

Concórdia, SC / Novembro, 2024

OBJETIVOS DE  
DESENVOLVIMENTO  
SUSTENTÁVEL

## Desnaturação da dupla fita de RNA com DMSO aumenta a sensibilidade do diagnóstico molecular de vírus aviários

Daiane Voss-Rech<sup>(1)</sup>, Luizinho Caron<sup>(2)</sup>, Arlei Coldebella<sup>(2)</sup>, Iara Maria Trevisol<sup>(2)</sup>, Paulo Augusto Esteves<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Analista, Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC. <sup>(2)</sup>Pesquisador, Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC.

### Introdução

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, cuja estrutura básica inclui um genoma, um capsídeo proteico e, às vezes, um envelope. O genoma viral pode ser constituído de um único tipo de ácido nucleico: DNA ou RNA, de fita simples (ss) ou dupla (ds), segmentado ou não, circular ou linear. Acredita-se que a forma de cadeia dupla de RNA (dsRNA) seja menos abundante na natureza, mas é um componente crucial de vários sistemas biológicos e serve como material genético de muitos vírus (Wilcox *et al.*, 2019). Vírus dsRNA pertencem às ordens *Ghabrivirales*, *Reovirales*, *Mindivirales* e *Dumnavirales*, além da família *Birnaviridae* (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2022). Vários destes vírus são agentes etiológicos para humanos, animais, plantas e outros microrganismos (Potgieter *et al.*, 2009). Na avicultura, dentre os vírus dsRNA, destacam-se o Reovírus aviário (ARV) (*Orthoreovirus avis*) da família *Spinareoviridae* e o Vírus da Doença Infeciosa da Bursa - IBDV ou vírus da doença de Gumboro (*Avibirnavirus gumborense*), da família *Birnaviridae*.

O ARV é icosaédrico, não envelopado, com genoma composto por 10 fragmentos de RNA dupla fita, com duplo capsídeo e aproximadamente 80 nm de diâmetro. A doença mais comum associada ao reovírus é a artrite viral ou tenossinovite, que ocorre predominantemente em aves jovens, especialmente em frangos de corte. Entretanto, frequentemente

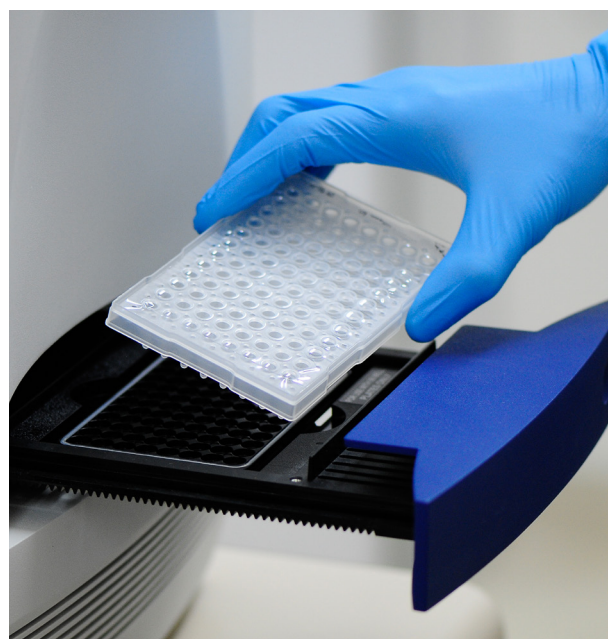


Foto: Jairo Backes

**Figura 1.** Placa com a reação de PCR quantitativa de transcrição reversa (RT-qPCR) no equipamento ABI 7500.

apresenta-se na forma subclínica e causa imunossupressão e desuniformidade de lotes. Clinicamente, manifesta-se por claudicação e inchaços, principalmente das articulações tarsometatarsais e pés,

levando a menor ganho de peso, desuniformidade e condenações ao abate (Brugère-Picoux *et al.*, 2015).

O IBDV apresenta como genoma dois segmentos de RNA dupla fita e capsídeo icosaédrico de 55nm de diâmetro, sendo dividido em 2 sorotipos, do qual apenas o sorotipo I causa doença imunossupressora em aves jovens. A Bursa de Fabricius é o órgão de replicação primária do IBDV, onde causa destruição dos linfócitos B e reduz as funções das células T. A doença em aves pode variar desde a forma subclínica com imunossupressão e pouco ou nenhum sinal clínico até a forma muito virulenta com alta morbidade, e mortalidade superior a 50% do lote. Aves que sobrevivem à doença são permanentemente imunossuprimidas (Brugère-Picoux *et al.*, 2015).

A detecção molecular dos vírus pela reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica de diagnóstico altamente sensível e reprodutível, muito empregada em laboratórios de diagnóstico (Figura 1). A PCR tem como princípio a replicação enzimática de fragmentos de interesse do genoma, por sucessivos ciclos, permitindo a geração de inúmeras cópias da sequência alvo, quando este estiver presente na amostra. No caso dos vírus que possuem RNA como material genético, a enzima utilizada na técnica de detecção (polimerase) não amplifica o RNA diretamente, sendo necessário que o RNA seja inicialmente submetido ao procedimento de transcrição reversa quando será sintetizado o DNA complementar (cDNA). A síntese de cDNA é tipicamente conseguida hibridizando oligonucleotídeos iniciadores (primers) com o RNA viral, utilizando uma enzima (transcriptase reversa) para sintetizar o restante da cadeia de cDNA. Esta etapa da transcrição representa um problema particular para o dsRNA, porque a presença de uma fita complementar pode acabar por bloquear a capacidade de ligação dos iniciadores, afetando a quantidade de dsRNA convertido em cDNA, resultando na geração de uma quantidade muito menor de cópias em relação à verdadeira quantidade de RNA presente na amostra (Potgieter, 2004, Wilcox *et al.*, 2019).

Desta forma, diferentemente dos vírus com genomas de RNA de fita simples, as duas fitas dos vírus dsRNA precisam ser separadas antes do estágio de transcrição reversa para melhorar a eficiência da PCR (Wilcox *et al.*, 2019). Historicamente, isso tem sido feito desnaturando as duplas fitas com elevação da temperatura na presença do solvente sulfóxido de dimetilo (DMSO) ou, quimicamente, com hidróxido de metilmercúrio II (Potgieter, 2004). Entretanto, pela sua toxicidade, as aplicações com mercúrio estão em desuso. O DMSO foi usado com

sucesso para melhorar o desempenho da PCR por transcriptase reversa (RT-PCR) (Qian; Kibenge, 1994; Sidhu *et al.*, 1996), da clonagem (Potgieter, 2004), e do sequenciamento genômico (Wilcox *et al.*, 2019). Contudo, embora seja um procedimento simples e barato, aplicado para dsRNA desde antes dos anos 70, muitos estudos omitem a etapa da desnaturação (Wilcox *et al.*, 2019). Existem dificuldades na execução de métodos moleculares a partir de dsRNA pelo desconhecimento quanto às melhorias obtidas com a desnaturação prévia da dsRNA. Neste trabalho nós comparamos a detecção molecular de dois vírus aviários dsRNA: ARV e IBDV a partir do RNA submetido ou não à desnaturação com DMSO antes da PCR em tempo real por transcriptase reversa (RT-qPCR), com o objetivo de demonstrar e divulgar um procedimento simples que pode facilitar as análises moleculares de diagnóstico de dsRNA.

Este trabalho está relacionado ao Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 2: Acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável.

## Metodologia

### Amostras biológicas

As amostras biológicas utilizadas neste estudo, armazenadas à -70 °C, correspondem a tecidos ou fluidos de frangos de corte, sabidamente positivos para IBDV (n=20) ou ARV (n=20), pertencentes a coleção e trabalho da Virologia de Aves, e/ou cepas pertencentes a Coleção Institucional de Microrganismos de Interesse para a Suinocultura e Avicultura (CMISEA) da Embrapa.

### Extração e desnaturação do RNA viral

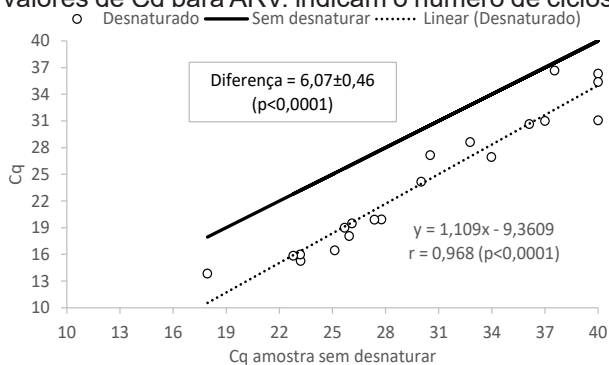
O RNA viral foi obtido a partir de 50 µL da suspensão viral em extrator automático (MagMax™ Express Magnetic Particle Processors, Applied Biosystems, USA) com kit comercial (MagMax™ viral RNA Isolation Kit, Ambion, USA), conforme recomendações do fabricante, e armazenado a -70°C. Alíquotas de 15 µL do RNA extraído foram desnaturadas pela adição de 15% de DMSO, aquecido à 94 °C por 3 min e resfriado a 4 °C por 2 min, em termociclador convencional.

## PCR quantitativa de transcrição reversa (RT-qPCR)

Os RNAs desnaturados foram submetidos à reação em cadeia da polimerase quantitativa de transcrição reversa em tempo real em etapa única (RT-qPCR one step) no equipamento 7500 ABI RT-PCR (Applied Biosystems, USA). Para isso, foi utilizado kit comercial (AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit, Ambion, USA) para os vírus IBDV e ARV. Para a detecção de IBDV, seguimos o protocolo descrito por Okino *et al.* (2019). Para ARV, primers e sonda previamente descritos por Tang e Lu (2016), foram utilizados no mix contendo 6,5 µL de água, 12,5 µL de tampão 2X, 0,5 µL de cada primer e sonda (diluídos para 10mM), 1 µL da enzima e 2 µL do RNA desnaturado, totalizando 25 µL. Para ambos vírus as amostras foram consideradas positivas quando o valor do Ciclo de quantificação (Cq) foi  $\leq 36$ . Os resultados de Cq foram avaliados por meio de teste de correlação entre as amostras desnaturadas e não desnaturadas. As médias dos dois métodos foram comparadas por meio do teste t para dados pareados.

## Resultados

A Figura 2 apresenta a correlação dos valores de Cq para as amostras de RNA de ARV submetidas ou não à desnaturação. Simplificadamente, os valores de Cq para ARV, indicam o número de ciclos



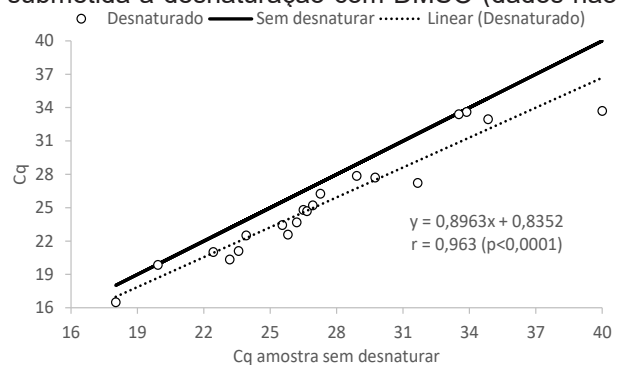
**Figura 2.** Correlação dos valores de Cq para detecção de ARV pela RT-qPCR das amostras submetidas ou não à desnaturação da dsRNA com DMSO.

da qPCR necessários para detectar o RNA alvo na amostra, de modo que quanto menor o Cq maior a carga viral da amostra.

Observa-se que com a desnaturação da dupla fita de RNA, a detecção viral ocorreu em média 6

ciclos antes ( $6,07 \pm 0,46$ ;  $p < 0,0001$ ) da amostra equivalente não desnaturada. Na prática, essa diferença pela ausência da desnaturação prévia da dsRNA, implica na perda de sensibilidade diagnóstica e aumento de amostras falso negativas, especialmente quando a concentração viral for baixa. Quatro das 20 amostras analisadas (20%), que apresentavam menor carga viral, só foram detectadas quando submetidas à desnaturação com DMSO (dados não apresentados), sem essa etapa, teriam sido equivocadamente consideradas negativas. Considerando que a eficiência da RT-qPCR seja alta, como desejável, é esperado que o número de cópias de RNA dobre a cada ciclo, assim, a cada 3,33 ciclos o número de cópias de RNA aumenta 10 vezes, então podemos inferir que o aumento de 6 Cq implica em redução de sensibilidade de aproximadamente 64 vezes. Ou seja, se com a desnaturação é possível detectar 1 cópia do fragmento de RNA viral, sem desnaturar a detecção só é possível a partir de 64 cópias virais, impactando na sensibilidade do ensaio.

A desnaturação com DMSO também melhora a sensibilidade da detecção de IBDV, em média em 2 ciclos ( $2,01 \pm 0,33$ ;  $p < 0,0001$ ), como apresentado na Figura 3. O incremento é menor que aquele observado para ARV, mas ainda é importante e também representa aumento de sensibilidade de detecção para as amostras com baixa carga viral. Uma das amostras testadas (5%) só foi detectada na alíquota submetida a desnaturação com DMSO (dados não



**Figura 3.** Correlação dos valores de Cq para detecção de IBDV pela RT-qPCR das amostras submetidas ou não à desnaturação da dsRNA com DMSO.

apresentados).

Vários modos de ação foram sugeridos para o aprimoramento da PCR através da utilização do DMSO, incluindo o potencial para eliminar ampliações inespecíficas; alteração do perfil de atividade térmica da DNA polimerase; e desestabilização de estruturas secundárias intramoleculares do RNA/DNA alvo, conferindo um anelamento mais eficiente dos primers (Sidhu *et al.*, 1996).

Solventes orgânicos como o DMSO também atuam na desnaturação da dsRNA interferindo nas pontes de hidrogênio que ligam as bases nitrogenadas complementares, desestabilizando a dupla fita e impedindo a formação de novas pontes intramoleculares (Varadaraj *et al.*, 1994). Assim, a desnaturação com DMSO é mais estável, comparada a desnaturação obtida apenas pelo aumento da temperatura, pois as fitas tendem a voltar a parear-se à medida que a temperatura é reduzida.

Estudos têm demonstrado que a presença de DMSO não interfere na detecção de outros DNA/RNA alvo nas amostras (Wilcox *et al.*, 2019), sugerindo que a amostra desnaturada com DMSO também poderia ser utilizada para a pesquisa de outros genomas virais (ssRNA, ssDNA e dsDNA). Em nossa rotina, temos separado uma alíquota do material extraído para desnaturação e pesquisa dos dsRNA e mantido o restante, sem desnaturar, para a pesquisa dos demais vírus, quando aplicável.

É importante destacar que há variações nas concentrações de DMSO e temperaturas de desnaturação descritas na literatura, assim como os resultados obtidos podem variar a depender do protocolo e reagentes usados na transcrição. Dessa forma, é indicado que as condições de desnaturação sejam otimizadas para cada reação a ser padronizada, sempre considerando que a desnaturação eficiente do dsRNA antes da síntese do cDNA pode contribuir para contornar eventuais dificuldades na reprodução de métodos moleculares para dsRNA, incluindo aumento da sensibilidade da detecção molecular pela RT-PCR convencional ou em tempo real.

## Recomendações

A desnaturação do dsRNA antes da etapa da transcrição reversa é altamente recomendada para aumento da sensibilidade do diagnóstico molecular de vírus aviários.

A desnaturação do dsRNA pelo uso de 15% de DMSO a 94 °C por 3 min, seguido de 2 min em gelo,

aumenta a sensibilidade da detecção viral pela RT-qPCR e pode ser o ponto de partida para a otimização das condições ideais aplicáveis a outros protocolos de RT-qPCR.

Embora não tenha sido o escopo deste estudo, a desnaturação com DMSO também é aplicável a outros procedimentos moleculares com dsRNA, que incluam a síntese de cDNA, a exemplo do sequenciamento genômico.

## Agradecimento

Os autores agradecem a valorosa contribuição da assistente Tânia A.P. Klein no apoio técnico laboratorial deste trabalho.

## Referências

- BRUGÈRE-PICOUX, J.; VAILLANCOURT, J. P.; SHIVAPRASAD, H. L.; VENNE, D.; BOUZOUAIA, M. **Manual of Poultry Diseases**. Paris: France Association for the Advancement of Science, 2015. 695 p.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. Disponível em: <https://ictv.global/taxonomy/>. Acesso em: 24 jun. 2024.
- OKINO, C. H.; RECH, D. V.; JAENISCH, F. R. F.; TREVISOL, I. M.; REBELATTO, R.; COLDEBELLA, A.; MORES, M. A. Z.; GIGLIOTI, R.; VAZ, C. S. L. Detecting infectious bursal disease using a VP1 gene-based RT-qPCR assay compared to standard methods of virus isolation, ELISA, and histopathology. **Current Microbiology**, p. 1043–1050, 2020. Doi: 10.1007/s00284-020-01906-7.
- POTGIETER, A. C. **Cloning viral dsRNA genomes: analysis and application**. 2004 Tese (Ph.D. Biochemistry) - North-West University, Potchefstroom Campus, 2004. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10394/334>. Acesso em: 20 jun. 2024.
- POTGIETER, A. C.; PAGE, N. A.; LIEBENBERG, J.; WRIGHT, I. M.; LANDT, O.; VAN DIJK, A. A. Improved strategies for sequence-independent amplification and sequencing of viral double-stranded RNA genomes. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 1423–1432, 2009.
- QIAN, B.; KIBENGE, F. S. B. Observations on polymerase chain reaction amplification of infectious bursal disease virus dsRNA. **Journal of Virological Methods**, v. 47, n. 1–2, p. 237–242, 1994. Doi: 10.1016/0166-0934(94)90081-7.

SIDHU, M. K.; LIAO, M. J.; RASHIDBAIGI, A. Dimethyl sulfoxide improves RNA amplification. **Biotechniques**, v. 21, n. 1, p. 44-47, 1996. Doi: 10.2144/96211bm08.

TANG Y.; LU H. Whole genome alignment based one-step real-time RT-PCR for universal detection of avian orthoreoviruses of chicken, pheasant and turkey origins. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 39, p. 120-126, 2016. Doi: 10.1016/j.meegid.2016.01.018.

VARADARAJ K.; SKINNER D. M. Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. **Gene**, v. 140, p. 1-5, 1994.

WILCOX, A. H.; DELWART, E.; DÍAZ-MUÑOZ, S. L. Next-generation sequencing of dsRNA is greatly improved by treatment with the inexpensive denaturing reagent DMSO. **Microbial Genomics**, v. 5, n. 11, e000315, 2019. Doi: 10.1099/mgen.0.000315.

**Embrapa Suínos e Aves**

Rodovia BR 153 - Km 110  
Caixa Postal 321  
89.715-899, Concórdia, SC  
<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves>  
[www.embrapa.br/fale-conosco/sac](http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac)

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Franco Muller Martins*

Secretário-executivo: *Tânia Maria Biavatti Celant*

Membros: *Clarissa Silveira Luiz Vaz, Catia Silene Klein, Gerson Neudi Scheuermann, Jane de Oliveira Peixoto e Joel Antônio Boff*

**Comunicado Técnico 623**

ISSN 0100-8862  
Novembro, 2024

Revisão de texto: *Jean Carlos Porto Vilas Boas Souza*

Normalização bibliográfica: *Claudia Antunez Arrieche* (CRB-14/880)

Projeto gráfico: *Leandro Sousa Fazio*

Diagramação: *Vivian Fracasso*

Publicação digital: PDF



MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA E  
PECUÁRIA