



TÍTULO Protocolo de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de RNA de SARS-CoV-2

Elaborado por: Marcelo Henrique Fernandes Ottoni - Téc. de Laboratório em Biologia - CIPq-Saúde - UFVJM

Revisado por: Thyago José Silva – Técnico administrativo/Farmacêutico – FAMED - UFVJM

Aprovado por: Daniel Campos Villela – Professor/Pesquisador – FAMED - UFVJM

1. OBJETIVO

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

3. CONDIÇÕES GERAIS

4. MATERIAIS E REAGENTES

5. PROCEDIMENTOS

6. RESPONSABILIDADES

7. REFERÊNCIAS

1. OBJETIVO

Este protocolo tem a finalidade de fornecer as informações necessárias para a realização do ensaio de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) em amostras de RNA viral purificado.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este protocolo aplica-se a detecção de RNA viral pela técnica de RT-PCR.

3. CONDIÇÕES GERAIS

- Antes de iniciar este protocolo, garanta que os tampões e reagentes estejam em temperatura ambiente;
- A enzima GoScript™ for 1-Step RT-qPCR deverá ser mantida sempre em gelo;
- Sempre descontaminar a capela de fluxo com álcool 70% e 15 minutos de luz UV antes iniciar os trabalhos. Lembre-se sempre de trabalhar com o fluxo ligado;
- Em todas as etapas deste POP, tomar o **máximo de cuidado** para evitar **contaminações** entre as amostras e controles.

4. MATERIAIS/EQUIPAMENTOS E REAGENTES

4.1 MATERIAIS/EQUIPAMENTOS

- Avental, máscaras e luvas sem talco;
- Capela de fluxo laminar
- Pipetas automáticas;
- Ponteiras com filtro;
- Ponteiras sem filtro;
- Tubos tipo eppendorf de 1,5 mL livres de DNase e RNase;
- Caixa de isopor com gelo;
- Placas de 48 ou 96 poços, strips ou tubos individuais para PCR;
- Filme selador de placa;
- Dispositivo para vedar a placa com o filme;
- Cobertura para strip (Cap strip);
- Termociclador para RT-PCR.

4.2 REAGENTES

- Água livre de DNase e RNase;
- Mix de sonda e *Primer* para fragmento gênico N1 de SARS-CoV-2;



- Mix de sonda e *Primer* para fragmento gênico N2 de SARS-CoV-2;
- Mix de sonda e *Primer* para RNase P (RP): *Primer* para gene humano constitutivo. Usado como controle endógeno nos testes;
- GoTaq® qPCR Master Mix, 2X (Promega);
- GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR (Promega);

5. PROCEDIMENTOS

Preparo do mix para PCR

5.1 Na capela de fluxo limpa, colocar as alíquotas previamente diluídas dos primers/sondas N1, N2 e RNase P, o GoTaq® qPCR Master Mix, 2X em temperatura ambiente e a enzima GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR em gelo;

5.2 Aguardar os reagentes descongelarem antes do uso;

5.3 Garanta que os reagentes citados acima estejam homogêneos, invertendo os tubos 5 vezes;

5.4 Rotule 3 eppendorfs de 1,5 ml como para cada *mix*: N1, N2 e RNase P (RP);

5.5 Determine o número de reações (**R**) a serem feitas por ensaio. É necessário fazer volumes em excesso de *mix* de reação para a testagem do controle positivo (CP) e do controle negativo (CN). Use o seguinte guia para determinar o número de reações:

- Se o número de amostras (**n**) e controles somados for de 1 a 14, então $R = n + 1$;
- Se o número de amostras (**n**) e controles somados for 15 ou mais, então $R = n + 2$;

5.6 Para cada conjunto de *primers* (N1, N2 e RNase P), calcule a quantidade de cada reagente a ser adicionado separadamente para cada mistura de reação ($R =$ número de reações);

Tabela 1: Preparação do master mix para cada *primer*.

Reagente	Volume por Reação	Volume para o total de reações (R)
Água livre RNase	3,1 µl	R x 3,1 µl
<i>Primer</i> /sonda	1,5 µl	R x 1,5 µl
GoTaq® qPCR Master Mix, 2X	10,0 µl	R x 10,0 µl
Enzima (GO®Taq)	0,4 µl	R x 0,4 µl
Volume total	15 µl	R x 15 µl

5.7 Após distribuir os reagentes (formando então o **mix p/ PCR**) misturá-los através de homogeneização com a pipeta (up-down) com movimentos suaves.

Obs.: Não vortexar!

5.8 Fazer descer as gotas presas nas paredes e tampa dos tubos usando as mãos. Evite centrifugar nesta etapa.



Preparo dos tubos, strips ou placa

5.9 Encaixe a placa em uma rack e os tubos contendo *mix* para PCR em gelo.

Obs.: Evite tocar nos poços da placa. Sempre a manuseie tocando em suas laterais.

5.10 Dispensar 15 µl dos *mix* para PCR (N1, N2 e RNase P) como proposto na Tabela 2;

Tabela 2: Adição do mix de PCR em uma placa de 48 poços.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	N1							
B	N2							
C	RP							
D	N1							
E	N2							
F	RP							

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	N1							
B	N2							
C	RP							
D	N1							
E	N2							
F	RP							

5.11 Antes de passar para a área de manipulação de ácidos nucleicos, prepare reações de controle negativo, apenas com água livre de DNase e RNase.

5.12 Pipete 5 µl de água livre de DNase e RNase nos poços do controle negativo (CN) (Tabela 3, coluna 1).

Tabela 3: Organização das amostras e controles na placa.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	CN	A1	A2	A3	A4	A5	A6	CP
B	CN	A1	A2	A3	A4	A5	A6	CP
C	CN	A1	A2	A3	A4	A5	A6	
D								
E								
F								

CN: Controle negativo; A: amostra; RP: Controle positivo (plasmídeo com material genético do SARS-CoV-2 diluído). **Obs.:** No poço C8 não há adição de plasmídeo.

5.13 Cubra a placa da reação e mova-a para a área de manuseio das amostras de RNA (Área 3).



Adição das amostras de RNA dos pacientes

5.14 Agite os tubos com RNA purificado dos pacientes manualmente;

5.15 Remova as gotas da parede do eppendorf com um movimento vigoroso;

5.16 Mantenha os tubos em gelo;

5.17 Pipetar cuidadosamente **5 µl** das amostras nos poços ou tubos conforme a tabela 3.

Obs.: Cuidado! Evite contaminações cruzadas entre os poços.

5.18 Pipete **5 µl** da alíquota de plasmídeo com $2,0 \times 10^3$ cópias nos poços do controle positivo (CP) (tabela 3).

Obs.: Cuidado! Evite contaminações cruzadas entre os poços.

Condições de termociclagem

Transcrição reversa: 45 °C – 15min (1x)

Inativação da transcriptase reversa e ativação da GO@Taq DNA-polimerase: 95 °C – 2min (1x)

Desnaturação: 95 °C – 15s

Anelamento e extensão: 60 °C – 1min } (40x)

6. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

O seguinte algoritmo deve ser utilizado para avaliar os resultados da sonda TaqMan:

Positivo: valor de CT (para N1 e N2) < 37 e valor de Rn lido na placa 2x maior que o valor médio dos poços CN.

Indeterminado: valor de CT (para N1 e N2) < 37 e valor de Rn lido na placa menor do que 2x o valor médio dos poços CN.

Negativo: valor de CT (para N1 e N2) > 37 e valor Rn lido na placa menor do que 2x o valor médio dos poços CN.

Todas as amostras positivas e ambíguas são repetidas com um segundo conjunto de primers/sonda para confirmação.

Falha na leitura do gene humano constitutivo (RP) em gerar um resultado positivo invalida toda a execução. Se for somente em uma amostra, esta deverá ser repetida.

Um resultado positivo em qualquer um dos controles negativos invalida toda execução.

A falha no controle positivo em gerar um resultado positivo também invalida toda execução.

Uma amostra é considerada positiva somente se um resultado positivo for obtido com os dois conjuntos de primers/sonda.



7. RESPONSABILIDADES

É responsabilidade do técnico de laboratório, pesquisador, analista clínico a execução deste POP.

8. Referências:

(1) **CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel.** Division of Viral Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2020. Disponível em <https://www.fda.gov/media/134922/download>, acesso em 27/03/2020.