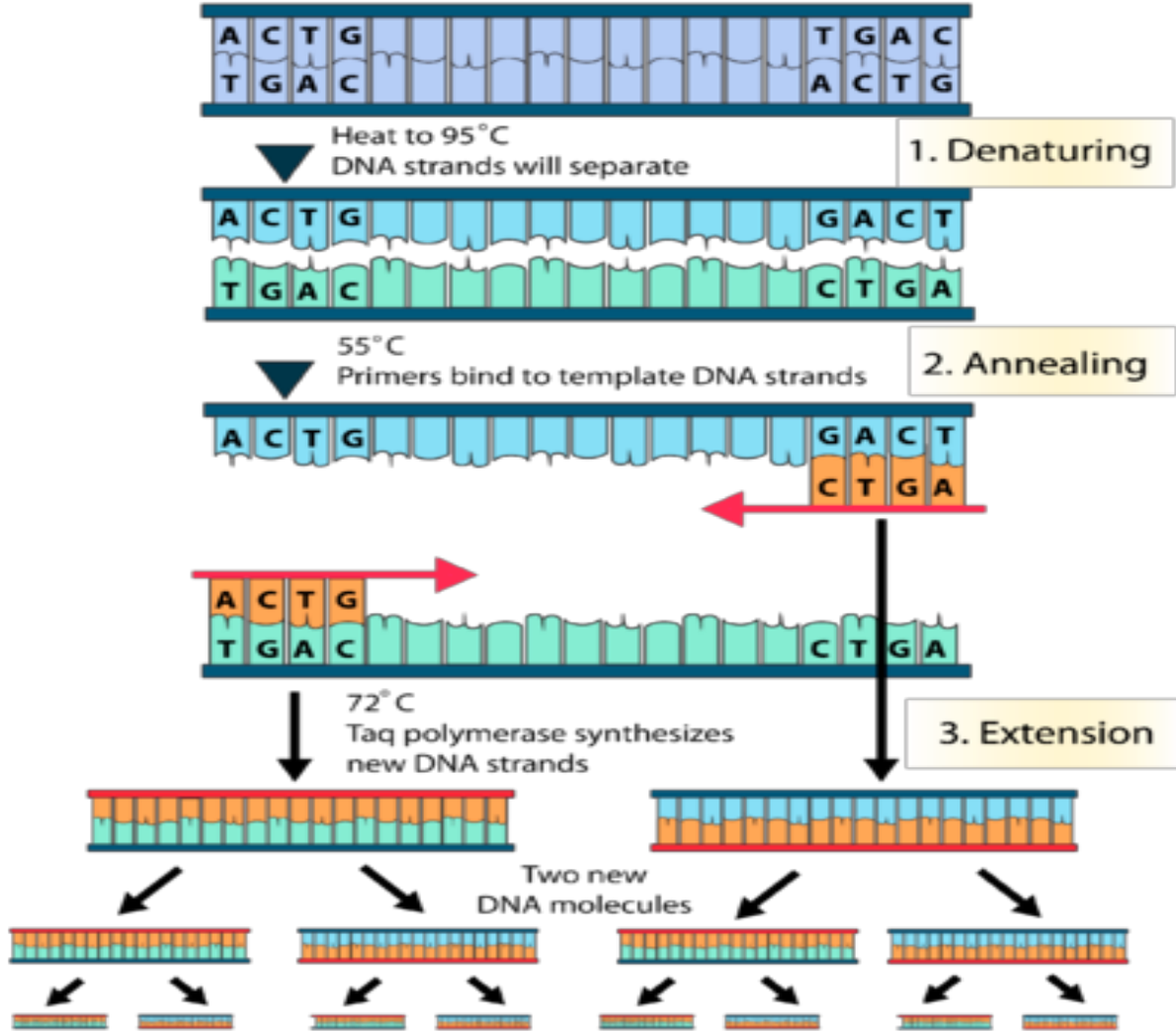
- O que é necessário:
- DNA genômico extraído
- 1 par de primers (senso e antisenso)
- DNA polimerase
- Solução com algum sal (MgCl)
- Tampão
- dNTP (dA, dT, dC, dG)
- Água
- DMSO, glycerol, ou outros enhancers



A PCR – como ocorre



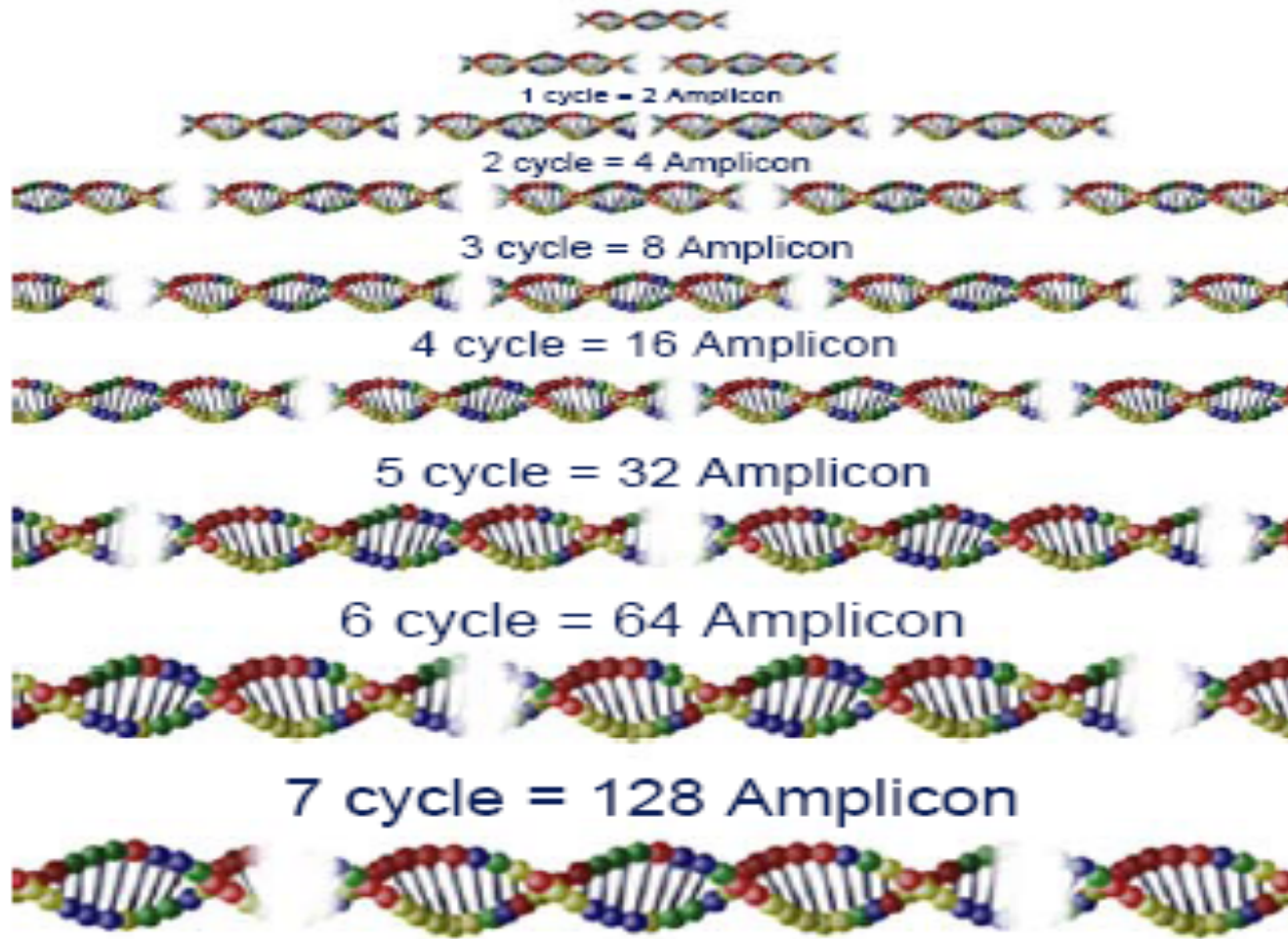
A PCR – a ciclagem



+ - 30 vezes

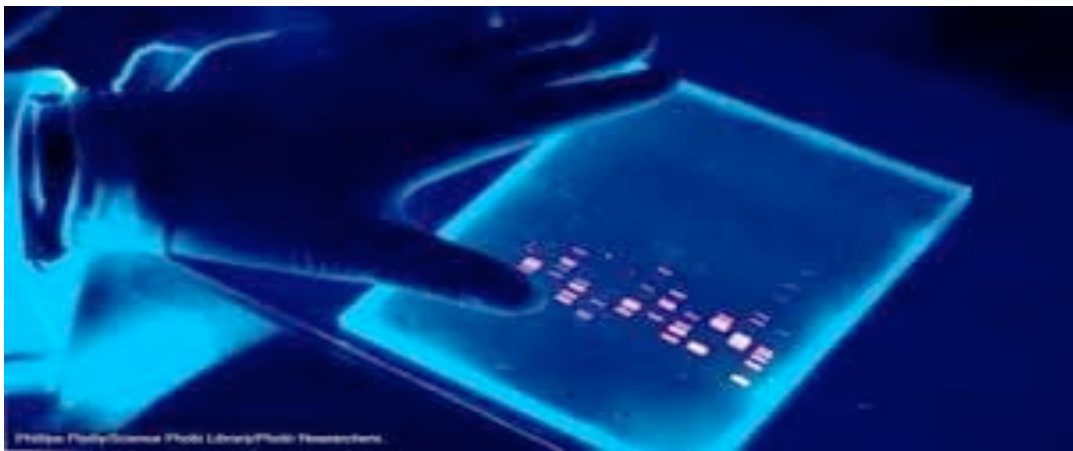
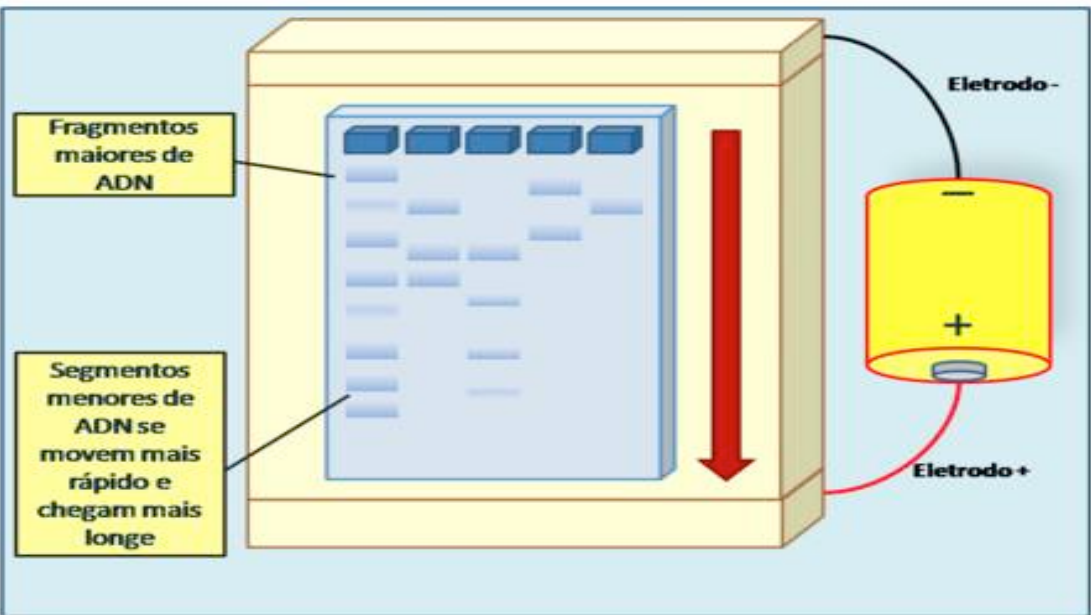


Amplificação exponencial – (até o esgotamento dos reagentes ou limite de ciclos)



No. of Cycles	No. Amplicon Copies of Target
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
20	1,048,576
30	1,073,741,824

PCR – revelação do resultado



Tips para seu PCR convencional ficar *batuta*

1. Qualidade do DNA extraído
2. Concentração e qualidade dos reagentes
3. Uso da DNA polymerase correta
4. Concentração de DNA
5. Desenho dos primers
6. Temperatura dos primers
7. Numero de ciclos
8. Concentração do MgCl



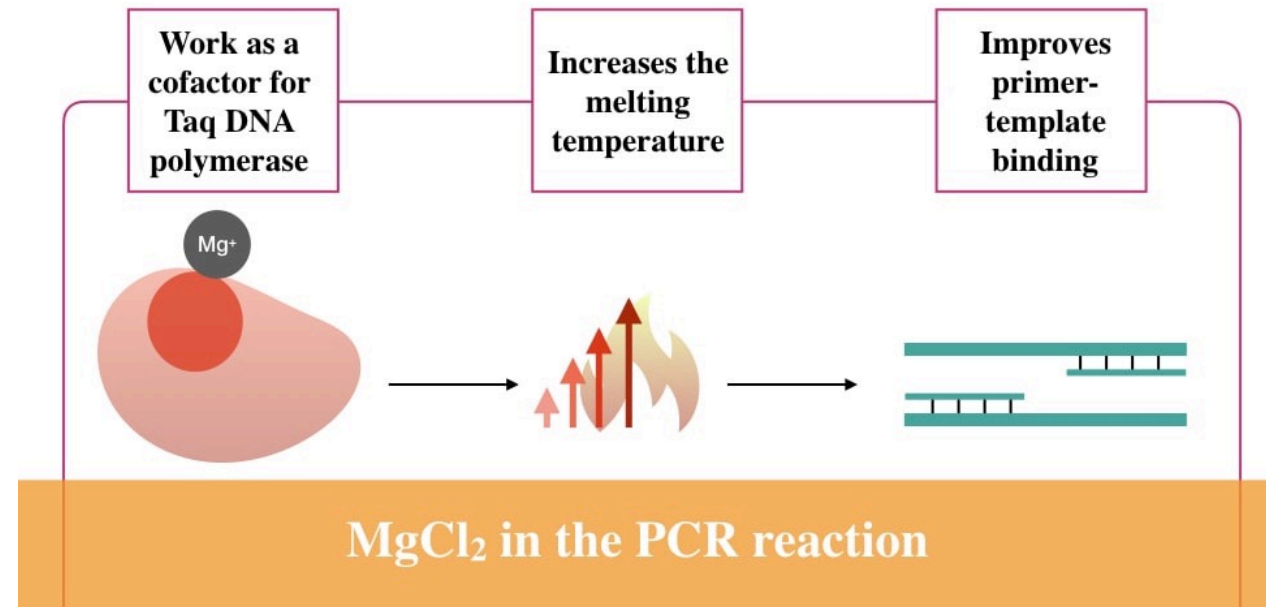
DNA polymerase	Use for	Concentration
Taq DNA polymerase	Shorter and conventional amplification.	1U
A hot start DNA polymerase	For diagnostics and low abundant DNA templates.	0.8- 1.0U
A high fidelity DNA polymerase	DNA sequencing, Site-directed mutagenesis and DNA microarray.	1U

Tips para seu PCR convencional ficar *batuta*



7. Numero de ciclos

8. Concentração do MgCl



- Aumenta a atividade da Taq DNA polimerase.
- Facilita a ligação do primer a fita complementar de modo eficaz
- Aumentar a temperatura de melting
- Aumenta a eficiência de amplificação da reação.

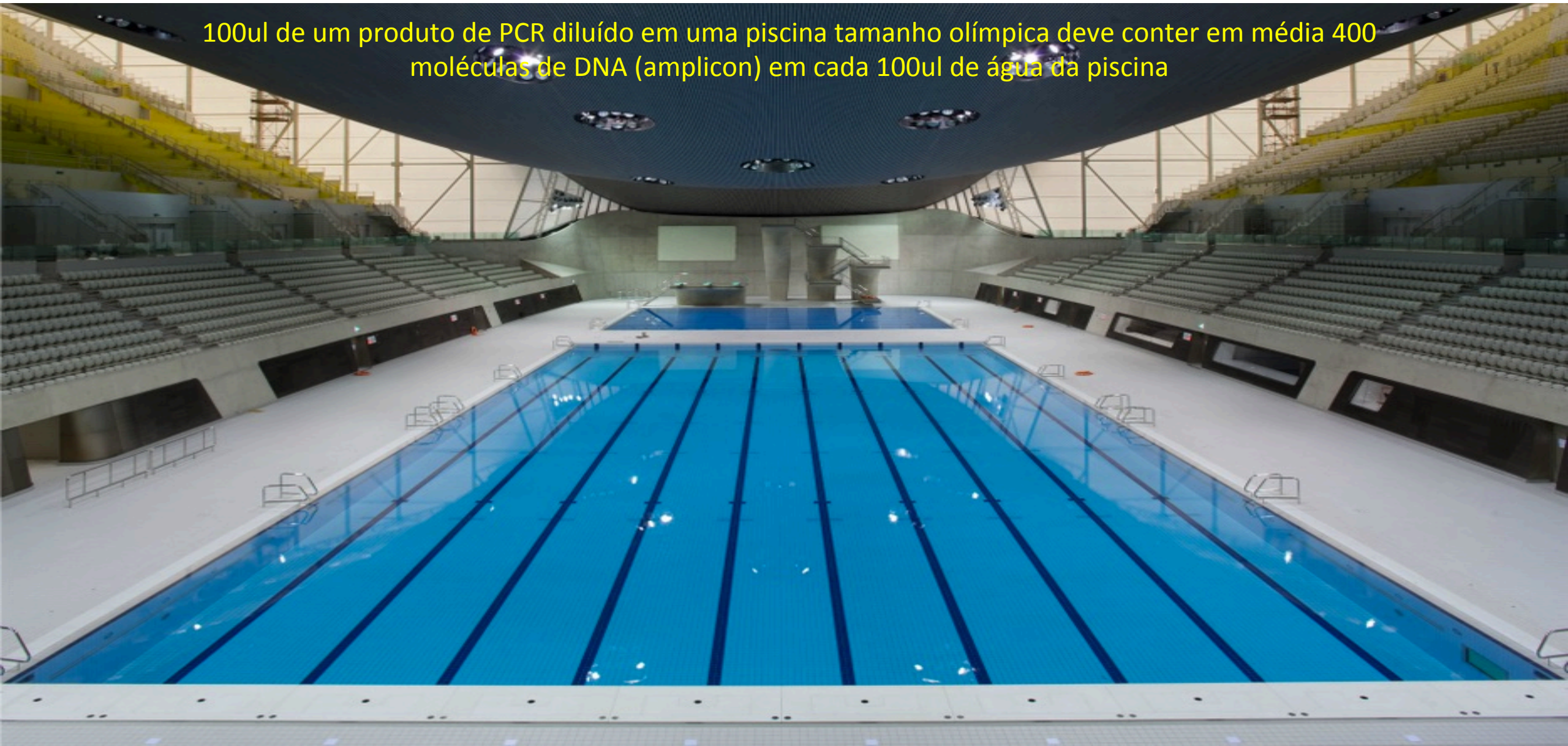
Cuidado com

PCR inhibitors

- *Compete com o Mg no sitio ativo da DNA polimerase*
- *Ou degradam a DNA polimerase*
- *Competem com DNA template*
- *Degradam o template*

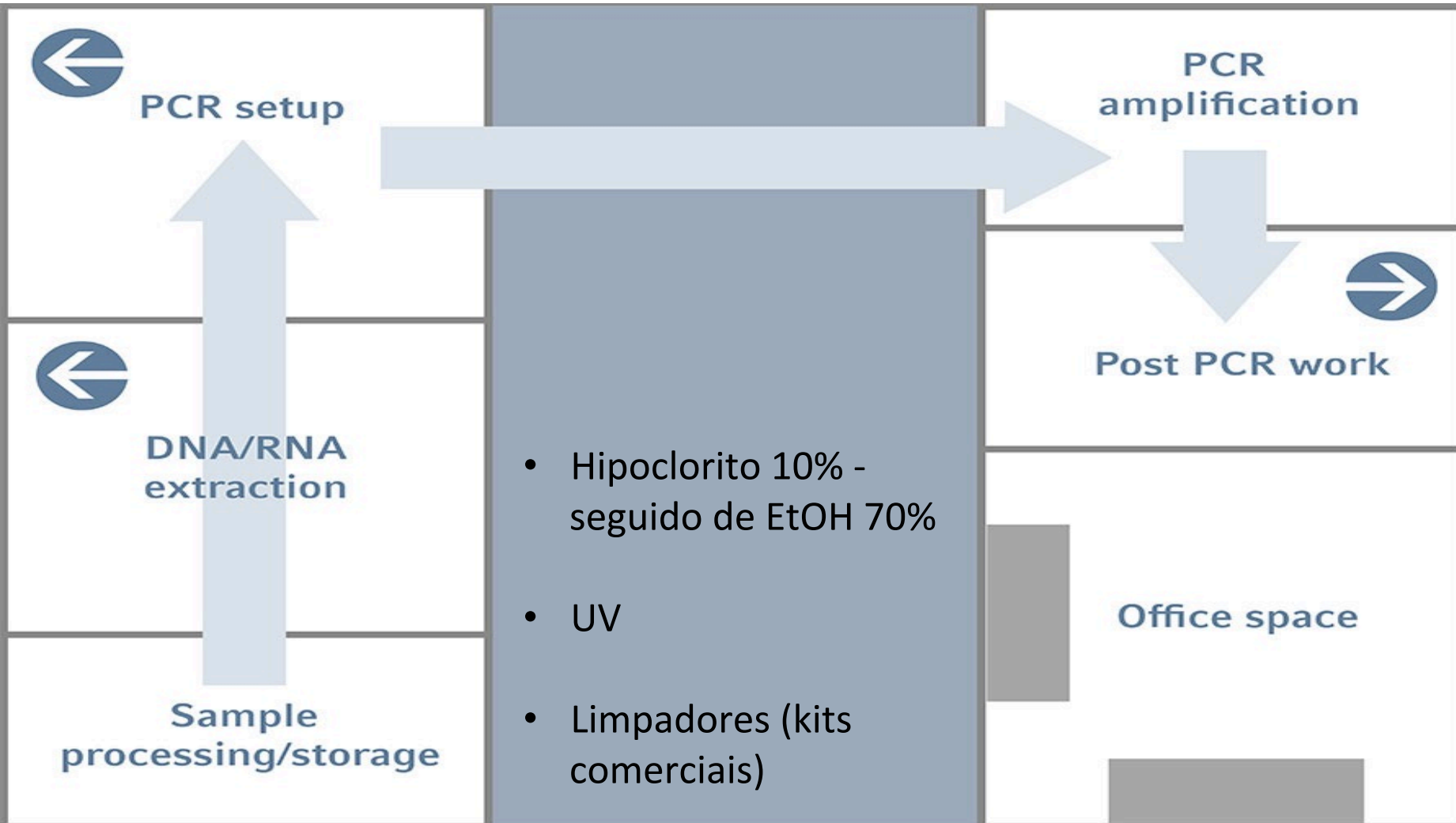
Sodium dodisyl
sulphate
KCl
Tannic acid
Uria
Bile
Salt
Phenol
Ethanol
Methanol
Polysaccharides
Melanin
Cell wall proteins
Immunoglobulines
Chaperon
Collagen
Haemoglobin
Protease
Nuclease

100ul de um produto de PCR diluído em uma piscina tamanho olímpica deve conter em média 400 moléculas de DNA (amplicon) em cada 100ul de água da piscina



Como evitar contaminação por amplicon?

Respeitar Fluxo de laboratório

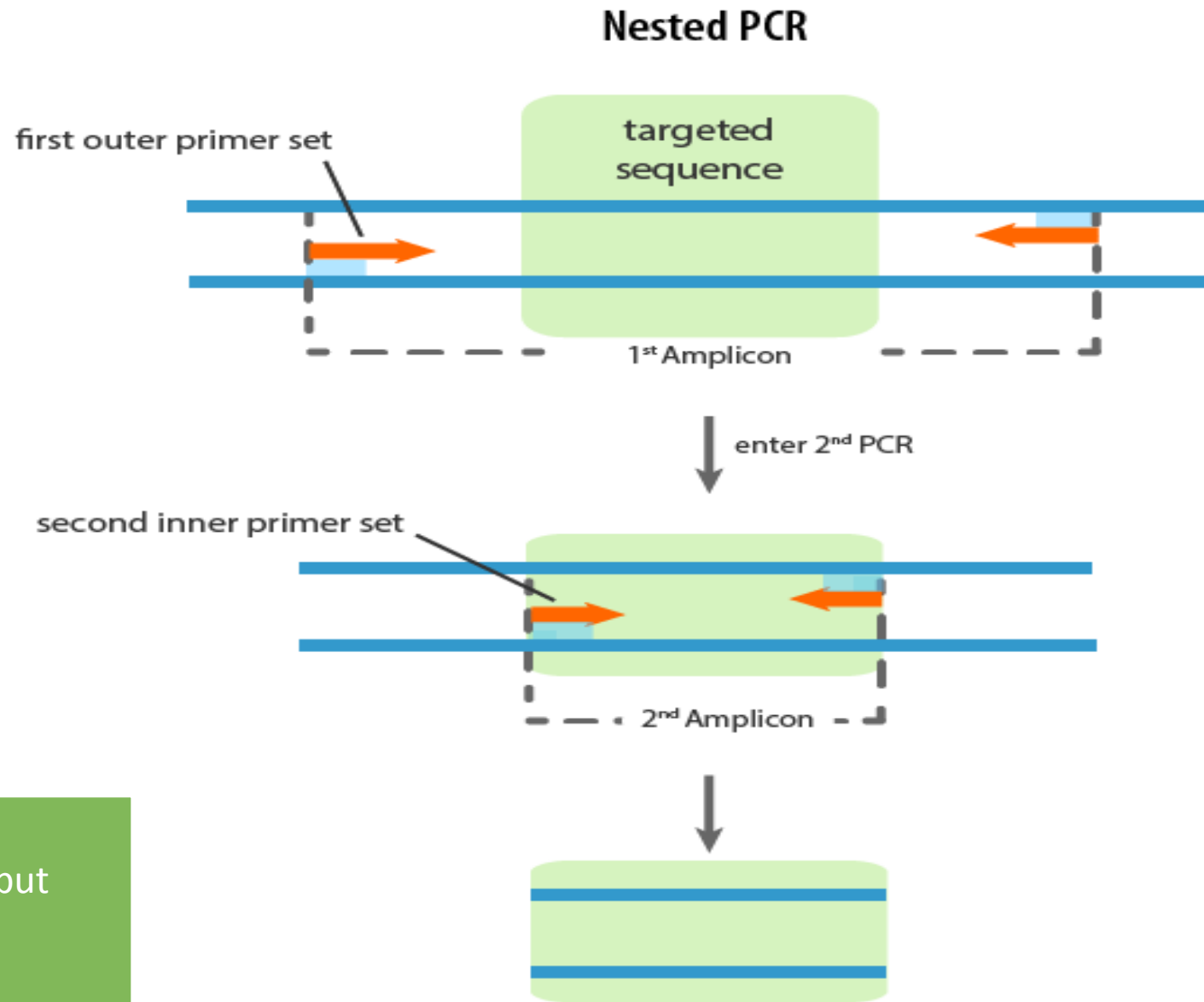


Nested PCR

- Ocorre em duas etapas
- Uso de dois pares de primers para amplificar uma região
- Usado para aumentar a sensibilidade e especificidade – diminui a chance de amplificação inespecífica
- Semi-nested – um dos primers mantém-se o mesmo

Pros: aumento de especificidade
Resultados positivos mesmo com pouco input

Cons: Trabalhoso,
Dado o numero maior de passos, aumenta chance de contaminação



PCR com transcrição reversa – RT-PCR

Utilizado para amplificar amostras de RNA

Útil para mensurar expressão gênica de qualquer organismo

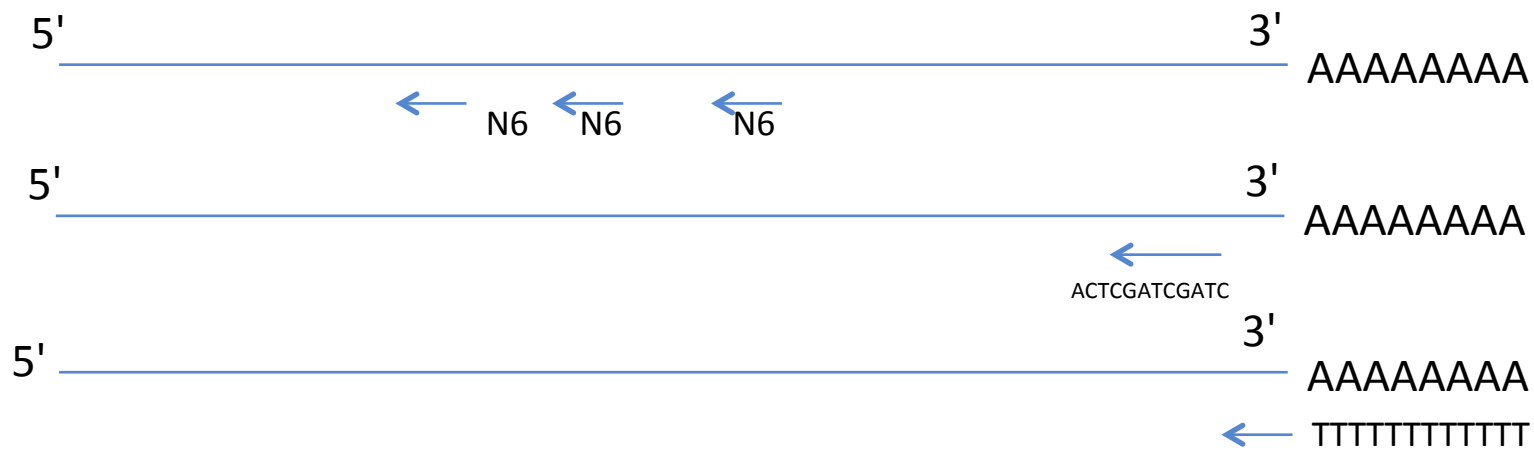
Ou para detecção de vírus cujo genoma é de RNA

Pode ser feito em uma etapa apenas, ou em duas etapas (one Step / Two steps)

One step: enzima Tth – *Thermos thermophilus* que possui atividade de RT e de DNA pol

PCR com transcrição reversa – RT-PCR

Sintetizar a fita complementar (cDNA) é a primeira etapa - sempre



Usa-se para sintetizar o cDNA:
primers hexâmeros,
específicos, ou poli-T

**Hexâmeros (diferentes hexâmeros aleatórios)*

Multiplex PCR

Amplificação de vários alvos em uma única reação

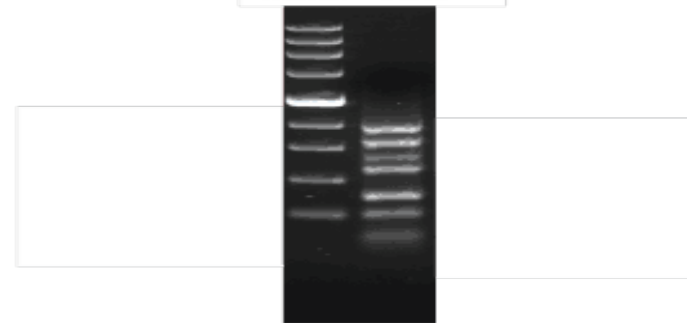


Primers para os diferentes alvos são adicionados

Temperatura de anelamento controlada

A idéia é que cada amplicon tenha um tamanho distinto – permite sua identificação na revelação

Maker Gene



1 Test. 21 Pathogens. 45 minutes.

The FilmArray® Respiratory Panel 2 (RP2)

Sample type: Nasopharyngeal Swab

Viruses

Adenovirus
Coronavirus HKU1
Coronavirus NL63
Coronavirus 229E
Coronavirus OC43
Human Metapneumovirus
Human Rhinovirus/Enterovirus
Influenza A
Influenza A/H1
Influenza A/H1-2009
Influenza A/H3
Influenza B
Parainfluenza Virus 1
Parainfluenza Virus 2
Parainfluenza Virus 3
Parainfluenza Virus 4
Respiratory Syncytial Virus

Bacteria

Bordetella parapertussis
Bordetella pertussis
Chlamydia pneumoniae
Mycoplasma pneumoniae



An unprecedented run time of about 45 minutes enables **higher efficiency and throughput** on the FilmArray® 2.0 and the FilmArray® Torch Systems with only 2 minutes of hands-on time.



With 21 pathogen targets in one test, including *Bordetella parapertussis*, the FilmArray RP2 is **more comprehensive** than ever.

97.1%
Sensitivity*
99.3%
Specificity*

*Data on file.

Higher overall sensitivity across a broader spectrum of pathogens means that the FilmArray RP2 offers the world the fastest way to better results in the detection of respiratory pathogens.

Plataforma de um único equipamento – extração amplificação e detecção

PCR em tempo real

Princípio = ao convencional

Porém, muito mais vantagens!

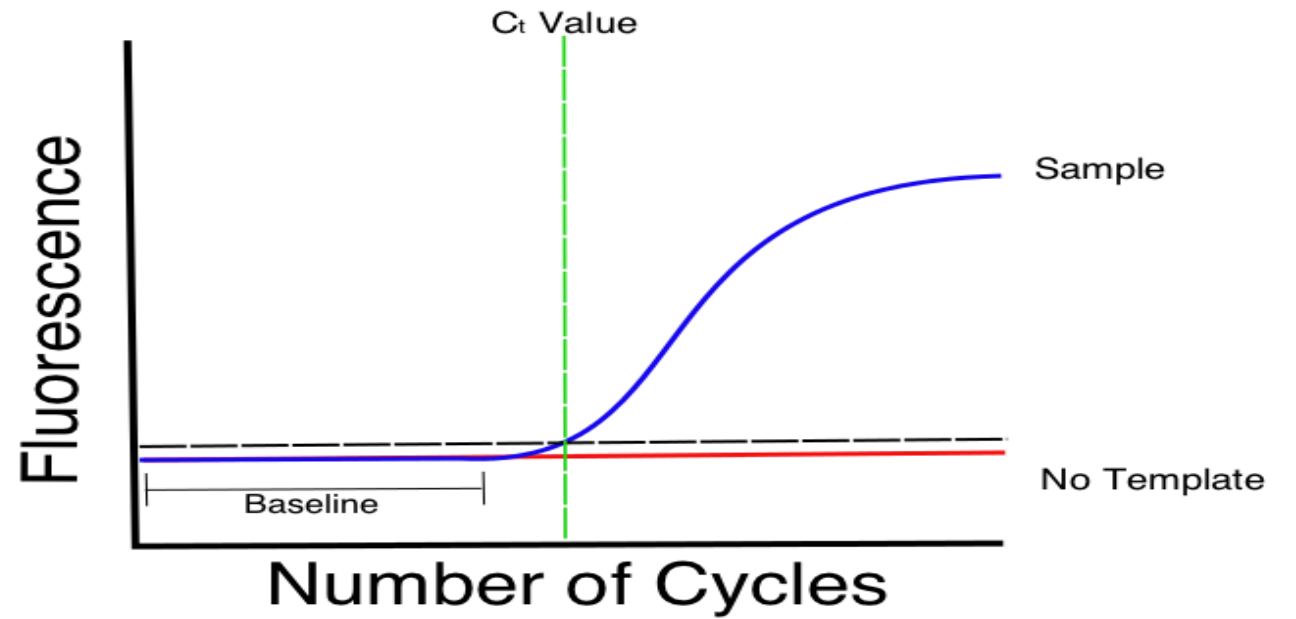
Pode ser quantitativo (qPCR) e semiquantitativo

Monitora a amplificação durante as ciclagens

Diferente do Convencional – não é end point

Os dois principais métodos do PCR em tempo real são

- SYBr- Marcador fluorescente (intercalante do DNA dupla fita)
- TaqMan- Sonda específica (também marcada)

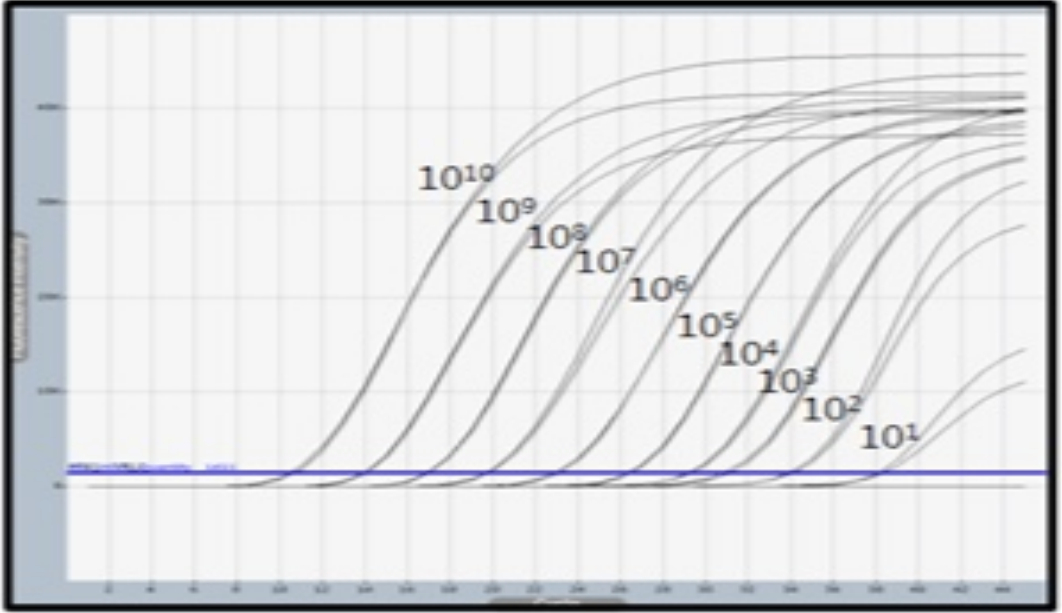
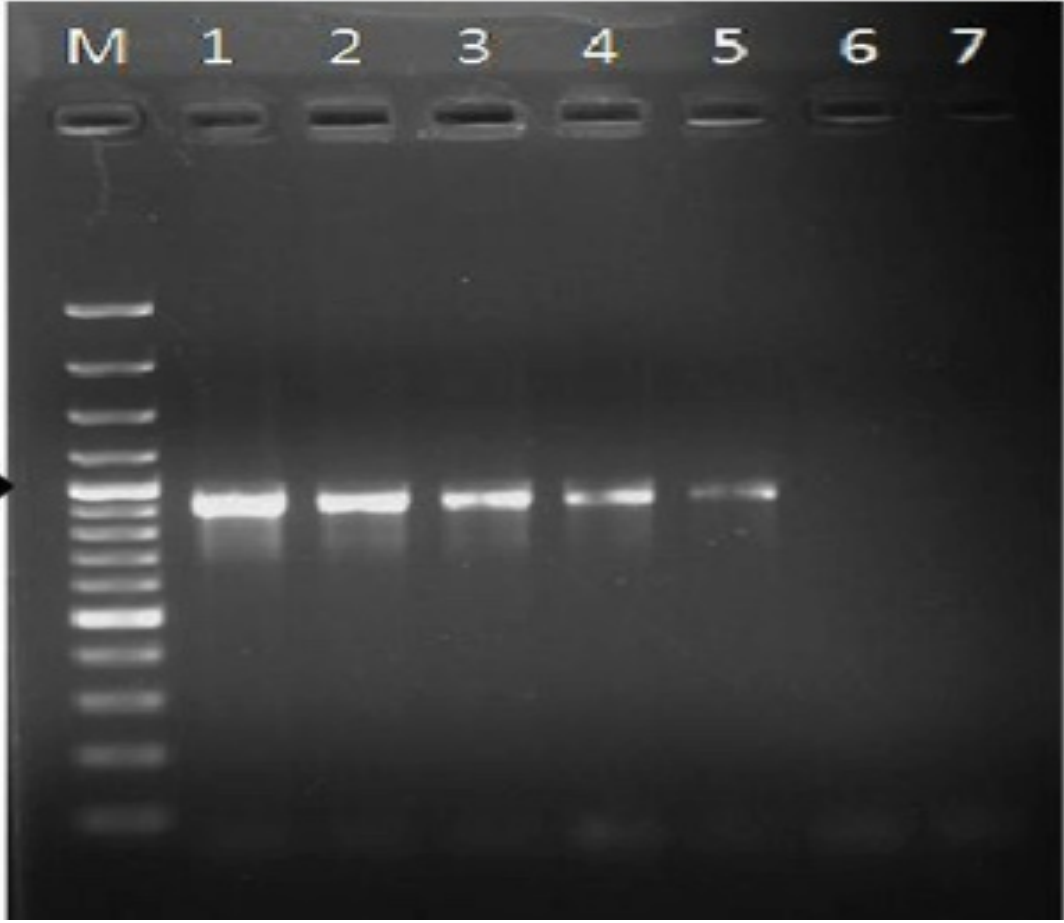


PCR em tempo real

Vantagens sobre Convencional

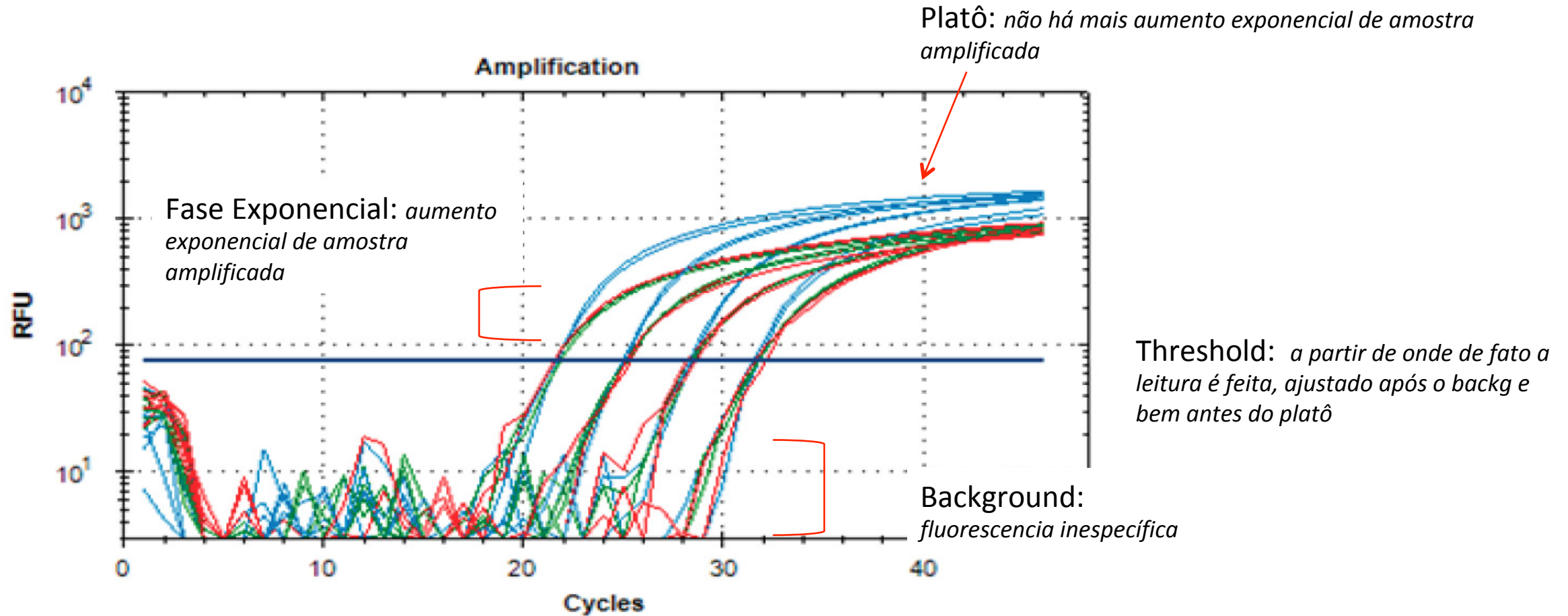
- ✓ Menor influência de amplificações inespecíficas
 - ✓ Amplificação monitorada em tempo real
 - ✓ Sem necessidade de pós-visualização (gel)
 - ✓ Ciclagem rápida ≥ 30 min
 - ✓ Requer menor qtd de DNA
 - ✓ Possibilidade de quantificação direta
- ✓ Preço quase equivalente ao PCR convencional

Comparando Convencional vs Tempo Real

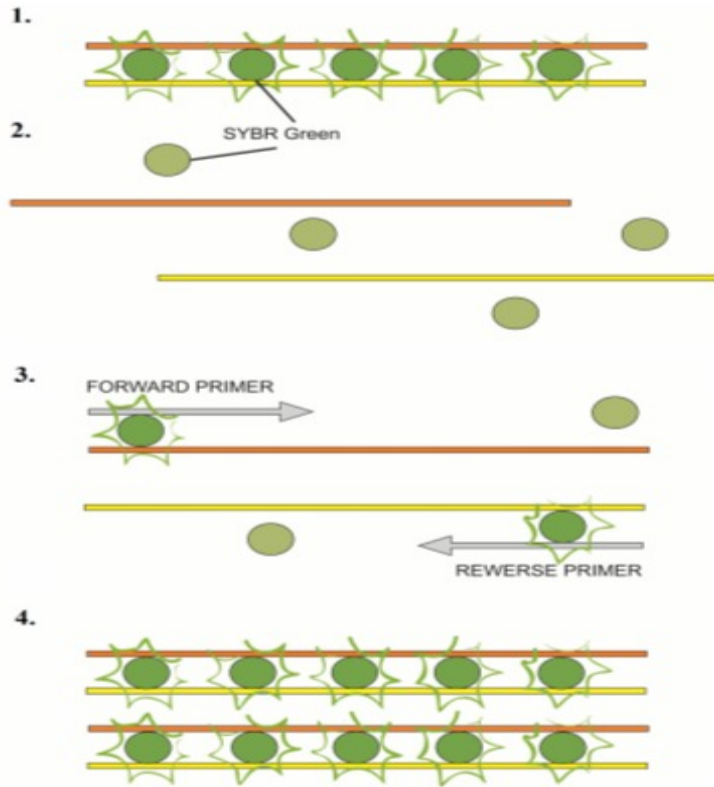


PCR em tempo real

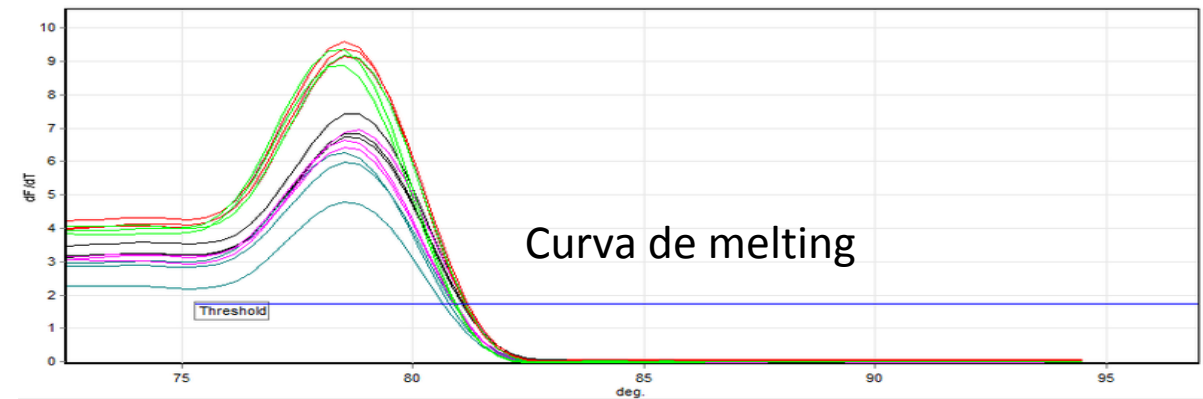
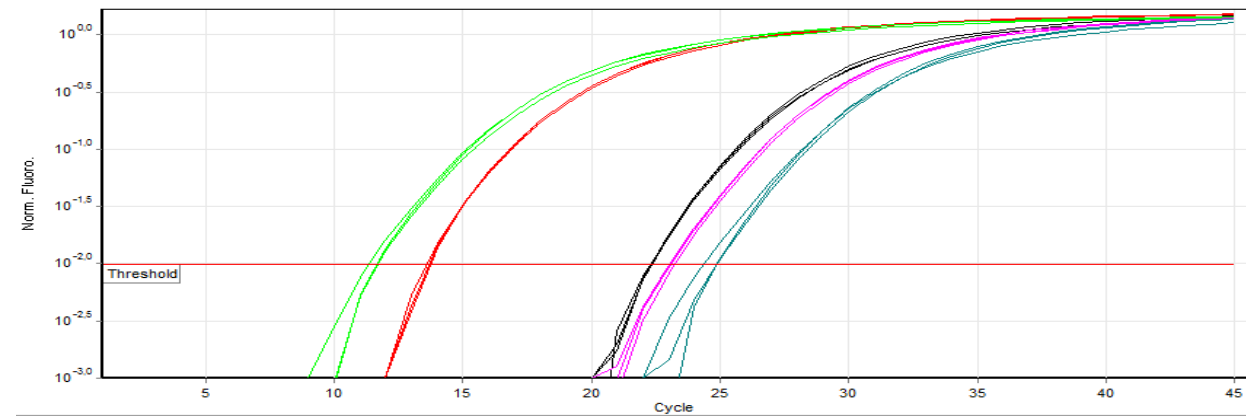
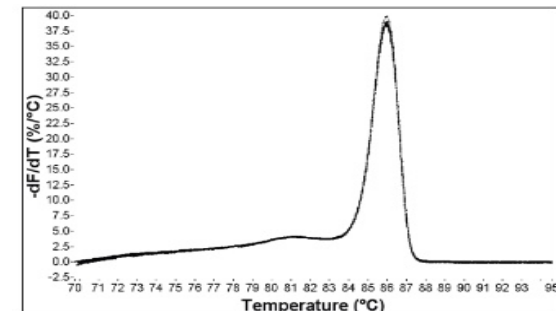
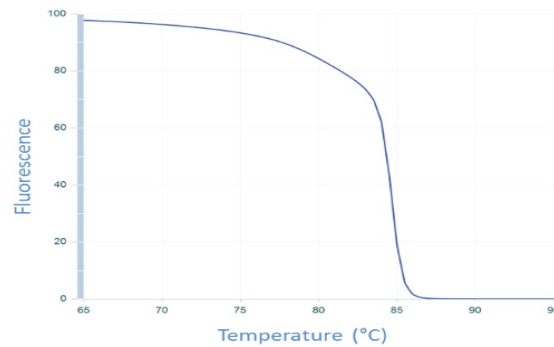
Algumas terminologias



PCR em tempo real – método SYBR



Interpretando a curva de melting:



Curva de temperatura é específica para cada produto amplificado, e permite diferenciar entre verdadeiros e falsos positivos

PCR em tempo real – método sonda (taqman)

Utiliza sonda – complementar ao gene alvo

Ela pareia com a fita alvo (fita simples)
a jusante do primer senso ou anti-senso

A medida que a fita complementar é estendida, a sonda se solta,
liberando o reporter e o separando do quencher --> aumentando
o sinal

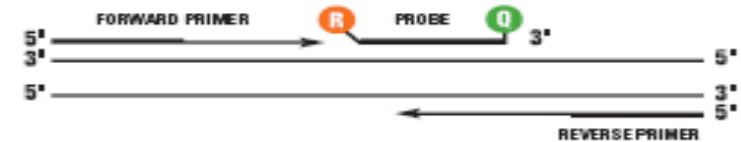
A fita continua a ser estendida, e o processo se repete a cada
ciclo

Pros: Mais específico que o método syber
não usa curva de melting para checagem

Cons : mais caro
problemas na sonda influenciam diretamente no dado

TAQMAN® PROBE-BASED ASSAY CHEMISTRY

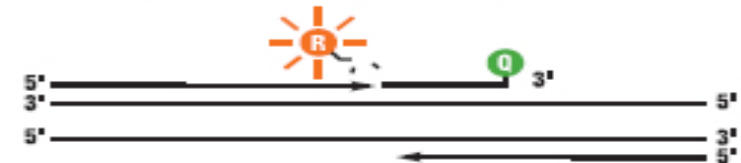
1. **Polymerization:** A fluorescent reporter (R) dye and a quencher (Q) are attached to the 5' and 3' ends of a TaqMan® probe, respectively.



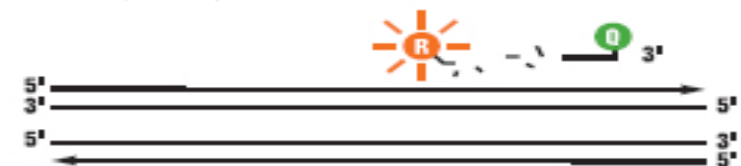
2. **Strand displacement:** When the probe is intact, the reporter dye emission is quenched.



3. **Cleavage:** During each extension cycle, the DNA polymerase cleaves the reporter dye from the probe.



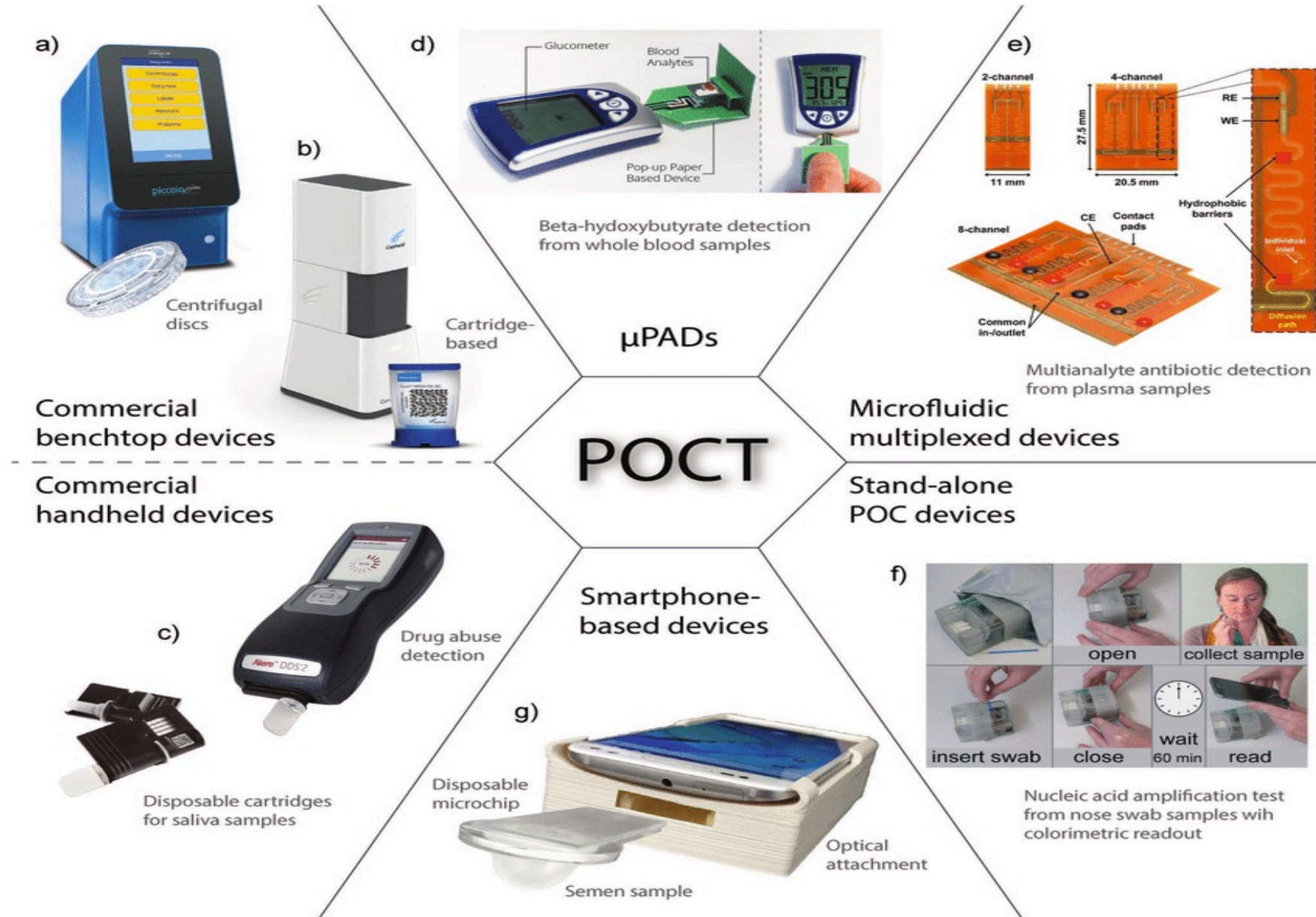
4. **Polymerization completed:** Once separated from the quencher, the reporter dye emits its characteristic fluorescence.



“Fully Automated” systems



POCT – Point-of-care



MÉTODOS

3. Sequenciamento

Sequenciamento

Identificação da ordem exata das bases (A,T,C,G) do DNA, ou RNA, ou dos aminoácidos de uma proteína

Método de terminação de cadeia (Sanger)

Métodos paralelizados massivos em larga escala (next generation)

O Sanger ainda é muito usado, mas está perdendo espaço para os métodos em larga escala

Causas de erros de testes moleculares

Falso positivo/ falso negativo

Apesar dos avanços em novas técnicas, erros ainda ocorrem.
Mas nem sempre é culpa da técnica!

Falhas dos TESTES/interpretação

Baixa sensibilidade analítica

Não testar para o organismo causador
(a maioria dos testes mol. detecta apenas um único patógeno)

Deteção de agente não causativo
(sensibilidade excessiva)

Contaminantes atrapalham a
deteção do agente real

Primers/sondas mal desenhados

Utilizar seqs pouco conservadas para
deteção

Mutação na sequencia alvo (virus
RNA)

Falhas de AMOSTRAGEM

Inibição da amplificação
(inibidores na amostra)

Erro de amostragem (baixa
concentração de ácido nucleico)

Coleta após o pico virêmico

CSF + : contaminação com sangue

XMRV

J Clin Virol. 2008 Nov;43(3):277-83. doi: 10.1016/j.jcv.2008.04.016. Epub 2008 Sep 27.

Prevalence of human gammaretrovirus XMRV in sporadic prostate cancer.

Fischer N¹, Hellwinkel O, Schulz C, Chun FK, Huland H, Aepfelbacher M, Schlomm T.

AIDS Rev. 2010 Jul-Sep;12(3):149-52.

Distribution of xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) infection in chronic fatigue syndrome and prostate cancer.

Mikovits JA¹, Huang Y, Pfost MA, Lombardi VC, Bertolette DC, Hagen KS, Ruscetti FW.

Retrovirology. 2010 Dec 20;7:110. doi: 10.1186/1742-4690-7-110.

An endogenous murine leukemia viral genome contaminant in a commercial RT-PCR kit is amplified using standard primers for XMRV.

Sato E¹, Furuta RA, Miyazawa T.

Clin Lab. 2011;57(7-8):631-4.

Presence of murine leukemia virus (MLV)-related virus gene sequences in a commercial RT-PCR reagent.

Wolff D¹, Gerritzen A.

Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with acute Zika virus infection.

Felix AC¹, Souza NCS¹, Figueiredo WM², Costa AA², Inenami M², da Silva RMG², Levi JE¹, Pannuti CS¹, Romano CM¹.

Avaliação de kits Anti IgM IgG Dengue em 61 amostras ZIKV + agudas e após 14 dias

ELISA kit companies	IgM			IgG		
	<7 days (DAO-7)	>14 days (DAO-14)	Seroconversion	<7 days (DAO-7)	>14 days (DAO-14)	Seroconversion
<i>Focus Diag.</i>	7/61 (11,5%)	23/61 (37,7%)	19/61 (31%)	38/61 (62,3%)	61/61 (100%)	23/61 (37,7%)
<i>Euroimmun AG</i>	10/61 (16,4%)	8/61 (13,1%)	5/61 (8%)	42/61 (68,8%)	61/61 (100%)	13/61 (21,3%)
<i>Panbio</i>	3/61 (4,9%)	12/61 (19,6%)	10/61 (16,3%)	41/61 (67,2%)	61/61 (100%)	16/61 (26,2%)
Combined data	14/61 (22,5%)	30/61 (49%)	22/61 (36%)	44/61 (72,1%)	61/61 (100%)	23/61 (37,7%)

Em regiões endêmicas para arbovírus, muito cuidado na escolha dos testes!

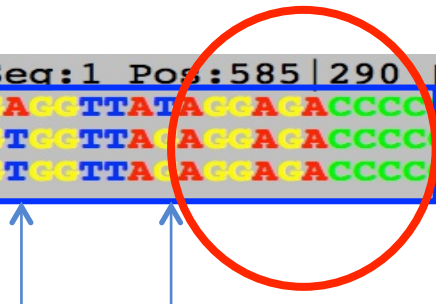
PCR real time anti DENV1-4

	Forward primer	Probe	Reverse primer
D2AF489932	AGTCTCACTGGAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCC	-CAAAACAAAAAACAGCATATTGACGCTGGGA	AAGSACCAGAGATCCTGCTGTCTCCT
D2M20558	AGTCTCACTGGAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCC	-CAAAACAAAAAACAGCATATTGACGCTGGGA	AAGSACCAGAGATCCTGCTGTCTCCT
D2AF169688	AGTCTCGCTGGAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCC	-CGAAACAAAAAACAGCATATTGACGCTGGGA	AAGSACCAGAGATCCTGCTGTCTCCT
D2AF359579	AGTCTCACTGGAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCC	-CGAAATAAAAAAACAGCATATTGACGCTGGGA	AAGSACCAGAGATCCTGCTGTCTCCT
D2NC001474	AGTCTCACTGGAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCC	-CAAAACAAAAAACAGCATATTGACGCTGGGA	AAGSACCAGAGATCCTGCTGTCTCCT
D1AB204803	ACCCTGGTGGTAAGGACTAGCGGTTAGAGGAGACCCCC	CGCATAACAATAAACAGCATATTGACGCTGGGAGAG	AACCAGAGATCCTGCTGTCTCCT
D1AB074761	ACCCTGGTGGTAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCC	CGCATAATAATAAACAGCATATTGACGCTGGGAGAG	AACCAGAGATCCTGCTGTCTCCT
D1AF298808	ACCCTGGTGGTAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCC	CGCATAACAATAAACAGCATATTGACGCTGGGAGAG	AACCAGAGATCCTGCTGTCTCCT
D1AF514883	ACCTTGGTGGTAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCC	CGCATAACAACAACAGCATATTGACGCTGGGAGAG	AACCAGAGATCCTGCTGTCTCCT
D1AF513110	ACCTTGGTGGTAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCC	CGCACACAACAACAACAGCATATTGACGCTGGGAGAG	AACCAGAGATCCTGCTGTCTCCT
D3M93130	ACCTCCTTGCAAAGGACTAGAGGTTATAGGAGACCCCC	CGCA-AACAA-AAACAGCATATTGACGCTGGGAGAG	AACCAGAGATCCTGCTGTCTCCT
D3NC_001475	ACCTCCTTGCAAAGGACTAGAGGTTATAGGAGACCCCC	CGCA-AACAA-AAACAGCATATTGACGCTGGGAGAG	AACCAGAGATCCTGCTGTCTCCT
D3AF317645	ACCTCCTTGCAAAGGACTAGAGGTTATAGGAGACCCCC	CGCA-AACAA-AAACAGCATATTGACGCTGGGAGAG	AACCAGAGATCCTGCTGTCTCCT
D3AY96873	ACCTCCTTGCAAAGGACTAGAGGTTAGAGGAAACCCCC	CGCA-AATAA-AAACAGCATATTGACCCTGGGAGAG	AACCAGAGATCCTGCTGTCTCCT
D3AY876494	ACCTCCTTGCAAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCC	CGCA-AATAA-AAACAGCATATTGACGCTGGGAGAG	AACCAGAGATCCTGCTGTCTCCT
D4AY618993	ACTCTGGTGGTAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCC	-CAACACAA-AAACAGCATATTGACGCTGGGA	AAGSACCAGAGATCCTGCTGTCTCCT
D4M14931	ACTCTGGTGGTAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCC	-CAACACAA-AA-CAGCATATTGACGCTGGGA	AAGSACCAGAGATCCTGCTGTCTCCT
D4AF326573	ACTCTGGTGGTAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCC	-CAACACAA-AAACAGCATATTGACGCTGGGA	AAGSACCAGAGATCCTGCTGTCTCCT

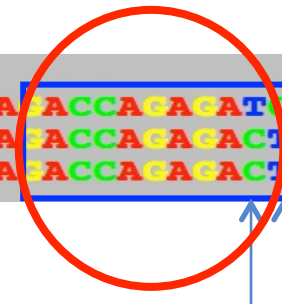
Forward primer: 5'-GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCC.
 Probe 6-FAM-AGCATATTGACGCTGGGA-MGB-BHQ1.
 Reverse primer: 5'-GAGACAGCAGGATCTCTGGTC.

sel=0
 DENV
 ZKVutr
 ZIKVcol

584 Seq:1 Pos:585|290 [DENV]
 AGGACTAGAGGTTATAGGAGACCCCCCGCAAAAC--AAAAAAGCATATTGACGCTGGGA
 AAGSACCAGAGATCCTGCTGTCTCCTCAGC
 CGGACTAGAGGTTATAGGAGACCCCCCGGAAAAACGCAAAACAGCATATTGACGCTGGGA
 AAGSACCAGAGATCCTGCTGTCTCCTCAGC
 CGGACTAGAGGTTATAGGAGACCCCCCGGAAAAACGCAAAACAGCATATTGACGCTGGGA
 AAGSACCAGAGATCCTGCTGTCTCCTCAGC



Região 3'!!!



Huhtamo et al., 2010 - JCV