



Detecção de RNA de flavivírus em PBMCs sob armazenamento subótimo: implicações para diagnóstico molecular

Detection of flavivirus RNA in PBMCs under suboptimal storage conditions: implications for molecular diagnosis

Rafaela Bergamini Resende Silveira¹ , Arielle Teixeira Silva¹ , Mariana Rodrigues Ferreira¹ , Emanuelle Fossali de Abreu¹ , Sandro Henrique de Jesus² , Renata Rezende Carvalho³ , Erica Azevedo Costa³ , Sabrynna Brito Oliveira¹ 

¹ Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil. 

² Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, MG, Brasil. 

³ Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil. 

*Autor de correspondência/Corresponding author: rafaela.bergaminirss@gmail.com

Recebido/Received: 28.01.2026

Aceito/Accepted: 06.05.2026

Publicação/Publication: 30.06.2026

Editor Chefe/Editor-in-chief: Adriana Bugno

RESUMO

Flavivírus são arboviroses de diagnóstico desafiador devido à similaridade clínica e à instabilidade do RNA viral, podendo associar-se às células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Este estudo avaliou a detectabilidade do RNA de flavivírus em PBMCs de amostras armazenadas em condições subótimas. Foram analisadas 170 amostras de sangue em EDTA, todas negativas na imunocromatografia para dengue, mantidas a 4 °C por até três meses. Após extração, o RNA viral foi analisado por qPCR panflavivírus, com detecção em 6% das amostras, evidenciando que o RNA pode permanecer detectável mesmo em condições adversas, com potencial impacto diagnóstico e epidemiológico.

Palavras-chave. Flavivírus, Técnicas de Diagnóstico Molecular, Armazenamento de Sangue, RNA Viral.

ABSTRACT

Flaviviruses are arboviruses that are challenging to diagnose due to clinical similarity and the instability of viral RNA; they may be associated with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). This study evaluated the detectability of flavivirus RNA in PBMCs from samples stored under suboptimal conditions. A total of 170 EDTA-treated blood samples, all negative for dengue by immunochromatography, stored at 4 °C for up to three months, were analyzed. Following extraction, viral RNA was analyzed by pan-flavivirus qPCR, with detection in 6% of the samples, demonstrating that RNA can remain detectable even under adverse conditions, with potential diagnostic and epidemiological implications.

Keywords. Flavivirus, Molecular Diagnostic Techniques, Blood Banking, Viral RNA.

Os flavivírus são vírus de RNA fita simples de polaridade positiva, pertencentes à família *Flaviviridae*, responsáveis por arboviroses, como dengue, zika e febre amarela, amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais¹. No Brasil, essas infecções representam um desafio para a saúde pública, com aumento de casos de dengue nos últimos anos, incluindo mais de 6,2 milhões de casos prováveis em 2024².

Durante a infecção, flavivírus podem interagir e replicar-se em diferentes células do hospedeiro, incluindo células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), como linfócitos e monócitos, considerados alvos relevantes para estudos de detecção molecular³. A literatura indica que o RNA viral pode permanecer associado a essas células mesmo após a fase aguda da infecção, ampliando a janela diagnóstica em comparação ao soro⁴. Apesar das recomendações de armazenamento de amostras biológicas sob condições controladas, como a -80 °C para preservação da integridade celular e do RNA viral⁵, na prática laboratorial e em estudos retrospectivos é comum a existência de amostras submetidas a condições subótimas, caracterizadas por armazenamento em temperaturas inadequadas (como 2 a 8 °C), períodos prolongados de estocagem, ciclos de congelamento e descongelamento e variações térmicas durante transporte e manipulação⁵.

Nesse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a detectabilidade do RNA de flavivírus associados às PBMCs isoladas de amostras sanguíneas armazenadas sob condições subótimas.

Em maio de 2024 foram obtidas 171 amostras de sangue em EDTA de pacientes com suspeita de arboviroses, entre o 2º e o 5º dia do início dos sintomas, coletadas em um hospital infantil em Belo Horizonte, Minas Gerais, a critério médico. Nessa unidade de saúde, foi realizado teste imunocromatográfico para detecção do antígeno NS1 (dengue) e as informações sobre início dos sintomas e data de coleta foram obtidas a partir dos registros clínicos associados às amostras. Foram incluídas amostras com volume suficiente para separação celular (acima de 500 µL) e identificação adequada que garantisse a rastreabilidade dos dados, sendo excluídas aquelas com hemólise acentuada, histórico de congelamento prévio, ausência de identificação ou data de coleta.

As amostras de sangue total foram mantidas a 4 °C no hospital desde a coleta até sua transferência para a PUC Minas, onde permaneceram sob refrigeração por um período de até três meses antes do processamento. Após a tabulação, foi realizada a centrifugação e o isolamento das PBMCs por gradiente de densidade. As PBMCs isoladas foram então armazenadas a -20 °C por até três meses, quando foram submetidas à extração de RNA e análise molecular.

Posteriormente, no Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal, na Universidade Federal de Minas Gerais (LPVA/UFMG), o RNA viral foi extraído utilizando o QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) e submetido a RT-qPCR, conforme instruções do fabricante. Embora o *kit* seja originalmente desenvolvido para extração de RNA viral a partir de fluidos biológicos, sua utilização neste estudo incluiu a lise das amostras celulares para recuperação de RNA viral livre ou intracelular. Foram incluídos controles negativos (PBMCs de indivíduos saudáveis) e positivos (vírus dengue purificado) ao longo do processo para monitoramento do procedimento.

Para triagem molecular foi adotada estratégia de *pooling*, na qual cinco amostras foram agrupadas por *pool* conforme a ordem de coleta, utilizando 2 µL de RNA de cada amostra, totalizando 34 *pools* analisados. Essa estratégia foi empregada com o objetivo de otimizar o uso de reagentes e viabilizar a triagem inicial de mais amostras. Não foi realizada testagem individual posterior das amostras pertencentes aos *pools* positivos, de modo que a detecção foi considerada em nível de *pool*.

A detecção molecular foi realizada por RT-qPCR utilizando iniciadores panflavivírus direcionados à região altamente conservada do gene NS5, responsável pela codificação da RNA-polimerase viral (**Tabela**). As reações foram conduzidas com o sistema SuperScript III One-Step RT-qPCR System (Thermo Fisher Scientific), que contém transcriptase reversa e DNA polimerase Taq em um único *mix* enzimático (one-step RT-qPCR). Cada reação apresentou volume final de 12,5 µL contendo 10 µL do *mix* panflavivírus (6,5 µL tampão 1X; 0,5 µL de três iniciadores flavivírus – 300 nM; 0,5 µL sonda P1; 0,05 µL sondas P2 e P3 – 100 nM cada; 0,25 µL Taq DNA polimerase; 0,25 µL corante fluorescente; 1,5 µL água livre de nucleases)⁶ e 2,5 µL de RNA viral.

Tabela. Sequência dos iniciadores e sondas utilizados na qPCR para detecção de flavivírus

Sequência de iniciadores ou sondas	Sequência
Iniciadores	
Flavi all S	TACAACATgATggggAARAgAgARAA
Flavi all S2	TACAACATgATgggMAAACgYgARAA
Flavi all S4	gTgTCCCAGCCNgCKgTRTCRTC
Sondas	
Flavi all probe 1	FAM-AARggHAgYMgNgCCA + TH + T + g + g + T-BBQ
Flavi all probe 2	FAM-Tg + gTWYATgTggYTNg + gRgC-BBQ
Flavi all probe 3 mix	FAM-Tg + gTWYATgT + ggYTNg + gRgC-BBQ ^a
	FAM-CCgTgCCATATggTATATgTggCTgggAgC-BBQ ^b
	FAM-TTTCTggAATTTgAAgCCCTgggTTT-BBQ ^c

Legenda: ^aFlavi all probe, ^bFlavi probe YFV, ^cFlavi probe DEN4. Flavi all: iniciador direcionado a todos os Flavivírus. Probe: sonda.
Fonte: Adaptado de Patel et al⁶

A amplificação e detecção foram realizadas no QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific), com transcrição reversa a 50 °C por 30 minutos, ativação enzimática a 95 °C por 2 minutos e 45 ciclos de amplificação (95 °C por 15 s e 60 °C por 30 s), com aquisição de fluorescência ao final de cada ciclo^{6,7}. Amplificações com Ct ≤ 35 ciclos foram consideradas positivas para a presença de RNA viral, de acordo com critérios amplamente utilizados em ensaios de RT-qPCR para detecção de arbovírus⁷.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) n° 78391524.9.0000.5137, emitido em 22 de março de 2024, seguindo as normas éticas estabelecidas pelo Ministério da Saúde.

O hospital enviou 171 amostras, das quais 170 atenderam aos critérios de inclusão, resultando na exclusão de uma amostra (ID 91) durante o processamento inicial, ou seja, da separação do PBMC. Todas as amostras elegíveis apresentaram resultados imunocromatográficos negativos para o antígeno NS1 de dengue. As amostras foram provenientes de pacientes entre 1 e 15 anos de idade, de ambos os sexos, residentes em Belo Horizonte e região metropolitana. Os pacientes apresentavam início dos sintomas entre 2º e 5º dias e as amostras foram coletadas dentro desse mesmo período após o início do quadro clínico. As

170 amostras foram subdivididas em grupos de *pools*, com cinco unidades em cada e identificados pelos números de 1 a 34. O diagnóstico molecular foi realizado em duplicata, empregando cada *pool* como matriz para a reação.

Observou-se a detecção do material genético nos *pools* 20 e 26 (6%), com CT 14 e 15, respectivamente. As reações foram realizadas em duplicata, apresentando reprodutibilidade entre os ensaios. As curvas de amplificação dos *pools* positivos apresentaram perfil sigmoidal bem definido, com cruzamento consistente do limiar de detecção (*threshold*), enquanto as amostras negativas permaneceram restritas ao ruído basal, sem evidência de amplificação exponencial ao longo dos ciclos.

Para interpretar os achados deste estudo, é importante considerar as características estruturais do RNA dos flavivírus e sua dinâmica de replicação. O RNA viral apresenta maior suscetibilidade à degradação quando comparado ao DNA, devido à presença da hidroxila na posição 2' da ribose e à natureza de fita simples, embora estruturas como o Cap tipo I e a região 3'UTR, além do RNA dos flavivírus ser de fita simples, junto com os fatores citados, torna-o mais instável e frágil à degradação¹.

No caso do vírus da hepatite B, por exemplo, seu RNA permanece íntegro por até 48 horas quando mantido sob refrigeração a 4 °C⁸, enquanto o RNA presente em sangue total permanece estável por aproximadamente 32 horas entre 4 °C e 7 °C. Nesse contexto, os resultados encontrados neste estudo mostram-se particularmente relevantes, pois, apesar da fragilidade intrínseca da molécula de RNA frente à degradação, o material genético viral foi detectado associado aos PBMC mesmo após armazenamento de até três meses, um intervalo superior ao relatado em pesquisas anteriores⁵.

Os valores de Ct observados (14 e 15) foram relativamente baixos, mesmo considerando as condições de armazenamento descritas. Esse achado pode refletir uma elevada carga viral inicial nas amostras analisadas, uma vez que a coleta ocorreu entre o 2º e o 5º dia de sintomas, período associado a maior viremia. Adicionalmente, a estratégia de *pooling* pode ter contribuído para esse resultado, visto que a presença de uma única amostra com alta carga viral em um *pool* pode resultar em valores de Ct reduzidos.

Assim, uma possível explicação para a detectabilidade do material genético viral pode estar relacionada ao fato de que o RNA viral associado às PBMCs possa estar parcialmente protegido de diferentes mecanismos de clivagem. Nessas células, o RNA pode permanecer no interior de partículas virais imaturas ou de vesículas intracelulares e extracelulares, como endossomos, corpos multivesiculares e exossomos, que o isolam das RNases presentes no sangue⁹.

As PBMCs expressam proteínas de ligação ao RNA (RBPs), como HuR, YBX1 e DDX, que estabilizam moléculas de RNA de fita simples e participam do empacotamento e da montagem do RNA viral, contribuindo para sua integridade¹⁰. Esses mecanismos, aliados ao ambiente intracelular menos rico em RNases, podem explicar a preservação do RNA viral. Assim, o RNA detectado pode estar associado a partículas virais parcialmente maduras, vesículas extracelulares ou complexos ribonucleoproteicos derivados da interação entre flavivírus e células mononucleares¹⁰.

Esse achado sugere possíveis interações entre o vírus e as células hospedeiras que podem contribuir para a manutenção do RNA detectável em PBMCs, mesmo sob condições subótimas de armazenamento^{3,5}. Vale ressaltar que a detecção do material genético não implica necessariamente em infectividade viral, mas a detectabilidade relatada no estudo sugere interações vírus-hospedeiro mais complexas do que as previamente descritas para os flavivírus^{9,10}.

Como limitação deste estudo, destaca-se a impossibilidade de correlacionar a positividade observada com a evolução dos sintomas e outros dados clínicos, uma vez que essas informações foram baseadas no relato dos responsáveis, podendo não refletir com precisão o início do quadro clínico, introduzindo viés de mensuração. Não foi realizada quantificação prévia das PBMCs nem do RNA extraído, implicando em não normalização do *input* entre as amostras. Essa condição pode resultar em contribuição desigual de material genético entre as amostras individuais dentro de cada *pool*. Além disso, o *pooling* pode reduzir a sensibilidade da detecção molecular devido à diluição do RNA presente em amostras com baixa carga viral, o que deve ser considerado na interpretação dos resultados.

Adicionalmente, não foram incluídas amostras controle armazenadas sob condições ideais de conservação, o que permitiria comparações robustas entre diferentes condições de armazenamento. Ademais, não foi realizado o sequenciamento genético dos *pools* positivos, o que possibilitaria a identificação de outras arboviroses presentes nas amostras.

Este estudo configura-se como uma evidência inicial (“*proof-of-concept*”) da detectabilidade do RNA de flavivírus em PBMCs mesmo sob condições subótimas de armazenamento. Estudos futuros com maior número de amostras, inclusão de controles sob condições ideais de armazenamento e padronização temporal das análises poderão aumentar a sensibilidade e aplicabilidade da abordagem descrita, contribuindo na ampliação da janela diagnóstica, segurança no transporte de amostras, ações de vigilância epidemiológica e respostas a surtos virais. Entretanto, a ausência de identificação específica dos flavivírus detectados, devido à não realização de sequenciamento genético, limita a interpretação dos achados quanto à diversidade viral presente nas amostras. Torna-se essencial aprofundar a investigação sobre os mecanismos pelos quais os arbovírus podem permanecer detectáveis associados às PBMCs, mesmo diante de variações ambientais. A compreensão desses processos e sua aplicação em cenários clínicos e de campo, pode abrir caminhos para novos protocolos de diagnóstico, principalmente em municípios com infraestrutura limitada.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

A pesquisa foi contemplada pelo PIBIC/PIBIT 2024 – CNPq (edital 2024, projeto número 31579), com uma bolsa de pesquisa para graduação em edital.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Rafaela Bergamini Resende Silveira e Arielle Teixeira Silva: realização do experimento, escrita e revisão do manuscrito. Mariana Rodrigues Ferreira: análise e escrita dos resultados. Emanuelle Fossali de Abreu: realização do experimento. Sandro Henrique de Jesus: coleta das amostras. Renata Rezende Carvalho: realização da extração do RNA e da RT-qPCR. Erica Azevedo Costa: desenho do experimento e revisão do manuscrito. Sabrynna Brito Oliveira: orientação do projeto, desenho do experimento e revisão do manuscrito. Todos os autores aprovaram a versão final do manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV. Family: *Flaviviridae*: Genus: *Orthoflavivirus*. Distinguishing features. 2025. [acesso 2025 Jun 30]. Disponível em: <https://ictv.global/report/chapter/flaviviridae/flaviviridae/orthoflavivirus>
2. Brasil. DATASUS. Doenças e agravos de notificação – 2007 em diante (SINAN). Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2025. [acesso 2025 Nov 04]. Disponível em: <https://datasus.saude.gov.br/acesso-a-informacao/doencas-e-agravos-de-notificacao-de-2007-em-diante-sinan/>
3. Wang WK, Sung TL, Tsai YC, Kao CL, Chang SM, King CC. Detection of dengue virus replication in peripheral blood mononuclear cells from dengue virus type 2–infected patients by a reverse transcription-real-time PCR assay. J Clin Microbiol. 2002;40(12):4472-78. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.12.4472-4478.2002>
4. Messias CV, Lemos JP, Cunha DP, Vasconcelos Z, Raphael LMS, Bonaldo MC et al. Zika virus infects human blood mononuclear cells. BMC Infect Dis. 2019;19:986. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4622-y>
5. Huang LH, Lin PH, Tsai KW, Wang LJ, Huang YH, Kuo HC et al. The effects of storage temperature and duration of blood samples on DNA and RNA qualities. PLoS One. 2017;12(9):e0184692. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184692>
6. Patel P, Landt O, Kaiser M, Faye O, Koppe T, Lass U et al. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. Virol J. 2013;10:58. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-58>
7. Centers for Disease Control and Prevention – CDC. Molecular tests for dengue virus. Atlanta: CDC, 2025. [acesso 2026 Mar 15]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dengue/hcp/diagnosis-testing/molecular-tests-for-dengue-virus.html>
8. Ohlendorf V, Bremer B, Sandmann L, Mix C, Tergast T, Cornberg M et al. Limited stability of hepatitis B virus RNA in plasma and serum. Sci Rep. 2024;14:27128. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77329-2>
9. Martínez-Rojas PP, Monroy-Martínez V, Ruiz-Ordaz BH. Role of extracellular vesicles in the pathogenesis of mosquito-borne flaviviruses that impact public health. J Biomed Sci. 2025;32:4. <https://doi.org/10.1186/s12929-024-01096-5>
10. Diosa-Toro M, Prasanth KR, Bradrick SS, Blanco MAG. Role of RNA-binding proteins during the late stages of flavivirus replication cycle. Virol J. 2020;17:60. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01329-7>