



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CÂMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS
CURSO DE MEDICINA**

EVANDRO DO NASCIMENTO BARROS

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA A EXTRAÇÃO DE RNA DO VÍRUS
DA DENGUE**

**PALMAS (TO)
2021**

EVANDRO DO NASCIMENTO BARROS

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA A EXTRAÇÃO DE RNA DO VÍRUS
DA DENGUE**

Monografia apresentada ao Curso de Medicina da
Universidade Federal do Tocantins – Câmpus
Universitário de Palmas para a obtenção de título de
graduação.

Orientador: Dr. Horllys Gomes Barreto

PALMAS (TO)
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- B277a Barros, Evandro do Nascimento.
AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA A EXTRAÇÃO DE RNA DO VÍRUS DA DENGUE. / Evandro do Nascimento Barros. – Palmas, TO, 2021.
31 f.

Monografia Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Medicina, 2021.
Orientador: Horllys Gomes Barreto

1. Extração de RNA. 2. Diagnóstico Molecular. 3. RT-qPCR. 4. Flavivirus.
I. Título

CDD 610

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

EVANDRO DO NASCIMENTO BARROS

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA EXTRAÇÃO DE RNA DO VÍRUS DA
DENGUE

Monografia apresentada ao Curso de Medicina da
Universidade Federal do Tocantins – Câmpus
Universitário de Palmas para obtenção de título de
graduação, aprovado em sua forma final pelo Orientador
e pela Banca Examinadora.

Data da Aprovação 07/12/2021

Banca Examinadora:

Horllys Gomes Barreto

Prof. Dr. Horllys Gomes Barreto, Orientador UFT

Horllys Gomes Barreto

Profa. Dra. Gessi Carvalho de Araújo Santos, Examinadora

Horllys Gomes Barreto

Prof. Dr. Victor Rodrigues Nepomuceno, Examinador

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter-me dado o dom da vida e a oportunidade de cursar a graduação com que sempre sonhei, por Seu amor, Sua generosidade e Suas bênçãos recebidas durante a minha vida.

Aos meus pais, Maria Perpetua do Nascimento Barros e Diomar Pereira Barros, por todo o amor, paciência e apoio que me dão em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Renato do Nascimento Barros, Rafael do Nascimento Barros e Joene do Nascimento Barros, por me ajudarem sempre que possível.

Ao meu orientador, Horllys Gomes Barreto, por toda a paciência, força e apoio que sempre me ofertou e pela grande oportunidade que me disponibilizou nos últimos três anos.

A Matheus Martins Daúde, que desenvolveu este trabalho junto comigo, pela ajuda, ensinamentos e direcionamentos durante todo o tempo que passei no Laboratório.

À Universidade Federal do Tocantins e à coordenação do curso de medicina pela oportunidade da realização de um curso de graduação.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação, transmitindo-me conhecimento e experiência tão importantes para a execução da minha profissão.

A todos os meus amigos e colegas da Turma XVIII, pelo companheirismo e amizades nesses últimos 5/6 anos de curso.

Ao CNPq, pela bolsa cedida, durante dois anos, em meus projetos de pesquisa, que deram origem a este trabalho.

À FAPT, Decit/SCTIE/MS, CNPq e SES/TO pelo apoio financeiro destinado ao trabalho por meio do Programa de Pesquisa para o SUS.

Aos meus amigos que, mesmo de longe, sempre me motivavam a continuar e a nunca desistir.

A todos aqueles que de forma direta ou indiretamente me ajudaram.

Agradeço a todos!

RESUMO

O vírus da dengue (DENV) é uma das principais arboviroses responsáveis por uma doença que se assemelha clinicamente à infecção causada por outros vírus, como *zika* e *Chikungunya*, principalmente, na fase inicial dos sintomas, no entanto pode avançar para quadros graves como a febre hemorrágica da dengue (FHD). Diante disso, torna-se importante a realização de testes laboratoriais para auxiliar no diagnóstico da doença. Entre os métodos disponíveis, a RT-qPCR é um método rápido, sensível e altamente específico, que identifica qualquer sorotipo do vírus da dengue, por meio da amplificação do material genético, mas apresenta um alto custo para a sua realização e necessita de um RNA de qualidade para a sua execução. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivos avaliar métodos de extração de RNA e analisar qual deles teria a melhor relação custo/benefício. Foram utilizadas 15 amostras de soro de pacientes com a infecção causada pelo vírus da dengue, com 1(um) ml cada uma. Foram comparados três kits comerciais (*QIAamp*, *Biogene* e *Biopur*). Avaliaram-se a quantidade e a qualidade do RNA extraído com os três métodos estudados, por meio do uso do equipamento *Nanodrop® One Spectrophotometer*. O kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)* foi utilizado, para converter o RNA viral em cDNA, e a detecção foi realizada, por meio do equipamento *7500 fast real-time pcr system (Applied Biosystems)*, em triplicatas técnicas, por meio do uso do kit *Power SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher)*. Todos os métodos permitiram a obtenção de uma concentração média de RNA maior que 100 ng/μl. As relações de pureza A260/A230 e A260/A280 ficaram com valores mais altos que os recomendados, o que provavelmente foi causado pela adição de carreadores de RNA. Em todas as amostras, o vírus da dengue (sorotipo 2) foi detectado, indicando que todos os kits permitiram a extração de RNA viral a partir de amostras de soro. Ao comparar os valores do ciclo de quantificação (Cq) de cada amostra, observou-se que o kit *QIAamp* teve a melhor sensibilidade entre os kits comerciais. Entretanto, ao comparar os custos de cada metodologia utilizada, o kit *QIAamp* teve o maior valor por amostra, sendo 64,3% e 80,2% mais caro que os kits *Biopur* e *BioGene*, respectivamente. Contudo, os métodos avaliados podem ser utilizados para a extração de RNA do vírus da dengue a partir de amostras de soro. O método *QIAamp* permitiu a obtenção de valores de Cqs via RT-qPCR, menores que os outros métodos avaliados, o que pode indicar maior sensibilidade na detecção do alvo, no entanto o método *BioGene* apresentou a melhor relação custo-benefício.

PALAVRAS-CHAVE: Flavivírus. RT-qPCR. Diagnóstico Molecular. Arbovirose

ABSTRACT

Dengue virus (DENV) is one of the main arboviruses, being responsible for a disease that clinically resembles the infection caused by other viruses, such as Zika and Chikungunya, especially during the onset of symptoms, however it can progress to severe stages like the dengue hemorrhagic fever (DHF). Therefore, it is important to carry out laboratory tests to aid in the disease diagnosis. Among the available diagnostic tests, RT-qPCR is a fast, sensitive, and highly specific method, which identifies any DENV serotype through the amplification of its genetic material, though it is expensive and requires high-quality RNA to be performed. In this context, this study aimed to evaluate different RNA extraction methods and analyze which one have the best cost/benefit ratio. Fifteen serum samples, with 1 ml each, from patients with the infection caused by the dengue virus, were used. Three commercial kits (*QIAamp*, *Biogene* and *Biopur*) were compared. The extracted RNA obtained from the three methods under analysis had its quality and quantity assessed by a *Nanodrop® One Espectrophotometer*. The High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) was used to convert the viral RNA into cDNA, and DENV detection was performed using the 7500 fast real-time PCR system (Applied Biosystems), using technical triplicates and the *Power SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher)* kit. All methods generated an average RNA concentration greater than 100 ng/μl. The A_{260}/A_{230} and A_{260}/A_{280} purity ratios were higher than those recommended, what was probably caused by the addition of carrier RNA. The DENV (serotype 2) was detected in all samples, indicating that all tested kits allowed the isolation of viral RNA from the serum samples. The comparison of the cycle of quantification (Cq) values from each sample showed that the *QIAamp* kit displayed the best sensitivity among the tested kits. However, when comparing the cost from each methodology used, the *QIAamp* kit had the highest cost per sample, being 64.3% and 80.2% more expensive than the *Biopur* and *BioGene* kits, respectively. Thus, all tested methods can be used for the isolation DENV from serum samples. The *QIAmp* method allowed the generation of lower Cqs values on the RT-qPCR analysis, when compared to the other RNA isolation methods, suggesting that it may present a higher sensitivity on the target detection, however, the *BioGene* method showed a best cost/benefit ratio.

Keywords: Flavivirus. RT-qPCR. Molecular Diagnosis. Arboviruses

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Detecção via RT-qPCR do vírus da dengue (DENV-2) a partir de amostras de pacientes com suspeita de infecção viral	24
------------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Sequência dos primers utilizadas na detecção do vírus da dengue (DENV-2) via RT-qPCR	20
Tabela 2 -	Quantidade e pureza do RNA total isolado a partir de soro de pacientes com suspeita de infecção viral	22
Tabela 3 -	Valores dos métodos utilizados para a extração do material genético do vírus da dengue (DENV-2)	25

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	09
2	OBJETIVOS.....	12
2.1	Objetivo geral.....	12
2.2	Objetivos específicos.....	12
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1	Agente Etiológico.....	13
3.2	Histórico e Epidemiologia	13
3.3	Quadro Clínico e Tratamento	15
3.4	Diagnóstico Laboratorial	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1	Coleta do material/local de realização.....	19
4.2	Extração de RNA e síntese de cDNA.....	19
4.3	Primers.....	19
4.4	PCR em tempo real (RT-qPCR).....	20
4.5	Relação de Custo/Benefício	20
4.6	Aspectos Éticos	20
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5.1	Extração de RNA	21
5.2	PCR em tempo real (RT-qPCR).....	22
5.3	Relação Custo/Benefício	23
6	CONCLUSÃO.....	25
7	REFERÊNCIAS	26

1. INTRODUÇÃO

O vírus da dengue (DENV) faz parte do gênero *flavivirus* da família *flaviviridae* e é um arbovírus transmitido pelos mosquitos das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (MALAVIGE et al., 2004). Esses mosquitos são os mesmos que transmitem o vírus da Zika (ZIKV) e da Chikungunya (CHIKV), causando infecções nos seres humanos com quadros clínicos semelhantes ao da dengue (MUSSO; GUBLER, 2016). É dividido em quatro sorotipos distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (SIMMONS et al., 2012). Considerada uma doença endêmica no Brasil, é encontrado em todos os sorotipos, no território nacional, tendo variações de incidência de acordo com o estado (FARES et al., 2015).

No mundo, o DENV é a arbovirose que causa uma das infecções virais de maior importância e impacto global (AMBROSE; SEKARAN; AZIZAN, 2017). Estima-se que 3,9 bilhões de pessoas estejam susceptíveis à infecção, sendo 390 milhões de prováveis infecções por ano (BRADY et al., 2012; BHATT et al., 2013). No Brasil, a DENV é considerada endêmica. Os primeiros relatos de doença semelhante à dengue surgiram, em 1845, na cidade do Rio de Janeiro/RJ, no entanto a primeira epidemia, na qual se realizou o isolamento viral, ocorreu em 1981, em Boa Vista/RR (SCHNEIDER; DROLL, 2001). No ano de 2021, até a semana epidemiológica 21, o Brasil já havia registrado 348.508 casos prováveis de dengue, sendo uma taxa de incidência de 164,6 casos por 100 mil habitantes. O estado com a maior incidência foi o Acre com 1526,4 casos/100 mil habitantes. Nesse mesmo período, o estado do Tocantins registrou 1.378 casos suspeitos com uma taxa de incidência de 86,7 casos/100 mil habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

A infecção por DENV pode apresentar um quadro clínico inicial de forma assintomática ou não específica à doença. De forma geral, os sintomas da dengue clássica iniciam por volta do 4º ao 10º dia da picada do mosquito e apresenta-se com febre (podendo chegar a 40°C) cefaleia, dor retro-orbital, mal-estar, dor articular e muscular e náuseas e vômitos, dado que, por volta do 3-4 dias de febre, é que comumente surgem sinais como erupção cutânea (MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017). Diante disso, o diagnóstico de dengue correto, nas fases iniciais dos sintomas, necessita de auxílio, por meio de exames laboratoriais, já que outras arboviroses podem ter apresentação clínica semelhante (como Zika e Chikungunya) (MUSSO; GUBLER, 2016). A confirmação diagnóstica da dengue é importante por causa de formas mais graves dessa infecção. A febre hemorrágica da dengue (FHD) e a doença do choque da dengue são as suas possíveis evoluções que necessitam de

maior acompanhamento e observação clínica. Essas formas evoluem com hemorragias, sangramentos de mucosas, hematêmese e/ou melena, extravasamento vascular, hipotensão, sonolência, hipotermia, aumento repentino do hematócrito e pulso rápido e fino, que indicam sinais de alarme que necessitam de tratamento específico de acordo com os sintomas que vão surgindo (MAIRUHU et al., 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

No Brasil, em razão da presença do ZIKV e do CHIKV, o diagnóstico de dengue necessita de confirmação, por meio de exames laboratoriais, principalmente, na fase inicial da infecção. O isolamento viral, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), os métodos sorológicos e detecção do antígeno NS1 (MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017) são os exames que podem ser utilizados para o diagnóstico. A escolha do exame a ser utilizado varia de acordo com a sensibilidade do método de escolha e o tempo de início dos sintomas. A PCR é o método recomendado pelo Ministério da Saúde até o 5º dia do início dos sintomas por sua alta sensibilidade e especificidade (MINISTERIO DA SAUDE, 2016). O isolamento viral tem uma boa especificidade, mas com a desvantagem de necessitar de sete a 10 dias para que o crescimento viral seja confirmado (PEELING et al., 2010). Os ensaios sorológicos e o antígeno NS1 são bastante utilizados, atualmente, tendo resultados satisfatórios. No entanto, na fase inicial da doença, a sorologia não é indicada, e o antígeno NS1 não indica o sorotipo do vírus causador da infecção (GAIKWAD; SAWANT; SHASTRI, 2017; MANSUY et al., 2018; TSAI et al., 2019).

Com isso, a PCR tem vantagem sobre os outros métodos por ser sensível e específica e não apresentar reatividade cruzada (MANSUY et al., 2018), ser rápida, ter uma janela diagnóstica maior quando comparada com o teste NS1, além de diferenciar o sorotipo do DENV. A principal desvantagem da técnica de PCR é o seu custo maior, quando comparada aos outros métodos. Além do uso de equipamentos sofisticados, o preço dos kits utilizados para as reações é um dos principais fatores para esse valor (PEELING et al., 2010). Em um sistema público de saúde, como o SUS, realizar esse tipo de diagnóstico, para todas as suspeitas, torna-se bastante oneroso. Dessa forma, o método com os melhores resultados e de grande importância epidemiológica na parte da sorotipagem da infecção é pouco utilizado (SANTIAGO et al., 2013).

Dessa forma, a comparação dos kits disponíveis no mercado torna-se fundamental para a diminuição do custo do diagnóstico. Comparando os kits comerciais, pode-se indicar a utilização dos mais baratos possuindo resultados satisfatórios. Vários estudos foram desenvolvidos com o objetivo de comparar métodos de extração de RNA de soro e plasma (CERKOVNIK., 2007; DETTOGNI; LOURO, 2011; SPORNRAFT et al., 2014; LIU et al.,

2015, BERGALLO et al., 2016). Porém, com o surgimento de novos kits comerciais, é importante sempre avaliar a sua qualidade e a sua eficiência, sobretudo, comparados a outros já amplamente utilizados. Por isso, o presente trabalho objetivou comparar métodos (kits) para a extração de RNA do vírus da dengue, visando estabelecer a melhor relação custo/benefício.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar métodos para a extração de RNA do vírus da dengue.

2.2 Objetivos específicos

Comparar quantidade e qualidade de RNA extraído por diferentes métodos a partir de amostras de soro de pacientes infectados com o vírus da dengue.

Analisar a relação custo-benefício dos métodos de extração de RNA viral.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Agente Etiológico

O vírus da dengue (DENV) pertence ao gênero dos *Flavivírus*, que abrange um grande número de espécies. Pode ser chamado de arbovirose por ser transmitido por meio de mosquitos, sendo o *aedes aegypti* e o *aedes albopictus* as principais espécies responsáveis pela propagação da DENV (TELES; PRAZERES; LIMA-FILHO, 2005). Possui quatro sorotipos distintos, mas, antigenicamente semelhantes, denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (GUZMAN et al., 2010). Além do mosquito, os outros hospedeiros naturais do DENV são os primatas, incluindo o ser humano (GUBLER, 1998).

O DENV é um vírus de RNA encapsulado de fita positiva. Portador de um genoma de 11kb de comprimento, é composto por três genes de proteínas estruturais que codificam o nucleocapsídeo ou proteína central (C), um gene para a proteína associada à membrana (M), um gene para a proteína do envelope (E) e sete genes de proteínas não estruturais. A ordem dos genes é 5'-C-prM (M) -E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3', semelhante à de outros flavivírus (CHAMBERS et al., 1990).

3.2 História e Epidemiologia

A primeira epidemia de dengue ainda é fonte de discussão. Apesar de haver relatos de possíveis surtos em Martinica e Guadalupe, em 1665 e, no Panamá, em 1699, fica difícil relacionar a doença registrada com a dengue por falta de um quadro clínico detalhado (SCHNEIDER; DROLL, 2001; DICK et al., 2012). Já a descrição da doença, ocorrida em 1780, na Filadélfia, nos Estados Unidos, é claramente semelhante à dengue clássica (DICK et al., 2012). Nesse mesmo ano, surtos semelhantes também ocorreram, na Ásia e na África, o que indica que o vírus já teria uma distribuição mundial há mais de 200 anos (GUBLER; CLARK, 1995).

No século 19, ocorreu um aumento no número de surtos de dengue registrada nas américas, sendo o Caribe, os Estados Unidos, o Brasil e o Peru os locais de maior número de casos na época. No século 20, outros países, como Argentina, Venezuela e México começam a documentar epidemias de infecção pelo DENV. Em função desse aumento dos casos, a *Pan American Health Organization* (PAHO) iniciou um programa, para a eliminação do *Aedes aegypti* e, no ano de 1958, vários países, incluindo o Brasil,

receberam um certificado de erradicação do mosquito *Aedes aegypti*. No entanto, ainda no século XX, todos esses países voltaram a registrar a presença do mosquito (SCHNEIDER; DROLL, 2001). Diante dessa dificuldade de controle do inseto transmissor do vírus da dengue, a América Central e do Sul ultrapassaram a Ásia, como a região de maior número de casos de dengue no mundo, em meados de 1990 (TEIXEIRA et al., 2009).

No Brasil, o primeiro surto de uma doença semelhante à dengue ocorreu no Rio de Janeiro entre os anos de 1846 e 1848. No século 20, novamente no Rio de Janeiro, uma nova epidemia surgiu, no ano de 1923, retornando o Brasil a registrar novo surto apenas, em 1982, na cidade de Boa Vista em Roraima. Esse surto, ocorrido em Boa Vista, foi o primeiro a registrar o sorotipo 4 da dengue no Brasil, no entanto o principal causador do surto foi o sorotipo 1(um) da dengue. Em 1986, um novo surto ocorreu no Rio de Janeiro, com uma estimativa de 2.000.000 casos, tendo ocorrido o 1º caso de doença semelhante à doença hemorrágica da dengue (DHF) (SCHNEIDER; DROLL, 2001). No entanto, somente em 1990, com a introdução do sorotipo 2 da dengue, no Rio de Janeiro, é que o Brasil começou a confirmar casos de DHF (TEIXEIRA et al., 2005). No início do século XXI, o Brasil tornou-se o país com o maior número de casos registrados de DENV, permanecendo até hoje como um dos países com as maiores incidências da doença (TEIXEIRA et al., 2009).

A razão de o Brasil ter se tornado o país com o maior número de casos se deve a uma soma de fatores. O Brasil é um país extenso com um clima favorável à proliferação dos mosquitos transmissores da dengue. Além disso, as baixas condições socioeconômicas e de infraestrutura, principalmente, em relação ao abastecimento de água e coleta de lixo e esgoto, somados à alta densidade populacional das metrópoles, favorecem a proliferação do *Aedes aegypti*. (GUBLER; CLARK, 1995; TEIXEIRA et al., 2009).

No ano de 2021, até a semana epidemiológica 21, o Brasil já havia registrado 348.506 casos suspeitos de dengue, sendo uma taxa de incidência de 164,6 casos por 100 mil habitantes. Esse número é menor que o registrado no ano de 2020 no mesmo período. Segundo o Ministério da Saúde, o Brasil não enfrenta uma pandemia de dengue, pois os casos estão dentro de uma faixa esperada para o período. A região Centro-Oeste apresenta-se com a maior incidência, com 362 casos/100 mil hab, mesma posição que ocupou no ano de 2020, quando registrou uma taxa de incidência de 1.212,1 casos/100 mil hab. em todo o ano. Logo, em seguida, aparecem a região Sul (207,6 casos/100 mil hab), a região Sudeste (177,7 casos/100 mil hab.), a região Norte (129,3 casos/100 mil hab.) e a região Nordeste (76,2 casos/100 mil hab.) (MINISTÉRIO DA SAUDE, 2021).

No estado do Tocantins, até a semana epidemiológica 42, 6.513 casos suspeitos de dengue foram notificados, correspondendo a um aumento de 26,6% em relação ao mesmo período de 2020. Desses, em 114 casos surgiram sinais de alarme e três óbitos foram confirmados e outros três casos estão em investigação. No total, 112 municípios fizeram notificação de casos suspeitos. Foi constatada a presença de dois sorotipos da dengue, DENV1 e DENV2, visto que o sorotipo 2 foi identificado apenas nas cidades de Araguaína e Colinas (SECRETARIA DE SAÚDE, 2021).

3.3 Quadro Clínico e Tratamento

O espectro de apresentação da infecção pelo DENV varia de uma febre leve a uma doença hemorrágica grave. Após a picada pelo mosquito, pode levar de três a 14 dias para o início dos sintomas (período de incubação) (GUBLER, 98). Em locais, onde há a circulação de outras arboviroses, como *zika* e *chikungunya*, pensar no diagnóstico diferencial a essas outras infecções é importante, pois a apresentação clínica dessas doenças é semelhante (MUSSO; GUBLER, 2016). A dengue clássica é considerada autolimitada e os sintomas podem durar em torno de sete dias, estando presente, na fase inicial, febre, cefaleia, dor retro-orbital, mal-estar, dor articular e muscular, náuseas e vômitos e rash cutâneo. A erupção cutânea aparece por volta do 2º ao 6º dia do início da febre e apresenta-se de forma escarlatiniforme ou maculopapular, iniciando no tronco e migrando, posteriormente, para a face e extremidades (GUBLER, 98). Nos achados laboratoriais, estão presentes trombocitopenia leve à moderada e leucopenia, sendo frequente a elevação dos níveis de aminotransferase hepática de forma moderada. O tratamento é realizado com a administração de medicamentos sintomáticos (SIMMONS et al., 2012).

As formas graves da infecção por DENV são a febre hemorrágica da dengue (FHD) e a síndrome do choque da dengue (DSS). Na DSS e na FHD, ocorre um aumento na permeabilidade vascular, levando ao extravasamento de plasma, para o compartimento extravascular e, em consequência, à hemoconcentração e ao choque. A FHD tem início com sintomas semelhantes com a dengue clássica e se diferencia pelo aparecimento de hemorragias. As hemorragias podem manifestar-se de forma leve à grave, observada por meio de petéquias, sangramento gengival, epistaxe, menorragia e sangramento do trato gastrointestinal. Sem o diagnóstico precoce e a adoção do tratamento, o paciente evolui com choque pela perda sanguínea. Nesse momento, a presença de pulso fraco, aumento do

tempo de enchimento capilar (>2 seg), pele fria e úmida, hipotensão, taquicardia ou bradicardia, taquipneia, oligúria e agitação ou torpor indica a presença de insuficiência circulatória (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). O tratamento dos casos graves de dengue deve ser feito em ambiente hospitalar, consistindo, principalmente, em fluidoterapia, podendo-se utilizar soro Ringer Lactato ou soro fisiológico a 0,9%, oxigenioterapia, se necessário e sintomáticos. Outras medidas, como correção de distúrbios eletrolíticos, administração de vitamina k e transfusões podem ser consideradas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

3.4 Diagnóstico Laboratorial

A infecção por DENV, principalmente em sua fase inicial, pode ser de difícil diagnóstico, por meio do quadro clínico, pelo fato de outras infecções causadas por arboviroses, por exemplo, apresentarem-se com sinais e sintomas semelhantes (MUSSO; GUBLER., 2016). Diante disso, a utilização de exames laboratoriais é essencial para o diagnóstico da doença. Existem quatro tipos de exames laboratoriais para a identificação da infecção pelo vírus da dengue: Isolamento viral; Exame Sorológico; detecção de Antígeno NS1; e PCR (PEELING et al., 2010). Cada método deve ser escolhido, levando em consideração vantagens e desvantagens da técnica e a história da doença. Os métodos de identificação direta (Isolamento viral, detecção do antígeno NS1 e PCR) devem ser realizados, no período inicial de maior viremia da doença, por volta do 2º ao 7º dia de sintomas, enquanto os métodos de identificação indireta (sorológico) necessitam da soroconversão do paciente que ocorre após 5-7 dias do início dos sintomas. (SHU; HUANG, 2004; PEELING et al., 2010)

O isolamento viral foi um método bastante utilizado no passado, mas foi gradativamente substituído pelas outras metodologias (MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017). É um método específico, que permite a identificação do sorotipo e deve ser realizado, na fase aguda da doença, até o 5º dia de início dos sintomas, já que é o momento de maior viremia (VAUGHN et al., 2000; PEELING et al., 2010; LUO et al., 2019). No entanto, para que ocorra o crescimento das linhagens de células, é necessário um tempo de sete a 10 dias, fazendo com que o resultado não esteja disponível ainda na fase aguda da doença (LAI et al., 2007).

Os ensaios sorológicos consistem na detecção de anticorpos IgM ou IgG no sangue do paciente (PEELING et al., 2010). A técnica ELISA (*Enzyme-Linked*

Immunosorbent Assay), um método sorológico bastante utilizado no diagnóstico de dengue, consiste na detecção de um antígeno utilizando um anticorpo marcado com uma enzima (LAI et al., 2007; LIN, 2015). Usualmente, a técnica ELISA não é utilizada, para o diagnóstico na fase aguda da doença, pois os níveis de IgM, imunoglobulina, que indica um contato recente com o vírus, somente estarão detectáveis, a partir do 5º dia de sintomas, e o anticorpo IgG indica uma infecção antiga, sendo detectado de 10-15 dias do início da doença (LAI et al., 2007; PEELING et al., 2010). Os ensaios sorológicos são úteis no rastreio e monitoramento, em momentos de surto, além de serem baratos e fáceis de serem executados (PEELING et al., 2010). Uma das desvantagens da utilização desse método no diagnóstico de dengue, além de não ser indicado na fase aguda da doença, é a maior taxa de reação cruzada com outros flavivírus ou outras arboviroses, como *Chikungunya*, *Zika* e febre amarela, quando comparado às outras metodologias (SHU; HUANG, 2004; PEELING et al., 2010).

A proteína viral NS1 é secretada por células infectadas e é encontrada em níveis elevados ainda na fase aguda, podendo ser detectada até o 9º dia de infecção (LIBRATY et al., 2002; MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017). É uma técnica descrita pela primeira vez por YOUNG, 2000, consistindo na detecção da proteína NS1 utilizando a técnica ELISA. Em consequência de sequestros do NS1 por anticorpos, a detecção do antígeno NS1 é menor e por menos tempo, em infecções secundárias, quando comparado a infecções primárias (MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017). Está sendo utilizado cada vez mais por ter alta sensibilidade e especificidade, principalmente, em infecções primárias (BESSOFF et al., 2008; FARES et al., 2015). Contudo a detecção do antígeno NS1 não é capaz de indicar o sorotipo da infecção pelo DENV (PEELING et al., 2010).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi desenvolvida por Kary Mullis, em 1983 e publicada em 1986 (MULLIS et al., 1986). A PCR vem sendo utilizada cada vez mais, para o diagnóstico de infecção por dengue, por ser considerada um teste rápido, sensível e altamente específico (CHIEN et al., 2006; PRADA-ARISMENDY; CASTELLANOS, 2011; SANTIAGO et al., 2012; MANSUY et al., 2018; TSAI et al., 2019; MUN et al., 2019), tendo vantagens sobre os métodos sorológicos, por ter menos reação cruzada (MANSUY et al., 2018), isolamento viral, por demandar menos tempo na sua realização (PEELING et al., 2010) e detecção do antígeno NS1, por conseguir detectar o sorotipo do vírus da dengue (GAIKWAD; SAWANT; SHASTRI, 2017; TSAI et al., 2019). Para a realização desse método, o soro de pacientes com até cinco dias do início dos sintomas é utilizado, pois é nesse período que ocorre a viremia e, após essa fase, pode

haver níveis baixos do vírus no sangue (PEELING et al., 2010; SIMMONS et al., 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). As desvantagens desse método é a necessidade de um *know how* técnico para a sua realização e o alto custo de sua aplicação, tanto pelo preço dos equipamentos quanto pelo preço dos kits utilizados (PEELING et al., 2010). A etapa de extração de RNA é o primeiro passo, para a aplicação de técnicas moleculares, como a PCR. O kit utilizado nessa etapa necessita ter uma boa confiabilidade e qualidade, pois a obtenção de RNA de qualidade, íntegro e puro, é essencial para o sucesso nas análises por PCR (BECKER et al., 2010). Vários estudos foram desenvolvidos com o objetivo de otimizar, comparar ou diminuir os custos dos kits de extração de RNA de soro ou plasma (CERKOVNIK et al., 2007; DETTOGNI; LOURO, 2011; SPORNRAFT et al., 2014; LIU et al., 2015; BERGALLO et al., 2016), no entanto, com o desenvolvimento de novos kits, torna-se essencial a realização de novas análises.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta de material/local de realização

O material biológico foi cedido pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Tocantins (Lacen-TO), e o experimento foi desenvolvido no Laboratório de Análises Moleculares (LAM-Saúde Humana) da Universidade Federal do Tocantins.

4.2 Extração de RNA e Síntese de cDNA

Foram utilizadas 15 amostras de soro de pacientes com infecção causada pelo vírus da dengue sorotipo 2 (DENV-2). O RNA foi extraído, utilizando três kits comerciais (*BioGene* Extração de DNA/RNA Viral, *QIAamp* Viral RNA Mini Kit e *Biopur* Kit Extração Mini Spin Vírus DNA/RNA), de acordo com as recomendações dos fabricantes. O RNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop® *One Espectrophotometer*). O cDNA foi sintetizado, a partir de 700 ng de RNA total, usando o kit de transcrição *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems*). Após a síntese de cDNA, as amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C.

4.3 Primers

O par de primers, descrito por Santiago et al. (2013) (Tabela 1), foi utilizado para a detecção do vírus da dengue (sorotipo 2/ DENV-2) via RT-qPCR.

Tabela 1 – Sequência dos primers utilizada na detecção do vírus da dengue (DENV-2) via RT-qPCR. Fw = *Primer forward*, Rv = *Primer reverse*.

Vírus	Gene-alvo	Primers 5' – 3'	Tamanho do Amplicon (pb)
DENV-2	Proteína do envelope (E)	Fw: CAGGCTATGGCACYGTCACGAT Rv: CCATYTG CAGC ARCACCATCTC	78

Fonte: Santiago et al. (2013).

4.4 PCR em tempo real (RT-qPCR)

A reação de PCR em Tempo Real foi realizada, utilizando o kit *Power SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher)*, seguindo as instruções do fabricante, havendo alteração somente do volume final da reação. O volume final da reação foi de 10 µL (otimizado) com volume de cDNA fixo em 1 µL por reação. O procedimento de amplificação ocorreu no termociclador modelo ABI PRISM 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems). As condições de ciclagem foram: 95°C por 2 minutos (ativação enzimática), seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 30 segundos (anelamento e extensão). Os dados foram coletados e armazenados no programa 7500 Fast Software (Versão 2.1). Para comparar a qualidade do RNA extraído pelos três métodos estudados, utilizaram-se os valores dos ciclos de quantificação (Cq), que representam o ciclo em que foi iniciada a detecção do alvo via RT-qPCR.

4.5 Relação de Custo/Benefício

Realizou-se um levantamento dos preços dos kits comerciais, utilizados na extração de RNA, com o intuito de verificar qual teria a melhor relação de custo-benefício. Foram utilizados os valores de acordo com as notas fiscais dos kits adquiridos para o estudo.

4.6 Aspectos Éticos

Este trabalho é parte do estudo (CAAE nº 13000819.5.0000.5519) que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Tocantins, conforme parecer nº 4090755.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração de RNA

Os métodos testados permitiram a extração de RNA viral de qualidade e com quantidade suficiente para a realização da detecção via RT-qPCR. Os resultados, apresentados na Tabela 2, demonstraram que todos os métodos de extração possibilitaram uma recuperação de RNA total com uma concentração média maior que 100 ng/ μ L, o que permitiu a padronização da síntese de cDNA com 700 ng para cada amostra estudada.

A quantificação de sequências-alvo, por meio da técnica de RT-qPCR, consiste na detecção e mensuração dos produtos (*amplicons*) no decorrer de cada ciclo da reação de amplificação. Assim, a quantificação baseia-se na medição constante do aumento, no sinal de fluorescência, durante a amplificação, pois o nível de fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de material genético (número de cópias do trecho-alvo) presente em cada ciclo da reação (ARYA et al., 2005; BUSTIN et al., 2005). Diante disso, a padronização da quantidade de material genético utilizado, para cada reação, foi importante, visto que possibilitou a comparação dos valores de C_qs (Ciclos de quantificação) obtidos a partir da utilização do RNA extraído pelos métodos estudados.

Tabela 2 – Quantidade e pureza do RNA isolado a partir de amostras de soro de pacientes com infecção causada pelo vírus da dengue sorotipo 2 (DENV-2).

Métodos	Concentração (ng/ μ L)	A260/A280	A260/A230
<i>BioGene</i>	97,17 \pm 16,98	3,30 \pm 0,05	3,02 \pm 0,27
<i>Biopur</i>	127,72 \pm 22,21	3,23 \pm 0,08	2,35 \pm 0,37
<i>QIAamp</i>	101,23 \pm 9,71	3,2 \pm 0,04	2,33 \pm 0,53

Representação das médias aritméticas e variações-padrão dos resultados obtidos com o Nanodrop.

Fonte: Dados da pesquisa (Autor)

A espectrofotometria é uma técnica que permite medir a quantidade e a pureza do RNA de uma amostra. O seu funcionamento baseia-se na absorbância quando a amostra é exposta a uma certa faixa de luz ultravioleta. A capacidade de absorbância da luz ultravioleta do RNA é máxima a 260nm, com isso, os registros realizados nessa faixa indicam a quantidade de ácidos nucleicos. Já o aumento da absorbância a 280nm e 230nm indicam, respectivamente, a presença de proteínas e compostos fenólicos e sais (FARREL, 2005).

Portanto a relação A260/A280 indica o nível de contaminação por proteínas e a relação A260/A230 indica o nível de contaminação por compostos fenólicos na amostra (MORET et al., 2013). O resultado da relação A260/A280, para as amostras extraídas com os métodos estudados, foi considerado satisfatório, pois variou, em média, de 3,2 (*QIAamp*) a 3,30 (*BioGene*). Quanto à relação A260/A230, os valores também ficaram dentro de uma faixa esperada, sendo a mais baixa obtida pelo método *QIAamp* (2,33) e a mais alta pelo método *BioGene* (3,02).

Na literatura, em geral, são indicados valores de pureza (A260/A280 e 260/230) entre 1,8 e 2,2, já que amostras que estão entre esse intervalo são consideradas puras, ou seja, com pequenas quantidades de contaminantes que podem interferir na atividade da DNA polimerase (LOGEMANN; SCHELL; WILLMITZER, 1987; MANNING, 1991). No entanto há trabalhos que indicam que kits de extração, que utilizam carreadores de RNA, tendem a apresentar valores de pureza (A260/A280 e 260/230) mais altos, pois, com seu uso, é possível recuperar maior concentração de material genético durante o processo (KILDEMO, 2012; MORET et al., 2013).

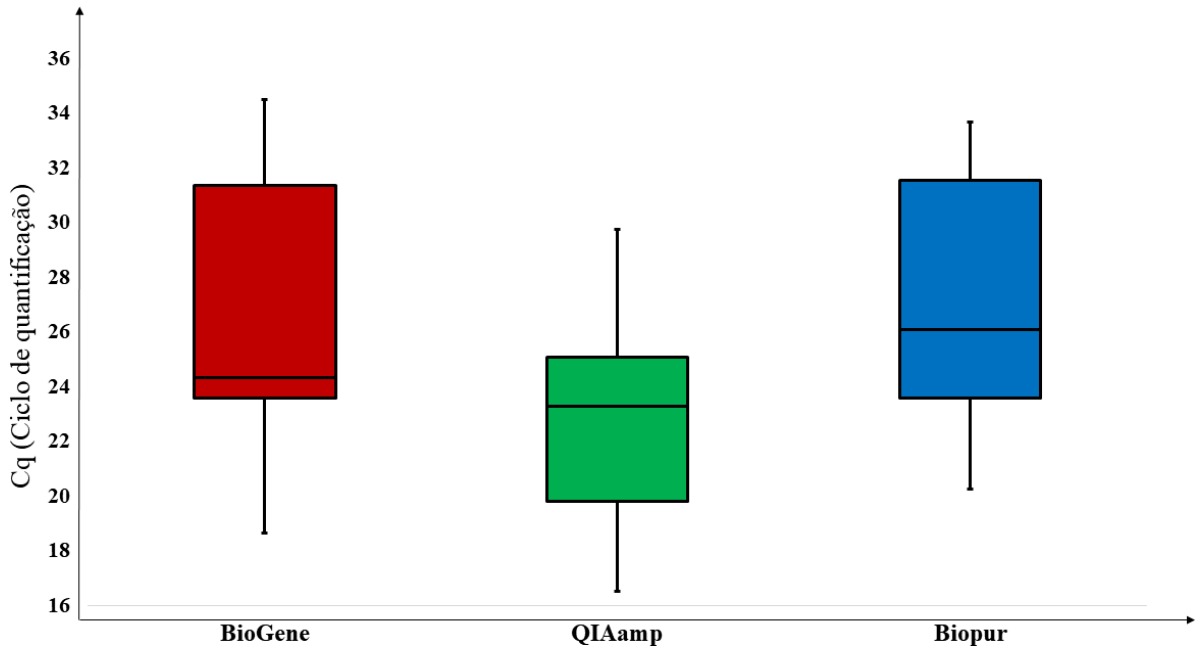
5.2 PCR em tempo Real (RT-qPCR)

A RT-qPCR permitiu a detecção do vírus da dengue sorotipo 2 (DENV-2), em todas as amostras analisadas, no presente estudo (Figura 1). Diante disso, os três métodos de extração podem ser considerados eficazes à recuperação de RNA viral a partir de amostras de soro. Ao avaliar os valores de Cqs, obtidos via RT-qPCR de amostras extraídas pelos métodos *BioGene*, *QIAamp* e *Biopur*, verifica-se que o método *QIAamp* permitiu a obtenção de valores de Cqs menores que os outros métodos avaliados, o que pode indicar maior sensibilidade na detecção do alvo, geralmente, relacionada à quantidade e qualidade de RNA.

O limite de detecção viral dos ensaios de RT-qPCR, para o diagnóstico da dengue, é determinado, a fim de permitir a classificação entre as amostras positivas ou negativas, ou seja, a partir de um valor de Cq definido, é possível estabelecer se houve a amplificação do RNA viral ou não. Esses ensaios podem apresentar limites de detecção diferentes, mas comumente apresentam valores de Cq máximo entre 37 e 40 (ALM et al., 2014; ALM et al., 2015; SIMMONS et al., 2016). Dessa forma, em amostras, nas quais o Cqs obtido no diagnóstico estão próximos ao limite de detecção, o kit de extração escolhido poderia influenciar no resultado do teste, já que, como visto nos resultados apresentados (Figura 1),

mesmo padronizando a quantidade de RNA inicial, há variações de C_q s médios, quando se utilizam métodos de extrações diferentes.

Figura 1 – Detecção via RT-qPCR do vírus da dengue (DENV-2) a partir de amostras de pacientes com infecção viral. Para a comparação dos métodos de extração comerciais (*BioGene*, *QIAamp* e *Biopur*), foram utilizadas 15 amostras de soro.



Fonte: Dados da pesquisa (Autor)

Nesse contexto, a comparação entre os valores de C_q s obtidos, para os três métodos utilizados, torna-se ainda mais importante, pois pode indicar qual método apresentou o RNA de maior qualidade e poderia ser utilizado, sobretudo, em amostras com carga viral baixa.

5.3 Relação Custo/Benefício

A análise de custo dos métodos (kits) comerciais (Tabela 3) permitiu aferir o custo real por extração (amostra) e indicar qual método apresenta o melhor custo-benefício. O método *QIAamp* apresentou o maior valor por amostra (R\$ 32,44), sendo 64,3% e 80,2% mais caro que os métodos *Biopur* e *BioGene*, respectivamente. Com isso, observa-se que o método (*QIAamp*), que permitiu a obtenção dos melhores valores de C_q s, é também o de maior custo.

Assim, o método *Biogene* (R\$ 18,00) foi o que apresentou a melhor relação custo-benefício. Essa é uma análise importante, considerando que existem laboratórios que analisam uma quantidade elevada de amostras por ano, como é o caso dos Laboratórios Centrais de Saúde Pública, do Sistema Único de Saúde (SUS), visto que é possível aumentar o número de testes, com o mesmo valor investido.

Tabela 3. Valores dos métodos utilizados para a extração do material genético do vírus da dengue (DENV-2).

Métodos	Valor para extração de 50 amostras (R\$)	Valor (R\$) por amostra
<i>BioGene</i>	900,00	18,00
<i>Biopur</i>	987,24	19,74
<i>QIAamp</i>	1.622,00	32,44

Fonte: Dados da pesquisa (Autor)

6. CONCLUSÃO

Os métodos avaliados podem ser utilizados para a extração de RNA do vírus da dengue a partir de amostras de soro. O método *QIAamp* permitiu a obtenção de valores de Cqs via RT-qPCR, menores que os outros métodos avaliados, o que pode indicar maior sensibilidade na detecção do alvo, no entanto o método *BioGene* apresentou a melhor relação custo-benefício.

7. REFERÊNCIAS

- ALM, E. et al. Universal single-probe RT-PCR assay for diagnosis of dengue virus infections. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 12, p. e3416, 2014.
- ALM, E. et al. One-step real-time RT-PCR assays for serotyping dengue virus in clinical samples. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 493, 2015.
- AMBROSE, Jason; SEKARAN, Shamala Devi; AZIZAN, Azliyati. Dengue virus NS1 protein as a diagnostic marker: commercially available ELISA and comparison to qRT-PCR and serological diagnostic assays currently used by the state of Florida. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2017, 2017.
- ARYA, Manit et al. Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 5, n. 2, p. 209-219, 2005.
- BHATT, Samir et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496 n. 7446 p. 504-507, 2013.
- BECKER, Christiane, et al. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. **Methods**, v. 50, n.4, pp. 237-243, 2010.
- BERGALLO, Massimiliano, et al. Comparison of two available RNA extraction protocols for microRNA amplification in serum samples. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 30, n. 4, pp 277-283, 2016.
- BESSOFF, Kovi, et al. Comparison of two commercially available dengue virus (DENV) NS1 capture enzyme-linked immunosorbent assays using a single clinical sample for diagnosis of acute DENV infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 10, pp. 1513-1518, 2008.
- BRADY, Oliver J. et al. Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, p. e1760, 2012.
- BUSTIN, Stephen. A. et al. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 597-601, 2005.
- CERKOVNIK, Petra et al. Optimization of an RNA isolation procedure from plasma samples. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 20, n. 3, pp. 293-300, 2007.
- CHAMBERS, Thomas J. et al.. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, n. 1, pp. 649-688, 1990.
- CHIEN, Li J. et al. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 4, pp. 1295-1304, 2006.
- DETTOGNI, Raquel S; e LOURO, Iúri D. Dengue virus RNA purification from human plasma: a comparison of two techniques. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 8, pp. 4979-4983, 2011.

DICK, Olivia B. et al. The history of dengue outbreaks in the Americas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 4, pp. 584-593, 2012.

FARES, Rafaelle C. G. et al. Epidemiological scenario of dengue in Brazil. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

FARREL, Robert E. Jr. Quality Control for RNA Preparations. In: FARREL, Robert E. Jr. **RNA Methodologies**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p. 163-178.

GAIKWAD, S.; SAWANT, S. S.; SHASTRI, J. S. Comparison of nonstructural protein-1 antigen detection by rapid and enzyme-linked immunosorbent assay test and its correlation with polymerase chain reaction for early diagnosis of dengue. **Journal Of Laboratory Physicians**, v. 9, n. 03, pp. 177-181, 2017.

GUBLER, Duane J.; CLARK, Gary G. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. **Emerging infectious diseases**, v. 1, n. 2, p. 55, 1995.

GUBLER, Duane J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUZMAN, Maria G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 12, pp. S7-S16, 2010.

KILDEMO, H. **RNA expression in sperm as markers of sperm-quality**. 2012. 73p. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) - Universidade de Oslo, Oslo, 2012.

LAI, Yee-Ling et al. Cost-effective real-time reverse transcriptase PCR (RT-PCR) to screen for Dengue virus followed by rapid single-tube multiplex RT-PCR for serotyping of the virus. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 3, p. 935-941, 2007.

LIBRATY, Daniel H et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 8, pp. 1165-1168, 2002.

LIN, Alice V. Direct ELISA. In **ELISA** (pp. 61-67). Humana Press, New York, NY, 2015.

LOGEMANN, J.; SCHELL, J.; WILLMITZER, L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. **Analytical biochemistry**, v. 163, n. 1, p. 16-20, 1987.

LUO, Robert et al. Rapid diagnostic tests for determining dengue serostatus: a systematic review and key informant interviews. **Clinical Microbiology and Infection**, 2019.

MAIRUHU, Albert T. A. et al. Dengue: an arthropod-borne disease of global importance. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, n. 6, pp. 425-433, 2004.

MALAVIGE, Gathsaurie N. et al. Dengue viral infections. **Postgraduate Medical Journal**, v. 80, n. 948, pp. 588-601, 2004.

MANNING, K. Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation. **Analytical biochemistry**, v. 195, n. 1, p. 45-50, 1991.

MANSUY, Jean-Michel et al. Detection of Zika, dengue and chikungunya viruses using single-reaction multiplex real-time RT-PCR. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 92, n. 4, p. 284-287, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança. **Brasília: Ministério da Saúde**, 5. ed, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 21, 2021. **Brasília: Ministério da Saúde**, v. 52, n. 51, pp. 1-11, 2021.

MORET, I. et al. Assessing an improved protocol for plasma microRNA extraction. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e82753, 2013.

MULLER, D. A.; DEPELSENAIRE, A. C.; YOUNG, P. R. Clinical and laboratory diagnosis of dengue virus infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 215(suppl_2), pp. S89-S95, 2017.

MULLIS, Kary et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**, p. 263-273, 1986.

MUN, Myung-Jin et al. One-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of dengue virus. **Molecular and cellular probes**, v. 43, p. 86-91, 2019.

MUSSO, Didier; GUBLER, Duane J. Zika virus. **Clinical microbiology reviews**, v. 29, n. 3, p. 487-524, 2016.

PEELING, Rosanna W. et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 12supp, p. S30, 2010.

PRADA-ARISMENDY, J.; CASTELLANOS, J. E. Real time PCR. Application in dengue studies. **Colombia Médica**, v. 42, n. 2, pp. 243-258, 2011.

SANTIAGO, Gilberto A. et al. Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 7, p. e2311, 2013.

SCHNEIDER, J. M. P. H. A timeline for dengue in the Americas to December 31, 2000 and noted first occurrences. **The History of Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) in the Region of the Americas, 1635-2001**, 2001.

SECRETARIA DE SAÚDE (TO). SUPERINTENDÊNCIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue até a semana epidemiológica 42, 2021. **Palmas, Secretaria de Saúde**, 2021.

SHU, Pei-Yun; HUANG, Jyh-Hsiung. Current advances in dengue diagnosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 11, n. 4, p. 642-650, 2004.

SIMMONS, Cameron P. et al. Dengue. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 15, p. 1423-1432, 2012.

SIMMONS, M. et al. Development and validation of a quantitative, one-step, multiplex, real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of dengue and chikungunya viruses. **Journal of clinical microbiology**, v. 54, n. 7, p. 1766-1773, 2016.

SPORNRAFT, M. et al. Optimization of extraction of circulating RNAs from plasma—enabling small RNA sequencing. **PLoS One**, v. 9, n. 9, e107259, 2014.

TEIXEIRA, Maria D. G. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences?. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, pp. 1307-1315, 2005.

TEIXEIRA, Maria Glória et al. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cadernos de saúde pública**, v. 25, p. S7-S18, 2009.

TELES, F. R. R.; PRAZERES, D. M. F.; LIMA-FILHO, J. L. Trends in dengue diagnosis. **Reviews in medical virology**, v. 15, n. 5, p. 287-302, 2005.

TSAI, Jih-Jin et al. An RT-PCR panel for rapid serotyping of dengue virus serotypes 1 to 4 in human serum and mosquito on a field-deployable PCR system. **PloS one**, v. 14, n. 3, p. e0214328, 2019.

VAUGHN, D. W. et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. The **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, pp. 2-9, 2000.

YOUNG, P. R. et al. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, pp. 1053-1057, 2000.