

Parte I. Protocolos otimizados para detecção do SARS-CoV-2

1. Introdução

A técnica de reação de cadeia da polimerase em tempo real com transcrição reversa (RT-qPCR) é a técnica considerada padrão ouro pela Organização Mundial da Saúde para a detecção do novo coronavírus (SARS-CoV-2) causador da COVID-19. A detecção é realizada através da presença de ácidos nucleicos do patógeno pelo uso de primers e sondas (oligonucleotídeos marcados com fluorescência) específicos para cada alvo molecular.

2. Finalidade

Apresentar duas estratégias para testagem em massa para detecção do novo coronavírus: *pooling test* e multiplex. As abordagens são para o teste molecular em amostras swab de naso e orofaringe de uma população de acordo com sua taxa de prevalência da doença.

3. Coleta

A coleta e transporte do material deve ser realizada seguindo o protocolo *Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens for COVID-19* do *Center for Disease Control and Prevention* - CDC (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/guidelines-clinical-specimens.html>).

4. Estratégia de *pooling test*

No *pooling test*, as amostras são misturadas e testadas como um *pool*, ou seja, em um único teste. Para os *pools* com resultado positivos, as amostras são testadas individualmente para a confirmação do diagnóstico daquele indivíduo. A escolha do melhor *pool* dependerá da taxa de prevalência da população (ANEXO I).

Tabela 1. Relação *pool* e taxa de prevalência de positivos na população

Taxa de prevalência	Pools sugeridos
1%	8 - 12 - 16
5%	4 - 8
7,5%	4
10%	4

4.1 Preparo de amostra

- Descartar os swabs dos tubos de coleta.
- Transferir o meio de cultivo da amostra para armazenagem em um tubo tipo eppendorf de 1,5 mL (Alíquota-estoque).
- Transferir o volume adequado de amostra para um novo tubo do tipo eppendorf de 1,5 mL para extração do RNA.
- O *pool* deve ser montado com quantidades igualmente representativas de cada amostra de modo que o volume final atenda à recomendação do protocolo de extração de RNA a ser utilizado. Vide exemplo a seguir para um volume final de 300 µL:

Tabela 2. Exemplos de volumes para a realização de diferentes *pools* considerando o volume final de 300 µL

Pool (N° de amostra)	Volume de cada amostra (µL)	Volume final (µL)
2	150	300 µL
4	75	
8	37,5	

- Para mais detalhes vide ANEXO II.

- Transferir o volume necessário do *pool* recém-preparado para a etapa de extração do RNA.

4.2 Extração do RNA viral

A extração do RNA viral pode ser realizada seguindo diferentes protocolos: extração por Trizol, kit de extração manual por coluna ou kit de extração por *beads* magnéticas.

4.3 RT-qPCR

Após o preparo de amostra, segue-se para a etapa de RT-qPCR. Podem ser utilizados diferentes protocolos de análise para a detecção do material viral utilizando a abordagem *pooling test*.

4.4 Interpretação dos Resultados

Validação dos resultados

- Controle negativo: Em caso de amplificação no controle negativo os resultados das amostras devem ser descartados e uma nova reação feita com novos reagentes.

- Controle positivo viral: O resultado esperado do controle positivo viral é a detecção de amplificação (sinal de fluorescência detectável acima do *threshold*). Em caso, de não amplificação no controle positivo os resultados devem ser descartados e uma nova reação feita com novos reagentes.

- Controle positivo gene humano: O resultado esperado deste controle é a detecção de amplificação (sinal de fluorescência detectável acima do *threshold*). Porém, os resultados só devem ser descartados caso não ocorra a detecção de amplificação para os alvos virais das amostras.

Classificação dos resultados

De acordo com os critérios de classificação de resultados adotados em cada protocolo de RT-qPCR, os resultados dos *pools* deverão ser avaliados conforme recomendação (Tabela 3).

Tabela 3. Interpretação dos resultados da testagem utilizando pools de amostra

Resultado do protocolo	Recomendação
Positivo	Seguir para etapa de análise exploratória (item 4.5)
Indeterminado	Seguir para etapa de análise exploratória (item 4.5)
Negativo	Todos os pacientes do <i>pool</i> são negativos

4.5 Análise exploratória

A análise exploratória, ou abertura do *pool*, consiste na identificação do paciente positivo dentro de um determinado *pool*.

Na abertura no *pool*, a alíquota-estoque de cada paciente presente no *pool* deve ser analisada **individualmente** seguindo o mesmo protocolo.

Deste modo, a principal vantagem do *pool* é o aumento da capacidade produtiva em uma testagem em massa. Essa estratégia permite a emissão dos resultados negativos mais rapidamente, com alto grau de confiança.

5. Estratégia de Multiplex

O protocolo do CDC recomenda que para validação do resultado de uma amostra sejam realizadas 3 diferentes reações, em diferentes poços na placa de análise.

No multiplex, as reações utilizando três diferentes alvos (Exemplo: Gene N1, Gene E e RNase P) são combinadas e realizadas em um único poço da placa de PCR.

Essa estratégia pode ser combinada com a estratégia de *pooling test*.

5.1 RT-qPCR

Preparo da mistura reacional

- Combinar os genes-alvos e fluoróforos de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4. Combinações de genes-alvo para o multiplex

Gene-alvo	Fluoróforo
N1 (SARS-Cov-2)	FAM
E (SARS-Cov-2)	Cy5
RP (controle interno)	HEX

- Para descritivo dos primers e sondas vide ANEXO III.

- Para realização de **UMA** reação, alíquotar em cada poço de análise os volumes de reagentes descritos na Tabela 5 (protocolo adaptado de *qRT-PCR Brilliant III Probe Master Mix - Agilent Technologies*).

Tabela 5. Preparação do *mix* reacional

	Reagente	Volume (µL)	Concentração final
	2X QRT-PCR Master Mix	10	1x
N1-FAM	Sonda	0,04	200 nM
	Primer <i>forward</i>	0,08	400 nM
	Primer <i>reverse</i>	0,08	400 nM
E-Cy5	Sonda	0,04	200 nM
	Primer <i>forward</i>	0,08	400 nM
	Primer <i>reverse</i>	0,08	400 nM
RNase P-HEX	Sonda	0,04	200 nM
	Primer <i>forward</i>	0,08	400 nM
	Primer <i>reverse</i>	0,08	400 nM
	DTT 100mM	0,2	1 mM
	Dye de referência (diluído 1:500)*	0,3	300 nM
	RT/RNase Block	1,0	-
	H ₂ O DEPC	2,9	-

*Verificar a diluição do Dye de referência de acordo com o protocolo do equipamento e do Master Mix utilizado.

- Considerar um poço para o controle positivo e outro para o negativo na placa de análise.
- Aliquotar 5 µL de RNA de amostra de paciente previamente extraída em seus respectivos poços de análise.
- No poço referente ao controle negativo são aplicados 5 µL de água DEPC.
- No poço referente ao controle positivo são aplicados 5 µL do controle de RNA viral sintético ou extraído a partir de um vírus isolado.
- Centrifugar a placa por 30 segundos.

Etapa de ciclagem

- Configurar o *software* do equipamento de acordo com o desenho da placa estabelecido (posição das amostras, controle positivo e controle negativo).
- Configurar as fluorescências para cada canal conforme descrito na Tabela 6.
- Iniciar a etapa de ciclagem, como descrito na tabela 6:

Tabela 6. Parâmetros de ciclagem da reação de PCR

Etapa	N° de ciclos	Temp.	Duração
RT-PCR	1	50°C	10 minutos
	1	95°C	3 minutos
Anelamento	45	95°C	3 segundos
Extensão		53°C	30 segundos

5.1 Interpretação dos Resultados

- Os parâmetros de análise para todas as combinações de primers e sondas foi adotado: *threshold* igual a $\Delta Rn = 0,01$; *baseline* inicial igual a 5 e *baseline* final igual a 15.
- A partir do número de Ct, os resultados devem ser classificados segundo a Tabela 7.

Tabela 7. Critérios de classificação

Resultado	Alvo 1	Alvo 2	RP	CP	CN
Detectável	+	+	+/-	+	-
Inconclusivo*	+	-	+/-	+	-
	-	+	+/-	+	-
Não detectável	-	-	+	+	-
Inválido	-	-	-**	+	-
	+/-	+/-	+/-	-***	+/-
	+/-	+/-	+/-	+/-	+***

(+) Amplificações com Ct<40; (-) Genes não amplificados ou amplificações com 40<Ct<45. RP: RNase P; CP: controle positivo; CN: controle negativo

*Os resultados classificados como inconclusivos devem ter a coleta repetida dentro de 3 dias.
 **Para inválidos por não detecção da RNase P deve ser repetida a extração e o RT-qPCR.
 ***Para inválidos pelos controles positivos ou negativos deve ser repetida a reação de RT-qPCR.

6. Cuidados & Precauções

- A manipulação de amostras deve ser feita por profissional especializado e portando todos os EPIs necessários (máscara

- N95, touca, pró-pé, jaleco descartável, óculos de segurança e *face shield*).
- A manipulação de amostras envolve risco biológico e deve ocorrer em cabine de segurança biológica e ambiente de nível de biossegurança II (NB2) ou superior.
- Realizar a manipulação de amostra com extremo cuidado de modo a evitar a formação de aerossóis.
- Todos os materiais plásticos devem ser livres de RNase/DNase. Todas as ponteiras utilizadas devem ter filtro.
- A área de preparo e extração de amostras deve ser separada da área de PCR para evitar contaminação.
- Todo o material biológico, bem como os EPIs utilizados devem ser descartados em lixo especial de resíduo biológico e devem ser autoclavados antes do descarte final.

Parte II. Validação dos protocolos

1. Objetivo

Descrever a metodologia utilizada para a validação da otimização de ambas abordagens, *pooling test* e multiplex, para a detecção do novo coronavírus.

2. Material & Equipamento

Extração do RNA

Instrumento	Kit de extração	N° de catálogo
Maxwell RSC	Maxwell RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit	AS1330

Master Mix

Reagente	N° de catálogo
qRT-PCR Brilliant III Probe Master Mix	600884 600885

Primers e Sondas

- Ver ANEXO III

Controle positivo

O controle positivo utilizado foi o RNA extraído de um vírus isolado.

Equipamentos & Consumíveis

- Vortex mixer
- Microcentrífuga
- Micropipetas (10 µL, 200 µL e 1000 µL)
- Pipeta multicanal (5-50 µL)
- Ponteiras com filtro para aerossol
- Microtubos para centrífuga de 1,5 mL (livre de DNase/RNase)
- Racks para microtubos para centrífuga de 1,5 mL
- Equipamento de extração Maxwell RSC (cat n°: AS4500)
- Termobloco
- Água para biologia molecular, livre de RNase
- Placas para PCR de 0,2 mL com 96 poços
- Equipamento Quant Studio5 ThermoScientific

3. Estratégia de *pooling test*

3.1 Preparo do *pool*

- Para validação, cada *pool* foi preparado utilizando uma positiva, combinada com amostras negativas. Todas as amostras foram previamente testadas.

- Foram utilizadas 21 amostras.

- Também foi utilizada uma amostra de vírus isolado diluída em diferentes *pools*.

- Foram avaliados *pools* de 4, 8, 16 e 32.

3.2 Extração de RNA

- Extraíu-se as amostras de acordo com o protocolo manufaturado Promega (*Purification of Viral RNA from Universal Transport Medium for Virus with the Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit*).

Observação: Também foi validado o preparo do *pool* após a etapa da extração de RNA. Ou seja, cada amostra foi submetida a etapa de extração de RNA individualmente, seguido do preparo do *pool* e análise por RT-qPCR.

3.3 Reação do RT-qPCR

- Na validação, aplicou-se o protocolo CDC para etapa de RT-qPCR.

3.4 Resultados

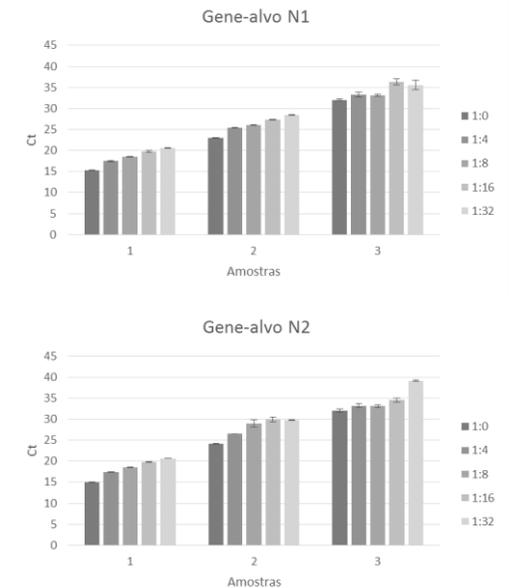


Figura 1. Resultado da detecção de SARS-CoV-2 utilizando a abordagem *pooling test* com amostras previamente caracterizadas por RT-qPCR utilizando dois genes, N1 e N2, como alvo.

4. Estratégia de Multiplex

4.1 Preparo da amostra

- Para validação, foram utilizadas 21 amostras positivas, previamente testadas.
- Também foi utilizada uma amostra de vírus isolado diluída.

4.2 Extração de RNA

- Extraíu-se as amostras de acordo com o protocolo manufaturado Promega (*Purification of Viral RNA from Universal Transport Medium for Virus with the Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit*).

4.3 Reação do RT-qPCR

- A etapa de RT-qPCR seguiu a metodologia descrita na Parte I, item 5, deste protocolo.

4.4 Resultado

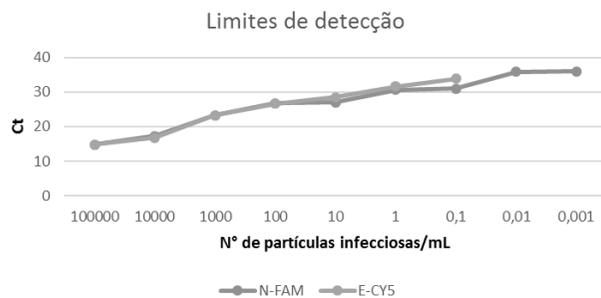


Figura 2. Limites de detecção dos primers e sondas testados isoladamente com vírus isolado

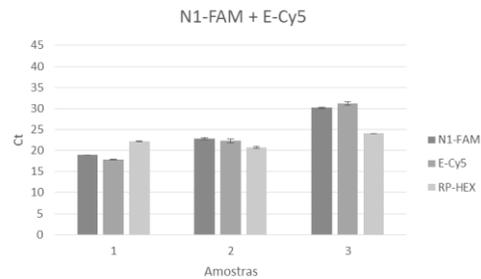


Figura 3. Resultado da detecção de SARS-CoV-2 utilizando a abordagem multiplex com amostras previamente caracterizadas por RT-qPCR utilizando os genes N1 e E como alvos.

5. Referências

CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real Time- RT PCR Diagnostic Panel. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/134922/download>

Corman *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020, 25 (3).

Manual de segurança biológica em laboratórios. Organização Mundial da Saúde, 3ª edição. Genebra, 2004.

Real Time PCR for the detection of SARS-CoV-2. Robert Koch Institut. Disponível em: https://www.rki.de/EN/Home/homepage_node.html

6. Equipe

Instituto Senai de Inovação em Química Verde - Firjan

Antonio Augusto Fidalgo Neto
Sergio Noboru Kuriyama
Alex Queiroz de Souza
Isadora Alonso Correa
Leon de França Nascimento
Tamires de Souza Rodrigues
Thiago Wolff

Centro de Pesquisas Leopoldo Américo Miguez de Melo - CENPES/Petrobrás

André Luis de Nicolo Concatto
Gerência de Fluidos, Cimentação e Estimulação

Rubens Nobumoto Akamine
Gerência de Biotecnologia

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Luciana Jesus da Costa
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes

Anexos

Anexo I

Economia do teste (%) ao adotar a abordagem de pooling test para diferentes taxas de prevalências do novo coronavírus

Tamanho do pool	Prevalência do SARS-CoV-2			
	1,00%	5,00%	7,50%	10,00%
2	48,01%	40,25%	35,56%	31,00%
4	71,06%	56,45%	48,21%	40,61%
8	79,77%	53,84%	41,10%	30,55%
12	80,31%	45,70%	30,90%	19,91%
16	78,90%	37,76%	22,48%	12,28%
20	76,79%	30,85%	16,03%	7,16%
24	74,40%	25,03%	11,23%	3,81%
28	71,90%	20,21%	7,70%	1,66%
32	69,37%	16,25%	5,13%	0,31%

Anexo II

Preparo do *pool* de amostras de pacientes

- Definir quais pacientes estarão em cada *pool*, conforme indicado no exemplo abaixo:

Identificação do pool	Amostra 1
	Amostra 2
	Amostra 3
	Amostra 4

- Separar o tubo de amostra-estoque de cada paciente para o preparo do pool.
- Abrir o tubo da primeira amostra, transferir o volume adequado para o tubo do tipo eppendorf do *pool* e fechar o tubo da primeira amostra.
- Descartar a ponteira utilizada.
- Limpar a pipeta com álcool etílico 70%.
- Limpar a luva com álcool etílico 70%.
- Seguir para o tubo da próxima amostra, repetindo o procedimento descrito acima até completar o *pool* planejado.

Anexo III

Primers

Alvo	Primer	Sequência 5' - 3'	Qtde
Gene E	Gene E_sarbeco_F1	ACA GGT ACG TTA ATA GTT AAT AGC GT	100mM
	Gene E_sarbeco_R2	ATA TTG CAG CAG TAC GCA CAC A	100mM
Gene N1	2019-nCoV_N1_F	GAC CCC AAA ATC AGC GAA AT	100mM
	2019-nCoV_N1_R	TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG	100mM
RNase P	hRNaseP6_R	GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT	100mM
	hRNaseP6_F	AGA TTT GGA CCT GCG AGC	100mM

Sondas

Alvo	Sonda	Sequência 5' - 3'	Fluoróforo	Quencher	Qtde
Gene E	E_sarbeco_P2	ACA CTA GCC ATC CTT ACT GCG CTT CG	Cy5	Iowa Black	250mM
Gene N1	2019-nCoV_N1_P	ACC CCG CAT TAC GTT TGG TGG ACC	FAM	Iowa Black	250mM
RNase P	hRNaseP6_P	TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG	HEX	Iowa Black	250mM