



# DESENVOLVIMENTO DE ENSAIOS LABORATORIAIS INTERNOS PARA DETECÇÃO MOLECULAR DA SARS-COV-2

# ÍNDICE

<b>Reconhecimentos</b> .....	<b>3</b>	<b>Prevenção da contaminação da PCR</b> .....	<b>22</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>4</b>	<b>Medida de incerteza para ensaios moleculares de SARS-CoV-2</b> .....	<b>22</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>5</b>	Fontes pré-analíticas de incerteza .....	22
<b>Objectivo e âmbito</b> .....	<b>6</b>	Fontes analíticas de incerteza .....	23
<b>SARS-CoV-2</b> .....	<b>6</b>	<b>Garantia de qualidade para testes de PCR</b> .....	<b>23</b>
<b>Introdução a PCR / PCR-RT</b> .....	<b>7</b>	Indicadores de qualidade .....	24
Ensaio qualitativos vs. quantitativos .....	7	<b>Conclusão</b> .....	<b>25</b>
<b>Métodos de extracção de RNA viral</b> .....	<b>8</b>	<b>Citações</b> .....	<b>26</b>
<b>Concepção do protocolo de PCR</b> .....	<b>10</b>	<b>Apêndices</b> .....	<b>27</b>
Considerações de recursos no desenvolvimento de ensaios internos .....	10	<b>Apêndice 1:</b>	
Requisitos de equipamento no desenvolvimento do ensaio .....	10	Seleção de kits de extracção de RNA e sistemas automatizados .....	28
Visão geral do processo de concepção do ensaio .....	11	<b>Apêndice 2:</b>	
Concepção de iniciadores e de sondas .....	11	Equipamento Mínimo Requerido .....	29
Concepção de iniciadores .....	11	<b>Apêndice 3:</b>	
Concepção de sondas de hibridização / hidrólise .....	12	Selecione os fabricantes de sistemas de PCR-RT em tempo real .....	30
Sugestões para a selecção de iniciadores e de sondas .....	13	<b>Apêndice 4:</b>	
Componentes adicionais da transcrição reversa e das reacções em cadeia da polimerase .....	13	Selecione os conceptores e sintectizadores de iniciadores e de sondas .....	31
Enzimas .....	14	<b>Apêndice 5:</b>	
Sugestões para a selecção de enzimas .....	15	Selecione Fornecedores de Master Mix .....	32
Controlos .....	15	<b>Apêndice 6:</b>	
Optimizando Condições de Execução .....	17	Práticas de Prevenção de Contaminação .....	33
Usando EDLs concebidos por outros laboratórios .....	17	Área 1: área de pré-amplificação .....	33
<b>Validação do protocolo de EDL</b> .....	<b>18</b>	Área 2: área de extracção de ácido nucleico .....	34
Sensibilidade .....	18	Área 3: área (s) de amplificação e detecção .....	35
Especificidade .....	18	<b>Apêndice 7:</b>	
Sensibilidade Analítica .....	18	Selecione Provedores de Teste de Proficiência de COVID-19 .....	36
Especificidade Analítica .....	19		
Precisão .....	19		
<b>Testes de diagnóstico no laboratório clínico</b> .....	<b>20</b>		
Configurando o Laboratório .....	20		
Requisitos de biossegurança .....	20		
<b>Fluxo de trabalho de teste de PCR</b> .....	<b>20</b>		

# RECONHECIMENTOS

Este manual foi concedido pela Fundação para Novos Diagnósticos Inovadores (FIND) e pela Sociedade Africana de Medicina Laboratorial (ASLM), com financiamento do UK Aid.

Agradecemos a todos aqueles que contribuíram para o desenvolvimento e revisão deste manual:

**Escritores principais:** Marinus BRNAard, André Trollip, Devy Emperador, Heidi Albert (FIND), Sharon Altmann and Lance Presser (MRIGlobal)

**Revisores:** Karishma Saran, Beatrice Gordis (FIND), Casey Ross (MRIGlobal), Collins Otieno, Pascale Ondo, Marguerite Massinga, Anafi Mataka (ASLM)

**O layout:** JR Papa (SFD Creative).

# ABREVIATURAS

<b>pb</b>	Pares de bases	<b>SGQ</b>	Sistema de gestão da qualidade
<b>CSB</b>	Cabine de Segurança Biológica	<b>PCR-TRq</b>	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
<b>NBS</b>	Nível de biossegurança	<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>DNAc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementar	<b>PCR-TR</b>	Reacção em cadeia da polimerase de transcrição reversa quantitativa
<b>COVID-19</b>	Coronavírus de 2019	<b>COV-2-SRAS</b>	Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave
<b>Cq</b>	Valor de quantificação do ciclo	<b>POP</b>	Procedimento operacional Padrão
<b>CL</b>	Valor limite do ciclo	<b>RNAcs</b>	Ácido ribonucleico de cadeia simples
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>TRL</b>	Tempo de Resposta Laboratorial
<b>TFDN</b>	Trifosfato de desoxinucleosídeo	<b>Tf</b>	Temperatura de fusão
<b>DNAfd</b>	Ácido desoxirribonucleico de fita dupla	<b>UNG</b>	Uracil-N-glicosilase
<b>DTT</b>	Ditiotreitol	<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>TFDU</b>	Trifosfato de desoxiuridina		
<b>AEQ</b>	Avaliação externa da qualidade		
<b>AEVg</b>	Arquivo Europeu de Vírus - GLOBAL		
<b>DNAg</b>	Ácido desoxirribonucleico genómico		
<b>G</b>	Guanina		
<b>ITCG</b>	Isotiocianato de guanidínio		
<b>CIA</b>	Controlo interno da amplificação		
<b>CIQ</b>	Controlo interno da qualidade		
<b>ISO</b>	Organização Internacional de Normalização		
<b>DIV</b>	Diagnóstico in vitro		
<b>KCl</b>	Cloreto de Potássio		
<b>ICD</b>	Indicador-Chave de Desempenho		
<b>EDL</b>	Ensaio desenvolvido no laboratório		
<b>PRBMs</b>	Países de rendimento baixo e médio		
<b>LdD</b>	Limite de detecção		
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio		
<b>TAAN</b>	Teste de amplificação de ácido nucleico		
<b>CEN</b>	Controlo da extracção negativo		
<b>RTR-N</b>	Controlo da transcriptase reversa negativa		
<b>CMS</b>	Controlo sem modelo		
<b>PCR</b>	Reacção em cadeia da polimerase		
<b>TP</b>	Teste de proficiência		
<b>CMP</b>	Controlo do modelo positivo		
<b>GQ</b>	Garantia da Qualidade		
<b>CQ</b>	Controlo da qualidade		



# INTRODUÇÃO

A pandemia global SARS-CoV-2 colocou os serviços de testes e diagnósticos de laboratório no centro das atenções globais. Testes agressivos e sustentados são a base das estratégias de testagem-rastreamento-isolamento que são centrais para a resposta actual da SARS-CoV-2 e são essenciais para mitigar o impacto económico e da saúde desta pandemia.

Estratégias eficazes para a testagem contam com a resposta rápida dos resultados de testes confiáveis e precisos. Os testes fornecem informações essenciais para a vigilância de doenças e intervenções direcionadas às comunidades mais necessitadas. Também pode ajudar os sistemas de saúde fracos a gerir recursos escassos, como camas hospitalares.

Olhando para o futuro, testes eficazes também apoiarão o sucesso de futuras vacinas e terapêuticas contra SARS-CoV-2. Os dados dos testes já estão informando os ensaios clínicos em andamento. Assim que as terapias ou vacinas estiverem disponíveis, o diagnóstico permitirá a implementação de estratégias e ajudará a garantir que nossas populações mais vulneráveis possam ser alcançadas primeiro.

Apesar de sua importância amplamente aceita, o teste diagnóstico de SARS-CoV-2 tem sido uma falha crítica em muitos países. No caso dum novo patógeno humano como o SARS-CoV-2, os diagnósticos não estão disponíveis imediatamente e devem ser criados “do zero”. Isso significa que há um lapso de tempo entre o momento em que a necessidade de testes é identificada e quando esses testes estão disponíveis para uso. Em países de rendimento baixo e médio (PRBMs), os desafios são drasticamente ampliados e abrangem toda a cadeia de valor de diagnóstico. Testes de diagnóstico rápido e precisos não estão disponíveis; o equipamento de proteção individual e os reagentes para a testagem necessários estão em atraso, indisponíveis ou inacessíveis; e os sistemas de cadeia de frio necessários para preservar a integridade dos reagentes de diagnóstico são frágeis. O desenvolvimento de testes “internos” para detectar patógenos emergentes é uma estratégia que pode ajudar a mitigar alguns dos desafios associados à dependência de kits produzidos em outras partes da região ou do mundo.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o teste de SARS-CoV-2 usando testes de amplificação de ácido nucleico (TAANs). Essa tecnologia é baseada na detecção de sequências únicas de ácidos ribonucleicos (RNA) virais usando técnicas como a reacção em cadeia da polimerase de transcrição reversa em tempo real (PCR-RT em tempo real). Existem dois tipos de plataformas de teste para a detecção de SARS-CoV-2:

- + **Sistemas fechados:** são sistemas de testagem proprietária, em que todos os acessórios precisam ser fornecidos pelo fabricante do teste. Os sistemas de testes fechados têm procedimentos padronizados e não podem ser programados para usar acessórios de teste fornecidos por um fabricante diferente. Os exemplos incluem o Sistema da Abbott m2000 Real Time, Sistema da *BioFire® FilmArray®*, Sistema da *Cepheid GeneXpert®*, Sistemas da Roche e Sistemas da *Cobas®*.
- + **Sistemas abertos:** Ao contrário dos sistemas fechados, os sistemas abertos podem acomodar diferentes tipos de testes de vários fabricantes, bem como ensaios desenvolvidos no laboratório (EDLs). Os padrões dependem dos vários componentes. Os exemplos incluem os sistemas CFX da Bio-Rad, o ABI 7500 DX e o Rotor-Gene da *Qiagen*.

O processo de desenvolvimento de um novo ensaio molecular de diagnóstico é desafiante e requer investimento de tempo, dinheiro e recursos para ser realizado. Para sistemas fechados em particular, os recursos disponíveis para produzir e distribuir suprimentos são altamente limitados e, durante grandes surtos de doenças, os fabricantes de testes podem atender a apenas uma pequena fração da demanda global dos seus produtos. Em última análise, a capacidade de desenvolver e validar testes “internos” posiciona um laboratório para responder mais rapidamente a surtos de patógenos emergentes do que seria capaz se dependesse do desenvolvimento e aprovação de ensaios comerciais.

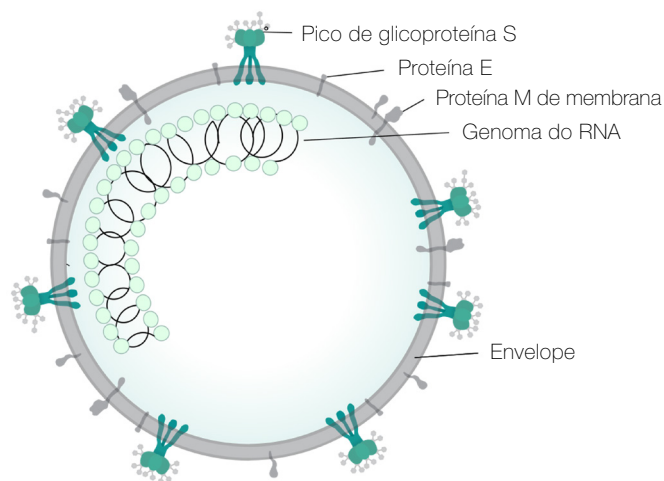
# OBJECTIVO E ÂMBITO

Este documento fornece orientação sobre o desenvolvimento dum novo teste interno de PCR-TR em tempo real para SARS-CoV-2 para laboratórios nacionais, laboratórios universitários e laboratórios privados com capacidade de biologia molecular estabelecida. As informações aqui contidas também fornecerão um roteiro para a criação de novos testes de diagnóstico molecular para outros patógenos emergentes. Ao longo do documento, levaremos em consideração as restrições de laboratórios com recursos limitados, bem como forneceremos um esboço dos requisitos para boas práticas de biologia molecular, incluindo controlo da qualidade (CQ) e garantia de qualidade (GQ).

## SARS - COV - 2

A SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de fita simples do sentido positivo com um único segmento linear de RNA. Agente causador de doenças coronavírus de 2019 (COVID-19) é o sétimo coronavírus conhecido e o quinto do género Betacoronavírus (incluindo; OC43, HKU1, SARS-CoV e SREM-CoV) a infectar pessoas (1). Como outros coronavírus, o SARS-CoV-2 tem quatro proteínas estruturais, conhecidas como proteínas S (pico), E (envelope), M (membrana) e N (nucleocapsídeo). A proteína N reveste e protege o genoma do RNA, e as proteínas S, E e M juntas criam o envelope viral. A proteína S é a proteína responsável por permitir que o vírus se fixe e se funda com a membrana de uma célula hospedeira (2). O surgimento do vírus na província de Wuhan, na China, foi relatado pela primeira vez em dezembro de 2019 (3). A OMS declarou a pandemia do vírus no dia 11 de Março de 2020 (4) e, no momento em que este documento foi escrito, a pandemia estava em andamento.

**Figura 1:** Estrutura de SARS-CoV-2. De [SPQR10 Binte altaf / CC BY-SA](#)



Para obter informações confiáveis sobre a última pesquisa da SARS-CoV-2, consulte:

- + [https://www.thelancet.com/coronavirus?dgcid=kr\\_pop-up\\_tlcoronavirus20](https://www.thelancet.com/coronavirus?dgcid=kr_pop-up_tlcoronavirus20)
- + <https://www.nature.com/collections/hajgidghjb>
- + <https://www.nejm.org/coronavirus>
- + [https://www.sciencemag.org/collections/coronavirus?intcmp=ghd\\_cov](https://www.sciencemag.org/collections/coronavirus?intcmp=ghd_cov)

# INTRODUÇÃO A PCR / PCR-TR

A reacção em cadeia da polimerase (PCR) é um método usado para copiar rapidamente um gene alvo específico ou região do gene, fazendo uso de vários componentes, como iniciadores, trifosfatos de desoxinucleosídeo (TFDN), ácido desoxirribonucleico (DNA) termoestável polimerase e Cloreto de Magnésio (MgCl<sub>2</sub>) amortecedor. Na sua forma convencional, o PCR consiste de três etapas:

1. Desnaturação de DNA da fita dupla em fitas simples a 95°C por 15-60 segundos;
2. Recozimento dos iniciadores a regiões específicas no DNA da fita simples entre 47°C e 60°C por 30-60 segundos; e
3. O alongamento, facilitado pela enzima DNA polimerase, do DNA da fita simples pelo DNA da fita dupla novamente a 72° C por 30-180 segundos (dependendo da processabilidade, ou velocidade, da enzima e do comprimento da fita do ácido nucleico a ser alongado).

As temperaturas e o tempo descritos acima irão variar dependendo da polimerase usada e do gene alvo. PCR de transcrição reversa, ou PCR-TR, é o processo de conversão de RNA em DNA complementar de fita simples (DNAc) usando transcriptase reversa (polimerase) e iniciadores de DNA; o DNAc é então amplificado por PCR. Este processo pode ser usado para amplificar alvos de genes de RNA viral, como alvos de genes da SARS-CoV-2. PCR-TR em tempo real (PCR-TR em tempo real) é uma variação do PCR-TR que combina a amplificação da PCR-TR com detecção em tempo real do gene alvo amplificado. Este processo elimina a necessidade de métodos de detecção demorados, como eletroforese em gel, e permite o monitoramento de dados em tempo real, já que os ciclos de amplificação são normalmente observáveis no software fornecido. Os ensaios em tempo real podem ser qualitativos ou quantitativos.

Procurando uma atualização mais detalhada sobre RCP-TR em tempo real? Confira esta resenha útil no

+ <https://geniticeducation.co.in/real-time-pcr-principle-procedure-advantages-limitations-and-applications/>

e um vídeo útil sobre como a RCP-TR em tempo real funciona no

+ <https://www.youtube.com/watch?v=iiXisgizkxs>.

O treinamento gratuito sobre a realização de testes moleculares para SRAS-CoV-2 está disponível no

+ <https://www.futurelearn.com/courses/laboratory-training-for-covid-19-molecular-testing/1/todo/78814>

## ENSAIOS QUALITATIVOS VS. QUANTITATIVOS

Um ensaio de PCR qualitativo é desenhado para detectar a presença ou ausência dos ácidos nucleicos alvos. Os ensaios quantitativos de PCR (quantificação relativa ou absoluta) determinam quanto do ácido nucleico alvo específico está presente na amostra de teste. Os ensaios usados para o diagnóstico de COVID-19 são principalmente ensaios qualitativos, enquanto os ensaios quantitativos de PCR-TR (PCR-TRq) são usados para mais aplicações relacionadas à pesquisa, onde a carga de vírus numa amostra precisa de ser determinada.

Os ensaios de PCR qualitativos às vezes são chamados ensaios de PCR semi-quantitativos, como vários resultados podem ser comparados para determinar quais amostras tinham relativamente mais ácidos nucleicos alvos presentes. Essa comparação é baseada no ciclo de amplificação no qual o sinal alvo se torna mais forte do que o sinal de fundo, um ponto conhecido como valor de limite do ciclo (LC). Por exemplo, duas amostras contendo SARS-CoV-2 são testadas por PCR-TR em tempo real: a amostra 1 tem um valor LC de 24 e a amostra 2 tem um valor LC de 30. A amostra 1 tem mais ácido nucleico viral em relação à amostra 2, mas a quantidade absoluta dos ácidos nucleicos virais presentes em ambas as amostras permanece desconhecida.

Para determinar a quantidade absoluta de ácidos nucleicos virais presentes por PCR-TRq, as amostras são testadas junto com uma série de padrões de concentração conhecida. Esses padrões são usados para estabelecer uma curva padrão a partir da qual a quantidade da sequência alvo na amostra de teste pode ser calculada. Os ensaios quantitativos não são frequentemente usados para diagnósticos, como são mais demorados e usam mais reagentes do que os ensaios qualitativos.

# MÉTODOS DE EXTRACÇÃO DE RNA VIRAL

A taxa de transferência diária da amostra no laboratório normalmente determina se a extracção manual de ácido nucleico deve ser feita ou se um sistema automatizado de extracção de ácido nucleico será implementado. A maioria dos laboratórios prefere usar sistemas automatizados de extracção de ácido nucleico, se estiverem disponíveis; no entanto, sugere-se que um método manual também seja incluído, uma vez que serve como um sistema de backup caso o sistema de extracção de ácido nucleico automatizado esteja com defeito ou se houver uma escassez dos reagentes usados nesses dispositivos.

A maioria dos dispositivos automatizados de ácido nucleico são grandes e não cabem numa Cabine de Segurança Biológica (CSB), portanto, o método usado para inactivar a amostra contendo vírus também deve ser considerado ao escolher os reagentes de extracção. É importante que tanto os métodos de inactivação quanto os métodos de extracção usados não degradem o ácido nucleico viral, mas devem ser suficientemente eficaz para inactivar e lisar as partículas virais, respectivamente. Existem vários kits manuais de extracção e purificação de RNA viral e sistemas automatizados de extracção de ácido nucleico disponíveis globalmente (consulte o [Apêndice 1](#)).

O sucesso da PCR-TR e da PCR-TR em tempo real depende da qualidade do RNA extraído. A extracção de RNA envolve a lise das partículas virais na amostra do paciente para liberar o ácido nucleico. Nesse estágio, a amostra contém o ácido nucleico de interesse (o RNA), DNA e proteínas contaminantes, além de complexos de nucleoproteínas e RNases e, portanto, ainda precisa de ser purificada para a reação de PCR. É crítico que os RNases sejam inactivados e os complexos de núcleo-proteínas degradados durante o processo de extracção, como estes irão destruir o RNA. Todas as soluções e consumíveis usados devem ser livres de RNase. Os dois métodos orgânicos mais usados de extracção de RNA utilizam Tiocianato de guanidínio 4M (TCGI) ou Fenol e Dodecil sulfato de sódio. O método de extracção de RNA tiocianato-fenol-clorofórmio de Guanidínio é mais usado para extrair o RNA da SARS-CoV-2 duma amostra derivada duma pessoa sob investigação para COVID-19 (**Tabela 1**).

**Tabela 1:** Etapas básicas de extracção de RNA usando métodos orgânicos

<b>Etapa 1.</b>	Lise e dissolução celular (homogeneização de células / partículas para liberar o RNA) por meio de tampões e centrifugação, respectivamente	A lise celular é feita usando tampões ou reagentes contendo agentes caotrópicos, como Isotiocianato de guanidínio, Cloreto de guanidínio, Dodecil sulfato de sódio (DSS), Sarcosil, Ureia, Fenol ou Clorofórmio.  Agentes comerciais como TRIzol, Realter ou Qiazol podem ser usados para manter a integridade do RNA durante a lise.
<b>Etapa 2.</b>	Desnaturação de DNA e proteínas	O DNase deve ser usada para degradar o DNA, e a proteína K pode ser adicionada para auxiliar na digestão de proteínas. Alternativamente, a extracção orgânica repetida usando Fenol e Clorofórmio, ou dissolvendo a amostra em tampões contendo sais de guanidínio, também podem ser usada para remover proteínas.
	Inactivação de RNases	Inactivação de RN. Isso pode ser conseguido usando qualquer um dos agentes caotrópicos mencionados acima, como Fenol e Clorofórmio.
<b>Etapa 3.</b>	Isolamento de RNA (remoção / separação de componentes celulares)	O RNA pode ser separado de outros componentes celulares adicionando Clorofórmio e centrifugando a solução. Isso separa a solução em duas fases: fase orgânica e aquosa. A fase aquosa contém RNA.
<b>Etapa 4.</b>	Precipitação	O RNA é frequentemente recuperado da fase aquosa usando álcool isopropílico e centrifugação. O RNA também pode ser precipitado selectivamente a partir do DNA por meio do uso de Acetato de amônio. Alternativamente, o Cloreto de lítio pode ser usado para precipitar selectivamente o RNA do DNA, bem como proteínas.
<b>Etapa 5.</b>	Transferência de RNA purificado	Armazenamento do pellet na água sem RNase.



Existem dois tipos principais de tecnologias de extracção de ácido nucleico que podem ser usados em vez do método orgânico descrito na Tabela 1:

- + **A tecnologia baseada em membrana de sílica** é um método de extracção em fase sólida usado para purificar ácidos nucleicos. O RNA se liga à sílica sob certas condições, enquanto outras moléculas, como proteínas e DNA, não. Depois que as células foram lisadas e o material genético está acessível, uma solução tampão e etanol ou isopropanol são adicionados à amostra. Isso forma a solução de ligação. Esta solução é então centrifugada numa coluna de spin, que força a solução de ligação através duma membrana de gel de sílica na coluna de spin. Se as condições como pH e concentrações de sal da solução de ligação forem óptimas, o RNA se ligará ao gel de sílica conforme a solução passa.
- + Na **tecnologia de partículas paramagnéticas**, o uso de esferas magnéticas que possuem um revestimento individual que lhes permite ter afinidade por moléculas específicas dentro duma amostra, como DNA, RNA ou proteínas, administra o isolamento e separação de diferentes partículas dentro duma amostra. Apenas o RNA se liga aos esferas magnéticas revestidas, deixando qualquer contaminante remanescente na solução.

Devido à escassez global de equipamentos de laboratório, reagentes e consumíveis necessários para extracção de RNA devido à pandemia de SARS-CoV-2, alguns laboratórios de diagnóstico molecular ampliaram a abordagem alternativa para extracção de RNA simplesmente fervendo a amostra (5).

# CONCEPÇÃO DO PROTOCOLO DE PCR

## CONSIDERAÇÕES DE RECURSOS NO DESENVOLVIMENTO DE TESTES INTERNOS

O projeto e a implementação dum novo ensaio diagnóstico de PCR-TR de plataforma aberta requerem uma série de recursos, incluindo, mas não se limitando a: eletricidade confiável e capacidade de armazenamento refrigerado, equipamento especializado, a capacidade de produzir ou adquirir reagentes de alta qualidade, um sistema de gestão qualidade (SGQ) estabelecido, incluindo um oficial de SGQ ou membro da equipa dedicado, e a capacidade de realizar monitoramento de longo prazo e documentação do desempenho do ensaio. A equipa envolvida no processo de desenvolvimento deve possuir uma compreensão profunda de como cada etapa e componente do ensaio deve funcionar e deve ser capaz de solucionar problemas com as reações do ensaio, bem como com o equipamento que está sendo usado. Ter acesso a pessoas capazes de realizar as análises estatísticas necessárias durante o processo de validação do protocolo também é essencial. Registros meticulosos do processo de desenvolvimento devem ser mantidos, e o protocolo final em si deve ser escrito claramente. O protocolo escrito deve ser testado por equipa treinada para realizar diagnósticos moleculares que não estiveram envolvidos no processo do desenvolvimento, para garantir que seja completo e fácil de seguir.

Uma vez que um EDL tenha sido desenvolvido, ele deve passar por uma validação rigorosa no laboratório central ou nacional antes de ser enviado para laboratórios regionais ou satélite. As consequências da falha na validação podem ser graves - durante a resposta de SARS-CoV-2 dos Estados Unidos, um reagente vital no ensaio do CDC foi contaminado, mas a contaminação não foi descoberta até que os *kits* foram enviados para vários laboratórios regionais. Essa falha no processo de validação resultou em grandes atrasos nos testes no início da pandemia. Assim que o EDL for validado no laboratório central ou nacional, ele precisará ser validado em todos os laboratórios adicionais onde for usado. Os resultados desses exercícios de validação devem ser revisados pela equipa da concepção para determinar se modificações adicionais no protocolo ou treino adicional em outros locais são necessários.

**NOTA:** A maioria dos laboratórios não estarão posicionados para conceber EDLs de plataforma fechada. A maioria dos sistemas de plataforma fechada são proprietários, o que significa que o desenvolvimento de ensaios para esses sistemas requer o trabalho direto com o fabricante do sistema. No caso de sua instalação estar em condições de trabalhar com um desses fabricantes, o processo de desenvolvimento será muito semelhante ao que é descrito neste documento para concepção de EDL de plataforma aberta.

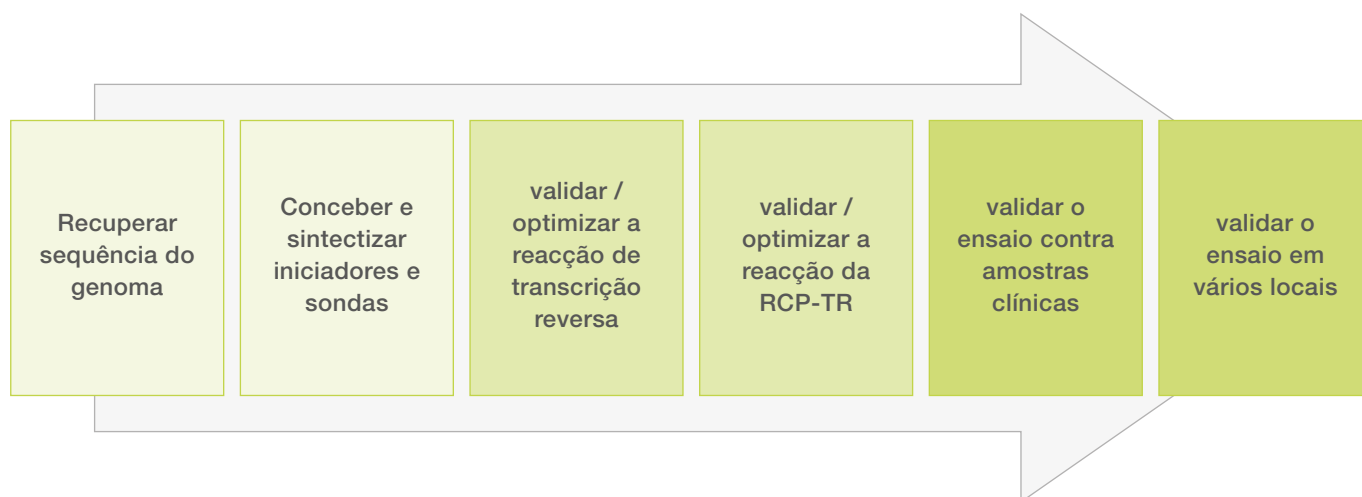
## REQUISITOS DE EQUIPAMENTO NO DESENVOLVIMENTO DO ENSAIO

O processo de desenvolvimento e validação de EDL requer uma variedade de equipamentos especializados. Uma breve lista dos requisitos mínimos de equipamento é fornecida no [Apêndice 2](#). Os sistemas de PCR em tempo real podem ser adquiridos de vários fornecedores. Uma lista de fornecedores potenciais é fornecida no [Apêndice 3](#). A escolha dum sistema é orientado pela velocidade em que o sistema pode atingir as temperaturas programadas, os requisitos de manutenção e calibração, o número de canais para detecção de cores em relação à complexidade do ensaio de PCR, o sinal para cada alvo e a seleção do corante para os filtros dum instrumento específico. Se o ensaio for concebido para detectar um único alvo (por exemplo, SARS-CoV-2), incluindo vários controlos internos, um instrumento básico pode ser usado para detectar o alvo. Os laboratórios que buscam atender aos requisitos da Organização Internacional de Normalização (ISO) devem considerar os sistemas classificados para uso em diagnóstico clínico ou diagnóstico in vitro (DIV).

## VISÃO GERAL DO PROCESSO DE CONCEPÇÃO DO ENSAIO

O processo de concepção do ensaio envolve várias etapas de planificação, validação e optimização. Um diagrama geral do processo é mostrado na **Figura 2**.

**Figura 2:** processo de concepção de EDL.



## CONCEPÇÃO DE INICIADORES E DE SONDAS

### CONCEPÇÃO DE INICIADORES

É importante garantir a amplificação adequada das regiões genómicas específicas do vírus SARS-CoV-2 na concepção dum EDL. Sequências de SARS-CoV-2 foram publicadas (6) e sequências de iniciadores validados para detecção de SARS-CoV-2 estão disponíveis (7).

Na concepção de iniciadores para EDLs, é importante observar que o vírus SARS-CoV-2 compartilha 95% de homologia com outros coronavírus, criando assim um alto risco de reactividade cruzada. Portanto, é essencial que os iniciadores e as sondas sejam concebidos para amplificar especificamente apenas o RNA dos genes do vírus SARS-CoV-2 e não vírus relacionados.

A temperatura de fusão ( $T_f$ ) dum iniciador é por definição “a temperatura em que a metade do duplex de DNA se dissocia e torna-se de fita simples, indicando assim a estabilidade do duplex”. A faixa de  $T_f$  ideal é normalmente entre 52°C e 58°C e está directamente ligada ao conteúdo de Guanina-Citosina (GC) do iniciador. Deve-se ter cuidado na concepção e uso de iniciador com temperaturas de fusão mais altas (acima de 65°C), como eles têm tendência para formar estruturas secundárias.

O seguinte deve ser considerado na concepção de iniciadores:

- + Conceba iniciadores com 18-27 pares de bases (pb) de comprimento e que produzirão *amplicons* com 70-150 pb de comprimento. O comprimento curto garante fácil ligação ao ácido nucleico molde durante a etapa de recozimento no ciclo de PCR.
- + Evite homologia dentro ou entre os iniciadores, especialmente na extremidade terminal 3 e para evitar a formação de dímero do iniciador.
- + Conceba iniciadores que tenham um conteúdo de GC de 40-60% e evite alongamento longo (4+ repetições) de GC, bem como G ou C. Tente incluir um grampo de GC na extremidade terminal 3 do iniciador: para promover a ligação específica deve haver um nucleótido G ou C presente dentro de cinco bases da extremidade terminal 3 do iniciador.

- + Certifique-se de que os iniciadores tenham uma temperatura de fusão entre 55 e 65°C. O T<sub>f</sub> dos dois iniciadores deve ser o mais próximo possível.
- + Evite conceber iniciadores para regiões com estruturas secundárias. A complementaridade dentro de um iniciador favorece a formação de laços em gancho.
- + Verifique as sequências dos iniciadores directos e reverso quanto à complementaridade terminal 3. Isso pode resultar na formação de iniciador-dímero ou cruz-dímero. Um dímero de iniciador é formado quando dois iniciadores na mesma direcção se ligam devido a interações intermoleculares.
- + Verifique a especificidade para a sequência alvo e patógeno executando uma pesquisa BLAST de nucleotídeos contra as sequências disponíveis (8). O BLAST compara as sequências de iniciadores concebidos com sequências publicadas e determina o potencial de hibridização dos iniciadores escolhidos com sequências de outros vírus SARS, bem como de outros organismos.

Ferramentas *online*, como a ferramenta *Primer-BLAST* do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia dos Estados Unidos, permitem que os usuários concebem seus iniciadores com base de sequências de genoma disponíveis publicamente. Muitas empresas de síntese de iniciadores também oferecem ferramentas gratuitas de concepção de iniciadores nos seus *sites*. Exemplos de algumas dessas ferramentas são fornecidos no **Apêndice 4**. Uma vez que os iniciadores e as sondas são concebidos e sintetizados, as concentrações, bem como as dos outros componentes da PCR, devem ser optimizadas para garantir a máxima eficiência da amplificação (9).

## CONCEPÇÃO DE SONDAS DE HIBRIDIZAÇÃO / HIDRÓLISE

Existem muitos produtos químicos fluorescência de sonda de detecção que podem ser usados para criar ensaios PCR-TR em tempo real para SARS-CoV-2. Os três produtos químicos mais comuns incluem detecção baseada em SYBR® Green, sondas oligonucleotídicas fluorogênicas duplamente marcadas e sondas de sinais moleculares.

**SYBR® Green I**, é um corante fluorescente que intercala, ou é ligado, em DNAfd e pode ser usado em reacções de PCR-TR em tempo real. Com cada ciclo de amplificação, mais corante é ligado, levando a um aumento na fluorescência. *SYBR Green* não é específico para a sequência, que torna este método susceptível a falsos positivos devido à formação de produtos de PCR não específicos ou dímeros do iniciador. A especificidade do iniciador é geralmente confirmada avaliando se o produto amplificado tem o tamanho correcto e se ele funde na temperatura prevista, que serve como uma indicação de que a sequência do produto tem a composição esperada. Este processo de confirmação é denominado uma análise da curva de fusão.

**As sondas oligonucleotídicas fluorogênicas duplamente marcadas** (por exemplo, sondas *TaqMan*®) têm um corante repórter fluorescente na sua extremidade terminal 5 e um corante supressor na sua extremidade terminal 3. As sondas são adicionadas ao *master mix* junto com o conjunto do iniciador específico. Durante a PCR, se a sequência alvo estiver presente, a sonda se recoze a jusante dum local do iniciador e é clivada pela actividade de 5 nuclease da Taq DNA polimerase durante a polimerização. Esta clivagem libera o corante repórter da sonda e o separa do corante supressor, resultando em fluorescência que é detectada pelo instrumento. As sondas de sinais moleculares usam uma variação do processo de rótulo duplo descrito acima.

**Para sondas de sinais moleculares**, os corantes repórter e supressor são mantidos juntos por uma estrutura em gancho nas sondas, mas tornam-se suficientemente separados por linearização da sonda após o recozimento com o modelo para permitir que a fluorescência do corante repórter seja detectada.

Nem todos os sistemas PCR-TR suportam todas as químicas de sonda. Antes de seleccionar um produto químico e conceber as suas sondas, verifique o manual do usuário de seu sistema PCR-TR para determinar quais produtos químicos funcionarão com mais eficiência. Se você não tiver o manual do usuário, geralmente pode fazer o *download* no *site* do fabricante. Outra consideração na concepção dum EDL com várias sondas e iniciadores é que as sondas absorvem e emitem em comprimentos de onda de luz específicos, e esses comprimentos de onda se sobrepõem em algumas sondas. Portanto, se você não for cuidadoso com suas selecções, podem ocorrer falsos positivos para fazer “estimulação incidental” de uma sonda.

Para obter mais informações sobre a química da sonda e selecção de fluoróforo, verifique as dicas fornecidas no

- + <https://www.bioradiations.com/tips-to-make-fluorophore-picking-easier/>

## SUGESTÕES PARA A SELECÇÃO DE INICIADORES E DE SONDAS

A maioria das empresas que produzem iniciadores e sondas para ensaios de PCR-TR em tempo real têm ferramentas disponíveis *online* para ajudar no processo de concepção. Se você estiver procurando adquirir iniciadores e sondas de uma empresa localizada num país diferente, certifique-se de falar com alguém na empresa para confirmar se eles poderão enviar seus materiais para você correctamente. Algumas empresas podem fornecer seus iniciadores e sondas na forma liofilizada. Os materiais liofilizados devem ser considerados se houver preocupações de que sua compra possa levar vários dias para passar pela alfândega, ou se houver dúvidas sobre se a cadeia de frio pode ser mantida com sucesso durante o transporte e entrega. Alguns exemplos de fornecedores de iniciadores e sondas personalizados são fornecidos no [Apêndice 4](#).

## COMPONENTES ADICIONAIS DA TRANSCRIÇÃO REVERSA E DAS REACÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE

O processo de PCR-TR requer dois conjuntos de reagentes - um para a etapa de transcrição reversa e outro para a PCR. Os ensaios de diagnóstico podem ser concebidos como processos de duas etapas, em que o produto do processo de transcrição reversa é adicionado aos reagentes de PCR ou como processos de uma etapa, onde a transcrição reversa e as etapas de PCR ocorrem dentro do mesmo tubo. Além do modelo inicial de RNA, os componentes típicos da reacção de transcrição reversa são mostrados na **Tabela 2**; os componentes básicos da porção de PCR do ensaio necessário para replicar o DNAC são mostrados na **Tabela 3**. Alguns sistemas / enzimas de PCR podem exigir o uso de Sulfato de magnésio ( $MgCl_2$ ), Albumina sérica bovina, Dimetilsulfóxido e Glicerol para condições ideais. A maioria dos fornecedores comerciais de transcriptase reversa e polimerase de DNA fornecerão à enzima com o tampão no qual a enzima funciona de maneira ideal.

**Tabela 2:** Componentes da reacção de transcrição reversa

Componente	Concentração típica por cada reacção	Notas
Tampão	50 mM Tris HCl pH8.3 75 mM KCl 10 mM DTT 3 mM $MgCl_2$	Isso deve ser preparado como concentração de 5x
TFDNs	1 mM	Todos os quatro TFDNs (trifosfatos de Adenina, Guanina, Citosina e Timina) devem ser incluídos
Transcriptase reversa	1 Unido	A concentração ideal deve ser determinada durante a optimização



**Tabela 3:** Componentes da reacção de PCR

Componente	Concentração típica por cada reacção	Notas
Tampão	20 mM Tris HCl pH8.3 50 mM KCl	Isso deve ser preparado como concentração de 10x
dNTPs mix	0.2- 0.5 mM	A concentração ideal deve ser determinada durante a optimização
MgCl <sub>2</sub>	0.5 - 5 mM	A concentração ideal deve ser determinada durante a optimização
Iniciador adiante	0.1 - 0.5 µM	A concentração ideal deve ser determinada durante a optimização
Iniciador reversa	0.1 - 0.5 µM	A concentração ideal deve ser determinada durante a optimização
Sonda	0.1 - 0.5 µM	A concentração ideal deve ser determinada durante a optimização
Polymerase DNA	0.25 - 0.5 Unit	A concentração ideal deve ser determinada durante a optimização

A mistura de iniciadores e de sondas de componentes da PCR, polimerase de DNA, TFDNs, MgCl<sub>2</sub> e tampão é chamada de **master mix** e é geralmente preparada na concentração necessária para uso e, em seguida, dividida em alíquotas em tubos de PCR ou placas de 96 poços de PCR. Os fornecedores comerciais de reagentes de PCR oferecem misturas prontas que incluem todos os componentes necessários de PCR, excepto os iniciadores e sondas. As misturas prontas apresentam a vantagem de poderem ser usadas para configurar e otimizar o PCR para a detecção de quaisquer patógenos se iniciadores e sondas específicos estiverem disponíveis. Isso reduz o risco de contaminação, erros de pipetagem e o mais importante economiza tempo.

Para desenvolver testes laboratoriais internos para SARS-CoV-2 ou quaisquer outros patógenos, as seguintes etapas devem ser realizadas:

1. Conceber iniciadores e sondas específicos para patógenos. Precisar saber a sequência do patógeno.
2. Faça o pedido nas empresas que sintetizaram oligonucleotídeos e solicite pelo menos uma escala de purificação SDS-PAGE. Lembre-se de adicionar suas modificações nas extremidades 5 'e 3' (anexando o fluoróforo desejado) durante o pedido.
3. Obtenha enzimas, tampões, mistura de TFDNs e Cloreto de magnésio de fornecedores comerciais. Seria poupança de tempo comprar misturas prontas de fornecedores comerciais, como os listados no [Apêndice 5](#).

## ENZIMAS

As transcriptases reversas são as enzimas usadas para fazer DNAc a partir do RNA. A Taq polimerase de DNA, isolada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*, é a principal enzima usada na amplificação do DNA.

Ao seleccionar um tipo de enzima para um método, o criador deve avaliar os diferentes pontos fortes e fracos das polimerases de DNA disponíveis para determinar qual polimerase individual, ou combinação de polimerases,

funcionará com seu ácido nucleico modelo. Os registros dos números de lote de todos os reagentes devem ser capturados e armazenados. Os reagentes devem ser divididos em alíquotas de uso único para evitar congelamento-descongelamento excessivo e para proteger os reagentes de estoque de contaminação. Esses tubos de reagentes devem ser claramente rotulados. Todos os reagentes contendo sondas fluorescentes devem ser protegidos da luz excessiva para evitar degradação por foto-branqueamento. Recomenda-se incorporar dUTP e um inibidor de RNase na *master mix* para prevenir a degradação pela Uracila-DNA glicosilase (UNG) e para minimizar a perda do material do modelo de RNA, respectivamente.

## SUGESTÕES PARA A SELECÇÃO DE ENZIMAS

A selecção de transcriptases reversas e polimerases de DNA deve considerar as temperaturas de reacção em que serão utilizadas, o tamanho do DNAc ou produto de PCR que será produzido, a sensibilidade e precisão desejadas da reacção e a capacidade de trabalhar com inibidores ou degradados - contendo RNA. A variedade de opções de enzimas é maior quando conceber ensaios de duas etapas, enquanto as transcriptases reversas e polimerases para uso em ensaios de uma etapa normalmente vêm pré-misturadas do fornecedor. Tal como acontece com iniciadores e sondas, alguns fornecedores vendem *master mixes* liofilizados que incluem a transcriptase reversa e a polimerase de DNA já presentes.

## CONTROLOS

Durante o desenvolvimento dum EDL, é importante considerar quais controlos serão necessários para o teste. Os controlos são usados para monitorar o desempenho do processo completo de diagnóstico do ensaio molecular. A inclusão de controlos adequados permite aos profissionais dos laboratórios confirmar que o processo de extracção de RNA foi bem-sucedido; para identificar casos de possível inibição de PCR; verificar a funcionalidade do equipamento; para detectar a introdução de material genómico contaminante no fluxo de trabalho; e para validar os resultados do teste. O uso de controlos apropriados para cada execução de diagnóstico é, portanto, essencial para garantir a qualidade dos resultados do teste. Um exemplo dum esquema de controlo desenvolvido para um EDL de SARS-CoV-2, incluindo detalhes adicionais sobre a fonte dos controlos e suas finalidades, é mostrado na **Tabela 4**. A **Tabela 5** fornece detalhes adicionais sobre os controlos e sua finalidade.

**Tabela 4:** Exemplo dum esquema de controlo para um PCR-TR em tempo real de SARS-CoV-2. De (10).

Controlo	Controlos para:	Requisito de controlo:
NSM (Controlo sem modelo)	Contaminação na master mix / configuração da placa	Um por cada placa de PCR-TR em tempo real; Controlo aprovado
COV_Pos (Controlo do Ensaio Positivo)	Controlo do processo de PCR-TR em tempo real	Um por cada placa de PCR-TR em tempo real; Controlo aprovado
COV_Neg (Controlo do Ensaio Negativo)	Controle de extracção, processo de PCR-TR em tempo real para RNase P	Um por cada extracção; Controlo aprovado
RNase P na amostra negativa (controlo interno da amplificação)	Confirma o processo completo para amostras negativas	Integrado para todos os poços CPCR-TR em tempo real; Aprovado quando a amostra for negativa

**Tabela 5:** Fontes do controlo e interpretações.

Tipo de controlo	Material de exemplo	Resultado esperado	Possíveis razões para um resultado positivo	Possíveis razões para um resultado negativo
Extracção positiva	Uma amostra conhecida por conter as sequências de ensaio, por exemplo, RNAA / DNAG expressando / contendo o alvo	Positivo	Correcto	Falha do ensaio ou da extracção. Quaisquer dados positivos de outras amostras não são confiáveis.
Ensaio positivo (CMP)	Qualquer ácido nucleico compatível com a concepção do ensaio de PCR que contém a sequência alvo	Positivo	Correcto	Falha do ensaio. Quaisquer dados positivos de outras amostras não são confiáveis.
Ensaio negativo	Qualquer ácido nucleico compatível com a concepção do ensaio de PCR conhecido por não conter as sequências alvo	Negativo	O ensaio é inespecífico ou houve contaminação do controle durante a PCR ou preparação do reagente	Correcto
Sem modelo (CSM)	Água	Negativo	Os iniciadores são autodimerizantes, resultando em produto dímero de iniciadores ou houve contaminação do controle durante a PCR ou preparação do reagente	Correcto
Enzima negativa menos RT (Sem RT)	Amostra de RNA e todos os componentes da reacção TR, com excepção da enzima de TR. Isso deve ser realizado em todas as amostras para verificar se elas não contêm contaminação de DNAG que amplifica sob as condições de PCR sem a necessidade da enzima de TR	Negativo	A amostra contém DNAG. A reacção foi contaminada durante a configuração. Os iniciadores formaram dímeros de iniciadores. Analise em conjunto com o CSM.	Correcto
Extracção negativa (CEN)	Água	Negativo	Contaminação durante a extracção	Correcto
Controle interno da amplificação (CIA)	Ocorre naturalmente em amostras de teste, por exemplo, 16s, Beta-Actin, RNase-P	Positivo (todas as amostras e controlos devem conter o CIA, excepto o CSM)	Correcto	Falha no ensaio ou na extracção. Quaisquer dados positivos de outras amostras não são confiáveis.

**NOTA:** OS CONTROLOS ACIMA TRATAM APENAS DA EXTRACÇÃO DE ÁCIDO NUCLÉICO E DOS CONTROLOS POSITIVOS E NEGATIVOS DO ENSAIO DE PCR. É NECESSÁRIO QUE TODAS AS ACTIVIDADES, DESDE A COLHEITA DE AMOSTRA ATÉ O RELATÓRIO DE RESULTADOS, ESTEJAM SUJEITAS AO CONTROLO DA QUALIDADE (CQ) E GARANTIA DE QUALIDADE (GQ).

Quando EDLs são usados ou quando um *kit* de teste não inclui um modelo de controlo positivo, o material de controlo positivo pode ser obtido na forma de DNAc da Charité em Berlim, através do *Global European Virus Archive* (EVAg - <https://www.european-virus-archive.com>), ou na forma de fragmentos de RNA de fita simples (RNAs) de SARS-CoV-2 do *Joint Research Centre* na Bélgica (<https://crm.jrc.ec.europa.eu/p/EURM-019>).

## OPTIMIZANDO CONDIÇÕES DE EXECUÇÃO

A optimização das condições de execução de PCR envolve determinar 1) as concentrações ideais para cada iniciador e sonda usada no ensaio, 2) a temperatura de recozimento a ser usada para o ensaio e 3) refinar as concentrações dos componentes do tampão (particularmente quando mais dum alvo será testado por vez num único tubo, um processo conhecido como multiplexação). Após a extracção e amplificação bem-sucedidas do ácido nucleico, o ensaio deve ser validado separando os produtos de PCR num gel e correlacionando as temperaturas de fusão com os tamanhos correctos de *amplicons*. O controlo da transcriptase não reversa (TR-Não) também precisa ser verificado para determinar se uma etapa de digestão do RNA precisa ser adicionada à amostra antes da reacção de PCR-TR.

## USANDO EDLS CONCEBIDOS POR OUTROS LABORATÓRIOS

Laboratórios nacionais e organizações não-governamentais estão cada vez mais compartilhando seus próprios protocolos de EDL *online* para uso e adaptação por outros grupos. Estes protocolos fornecem informações valiosas sobre quais regiões dentro do genoma viral podem fornecer alvos adequados para iniciadores e sondas, quais condições de execução fornecem um sinal forte, se uma mistura pronta de *master mix* pode ser adequada para uso e quais enzimas têm bom desempenho no ensaio. Se um laboratório optar por adotar um EDL desenvolvido por um outro laboratório, seja esse laboratório fazer parte de sua rede nacional de laboratórios ou esteja localizado num país diferente, deve validar esse teste para confirmar que ele funciona conforme esperado nas suas instalações com as variedades de vírus presente na sua população local.

Exemplos de protocolos de EDL para SARS-CoV-2 que estão actualmente disponíveis online incluem o seguinte:

- + [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c_2)
- + <https://www.fda.gov/media/139743/download>
- + [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/whoinhouseassays.pdf?sfvrsn=de3a76aa\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/whoinhouseassays.pdf?sfvrsn=de3a76aa_2)

# VALIDAÇÃO DO PROTOCOLO DE EDL

As características de desempenho dum ensaio de PCR de COVID-19 EDL devem ser determinadas antes da implementação do ensaio para uso em testes de rotina em cada laboratório. Este processo é denominado validação. Os princípios de validação existem para garantir os padrões da prática laboratorial e a precisão dos resultados dos testes gerados por laboratórios clínicos e foram definidos pela Organização Internacional de Normalização (11, 12). As características de desempenho incluem uma série de parâmetros como exactidão, precisão, reprodutibilidade, sensibilidade analítica e especificidade, linearidade e testes e requisitos específicos de lote variam de acordo com os regulamentos nacionais.

As amostras a serem utilizadas na validação são especialmente importantes. Devem consistir de amostras positivas com valores de quantificação de ciclo conhecidos (Cq; cargas virais conhecidas), bem como amostras negativas que foram testadas em sistemas validados. Se possível, amostras representativas colhidas em diferentes meios de transporte (por exemplo, solução salina, meio de transporte viral ou meio de transporte universal) e os diferentes locais anatómicos de colheita de amostra (por exemplo, esfregaço nasofaríngeo, esfregaço orofaríngeo, escarro), devem ser submetidos ao mesmo processo de validação. Os resultados obtidos com essas variáveis permitirão tirar conclusões sobre as limitações do ensaio. Ao seleccionar as amostras para uma validação, as seguintes diretrizes devem ser seguidas:

- + Independentemente da prevalência de SARS-CoV-2, o número de amostras deve ser consistente entre os testes.
- + Todos os tipos de amostra esperados para o ensaio devem ser incluídos.
- + Amostras com todos os resultados possíveis (faixas de CL) devem ser incluídas.
- + Materiais de controlos e de calibração devem ser obtidos e incluídos.

## SENSIBILIDADE

A **sensibilidade** é a capacidade dum ensaio em avaliação de identificar amostras correctamente verdadeiras positivas (ensaio de referência positivos). Portanto, a sensibilidade é o número de amostras positivas correctamente identificadas pelo ensaio em avaliação dividido pelo número total de amostras positivas verdadeiras (por exemplo, aquelas positivas pelos ensaios de referência), expresso como uma percentagem conforme indicado:  $\text{Sensibilidade} = [\text{Positivo Verdadeiro} / (\text{Verdadeiro positivo} + \text{falso negativo})] \times 100\%$

## ESPECIFICIDADE

A **especificidade** é a capacidade dum ensaio para identificar correctamente amostras negativas verdadeiras (ensaio de referência negativos). Portanto, a especificidade é o número de amostras negativas verdadeiras correctamente identificadas pelo ensaio em avaliação, dividido pelo número total de amostras negativas verdadeiras (por exemplo, aquelas negativas pelos ensaios de referência), expresso como uma percentagem conforme indicado:  $\text{Especificidade} = [\text{Negativo Verdadeiro} / (\text{Verdadeiro negativo} + \text{falso positivo})] \times 100\%$

## SENSIBILIDADE ANALÍTICA

A **sensibilidade analítica** dum ensaio é a capacidade do ensaio de detectar concentrações muito baixas duma determinada substância numa amostra biológica. Também é conhecido como “limite de detecção” (LdD). Para estimar o LdD, medições repetidas são obtidas a partir das amostras de baixa concentração, por exemplo, amostras positivas com Cqs conhecidos que foram diluídos em série. Os experimentos para determinar o LdD devem ser realizados ao longo de vários dias para refletir o desempenho do ensaio numa faixa de condições laboratoriais típicas, mas sem uma alteração nos lotes do reagente. O LdD deve ser determinado para cada tipo de amostra que será testada no laboratório e cada variante genética do alvo pretendido (13, 14).



## EPECIFICIDADE ANALÍTICA

A **especificidade analítica** é a capacidade dum ensaio de detectar apenas o alvo pretendido e garantir que a quantificação do alvo não seja afectada pela reactividade cruzada dos ácidos nucleicos relacionados ou potencialmente interferentes ou condições relacionadas à amostra. Os estudos de interferência determinarão qualquer potencial de reactividade cruzada e/ou interferência. Este processo de triagem envolverá o teste de uma série de amostras com ou sem diferentes concentrações de substâncias potencialmente interferentes e agentes de reacção cruzada, a escolha dos quais será determinada pelo tipo de ensaio, amostras e alvo pretendido (12, 14).

## PRECISÃO

A **precisão** é a capacidade dum ensaio ter um desempenho consistente quando a amostra é testada várias vezes ao longo de muitos dias por diferentes operadores, usando diferentes lotes de reagentes. Isso reflete os impactos nos resultados devido a variações aleatórias que ocorrem enquanto o ensaio é realizado em condições normais. Ao contrário de outros parâmetros de validação, a precisão é uma medida qualitativa de desempenho. Os ensaios são geralmente classificados como de alta, média ou baixa precisão. Os experimentos para determinar a precisão do ensaio são realizados em duplicata ao longo de vários dias (normalmente cerca de 20) em pelo menos três concentrações de amostra (LdD, 20% acima do LoD e 20% abaixo do LoD). Executar as amostras em duplicado permite que a repetibilidade, ou imprecisão dentro da execução, do ensaio seja avaliada, enquanto a execução de amostras ao longo de vários dias com vários operadores e lotes de reagentes permite a reprodutibilidade, ou imprecisão execução a execução, a ser avaliada.

A **Tabela 6** ilustra um protocolo possível para validar a sensibilidade, especificidade, LdD e precisão dum EDL qualitativo, usando amostras com uma gama de concentrações da RNA viral alvo presente (o analito). Para uma discussão mais aprofundada sobre como realizar testes de validação e as análises estatísticas associadas, consulte (14).

**Tabela 6:** Protocolo de amostra para determinar as características de desempenho do EDL. Adaptado de (14).

Característica de desempenho	Concentração de analito testada											Comentários	
	Baixa					Média			Alta				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
Sensibilidade e especificidade	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	Teste 50 amostras positivas, 100 negativas, com aproximadamente 30% dos positivos na faixa baixa, 30% na faixa média e 30% na faixa alta de concentrações.
LdD	x	x	x	x	x								A execute 8-12 repetições cada uma das 4-5 amostras na extremidade baixa da concentração de analito durante pelo menos 5 dias.
Precisão		x			x						x		Prepare várias alíquotas de cada uma das 3 amostras que representam o LdD, 20% abaixo do LdD e 20% acima do LdD e armazene a -20 °C ou menos; teste as três amostras em duplicado durante 20 dias, utilizando operadores e lotes de reagentes diferentes, tanto quanto possível.

# TESTES DE DIAGNÓSTICO NO LABORATÓRIO CLÍNICO

## CONFIGURANDO O LABORATÓRIO

A implementação de ensaios PCR-TR em tempo real para SARS-CoV-2 (tanto disponíveis comercialmente quanto internamente) muitas vezes requer aumento de escala e fortalecimento laboratorial.

### REQUISITOS DE BIOSSEGURANÇA

Ao configurar novos testes de diagnóstico para SARS-CoV-2 ou qualquer novo patógeno, é fundamental considerar os riscos de perigo biológico. Os riscos biológicos incluem o potencial de infecção dum trabalhador do laboratório (técnico de laboratório, limpador, estudante, etc.) e, além disso, o potencial de liberação do vírus infeccioso SARS-CoV-2 na comunidade / ambiente. Uma avaliação de risco deve ser realizada para identificar as mitigações de risco adequadas, necessárias para garantir a segurança do pessoal do laboratório, da comunidade e do meio ambiente. A OMS recomenda que o SARS-CoV-2 “o manuseio de amostras para testes moleculares exigiria [nível de biossegurança 2] NBS-2 ou instalações equivalentes” e que “tentativas de cultura do vírus requerem, no mínimo, instalações de NBS-3” (15). Num laboratório de NBS-2, o acesso deve ser limitado e a entrada rotulada com uma placa de risco biológico (de preferência feita de material resistente ao fogo). O Manual de Biossegurança Laboratorial da OMS descreve três componentes da biossegurança em laboratórios (16). Esses componentes são:

Procurando informações adicionais sobre o manuseio e processamento seguro de amostras associadas ao COVID-19? Verifica

+ <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/lab-biosafety-guidelines.html>

1. O *layout* das instalações (desenho das áreas de trabalho do laboratório);;
2. Equipamento essencial, adquirido de acordo com as especificações padrão com um plano de manutenção utilizável (incluindo [re] certificação); e
3. Práticas de trabalho (procedimentos laboratoriais, proteção individual e equipamentos de proteção individual, vigilância médica e de saúde, treino, manuseio de resíduos e segurança química, contra incêndio, elétrica, radiação e equipamentos).

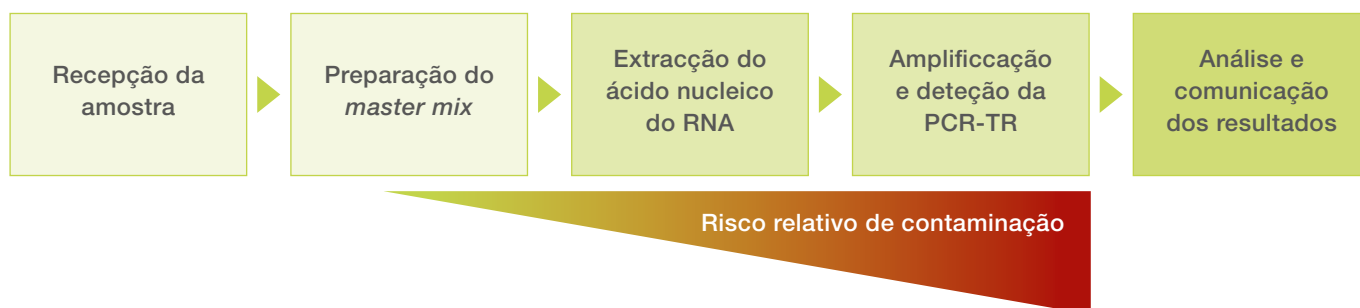
Boas práticas de laboratório e boas técnicas microbiológicas são essenciais para minimizar a geração de aerossóis infecciosos e a disseminação de ácidos nucleicos (produtos genômicos e *amplicons*). Se um dispositivo de extracção de ácido nucleico de plataforma aberta for usado durante o processo de PCR, as amostras devem primeiro ser inativadas dentro do CSB antes que o processo de extracção seja realizado. A área de preparação do *master mix* da PCR e a área de amplificação e detecção requerem apenas precauções de NBS-1.

## FLUXO DE TRABALHO DE TESTE DE PCR

Além de uma área de recepção de amostra, o laboratório molecular deve consistir de pelo menos três áreas diferentes dedicadas: a área de preparação de reagentes de PCR, a área de extracção do ácido nucleico e a área de amplificação e detecção. A separação física das áreas de pré-amplificação (ou “áreas limpas”) e das áreas de pós-amplificação (ou “áreas sujas”) é um requisito para mitigar o risco de contaminação durante o teste.

Para minimizar ainda mais o risco de contaminação de amostras, reagentes e superfícies e equipamentos de laboratório, os testes devem ser realizados seguindo um fluxo de trabalho unidirecional. O trabalho “limpo” deve ser feito antes do trabalho “sujo”, sem voltar para as áreas limpas depois de concluído o trabalho nas áreas sujas. A tabela abaixo ilustra o fluxo de trabalho de diagnóstico, etapas do procedimento, entradas específicas, materiais necessários para cada etapa do processo e a saída específica de cada etapa do processo no laboratório molecular para o teste de SARS-CoV-2. Conforme as etapas do fluxo de trabalho progridem, o risco de contaminação aumenta, conforme mostrado na **Figura 3**.

**Figura 3:** Fluxo de trabalho de diagnóstico molecular e risco relativo de contaminação genómica.



Um resumo do fluxo de trabalho de diagnóstico é mostrado na **Tabela 7**. Uma série de recursos estão disponíveis online que fornecem orientações adicionais sobre a criação de um novo laboratório de diagnóstico molecular (17 – 19).

**Tabela 7:** Resumo de um fluxo de trabalho de diagnóstico SARS-CoV-2

Fase de Teste	Fase processual	Entrada	Material necessário	Resultado	Área
Pré-analítico	Colheita de amostras, embalagem, transporte e recepção no laboratório	Uma amostra do paciente para testar a presença de SARS-CoV-2	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Uma zaragatoa para colher a amostra</li> <li>+ Meio de transporte num tubo de colheita para transportar a amostra sem degradação</li> <li>+ Embalagem tripla</li> </ul>	Uma amostra para análise PCR	Área geral de recepção de amostra
Analítico	Preparação do <i>master mix</i> PCR-TR	Reagentes PCR (internos ou kits)	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Iniciadores e sonda (específico para SARS-CoV-2)</li> <li>+ TFDNs (blocos de construção de ácidos nucleicos)</li> <li>+ Polimerase (Enzima)</li> <li>+ Transcriptase reversa (RT)</li> <li>+ Tampão PCR</li> <li>+ Controlo Positivo (específico para SARS-CoV-2)</li> <li>+ Sem modelo de controlo</li> </ul>	<i>Master Mix</i> de PCR-TR	Pré-amplificação (ultra-limpo)
	Extração do ácido nucleico do RNA	Uma amostra para análise PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Sistema de extração</li> <li>+ Reagentes de extração incluindo:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tampão de lise</li> <li>- Controlo de extração de RNA</li> <li>- Controlo de amostra humano</li> <li>- Controlo positivo específico para SARS-CoV-2</li> </ul> </li> </ul>	Ácidos nucleicos extraídos	Área de processamento de amostra (limpa)
	Amplificação e detecção da PCR-TR	Ácidos nucleicos extraídos e <i>master mix</i> de PCR-TR	Instrumentos de PCR-TR	Sinal de resultado de fluorescência indicando presença de RNA SARS-CoV-2	Amplificação / pós-amplificação (sujo)
Pós-analítico	Comunicação dos resultados	Sinal de resultado de fluorescência indicando presença de RNA SARS-CoV-2	Aplicativo COVID-19 IVD	Relatório do resultado indicando a presença do vírus SARS-CoV-2	Amplificação / pós-amplificação (sujo)

## PREVENÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DA PCR

Contaminação refere-se à introdução errônea de RNA viral, ou produtos de ácido nucleico previamente amplificados (*amplicons*) ou outros contaminantes ou inibidores na amostra ou no tubo de reacção de PCR. Qualquer que seja a fonte do contaminante é provável que ocorra um diagnóstico incorrecto. A prevenção da contaminação de PCR é igualmente crítica durante o processo de desenvolvimento do ensaio. Exemplos de boas práticas de prevenção de contaminação são fornecidos no [Apêndice 6](#).

## MEDIDA DE INCERTEZA PARA ENSAIOS MOLECULARES DE SARS-COV-2

A capacidade do ensaio para detectar a (s) sequência (s) alvo é prejudicada por vários factores e, portanto, as limitações de cada EDL para detecção de COVID-19 devem ser determinadas. A natureza semi-quantitativa dos ensaios SARS-CoV-2 permite a detecção do (s) gene (s) específico (s) do SARS-Cov-2 de interesse, por exemplo, mas qual é o LdD do ensaio e quais factores podem influenciar a confiabilidade do recém-concebido ensaio?

A carga viral na amostra determina a quantidade de ciclos necessários para o tempo de detecção durante a fase exponencial da reacção de PCR e pode ser usada dedutivamente para estimar a eliminação viral (grau de infeção). Qual é o impacto sobre a utilidade do ensaio se a amostra tem mais de 5 dias, ou se as temperaturas adequadas não foram mantidas durante o transporte da amostra? Tais desvios do protocolo pretendido podem afectar negativamente a precisão do ensaio. Fontes de incerteza podem ocorrer nas fases pré-analítica e analítica do processo de diagnóstico, conforme descrito abaixo.

### FONTES PRÉ-ANALÍTICAS DE INCERTEZA

- + Colheita e armazenamento de amostras antes do teste
  - O ensaio só foi validado em certos dispositivos de colheita e certos tipos de meios de transporte. Por exemplo, o meio de transporte pode conter Tiocianato de guanidina e, portanto, essas amostras não podem ser usadas se o procedimento de extracção de ácido nucleico fizer uso de Hipoclorito de sódio, como o gás cianeto será produzido quando o meio de transporte contendo Tiocianato de guanidina for exposto a lixívia.
  - As zaragatoas com manchas de sangue inibem a reacção de PCR.
  - Amostras colheitadas usando o dispositivo de colheita errado. Por exemplo, amostras colhidas usando zaragatoas de Alginato de cálcio, zaragatoas com ponta de algodão ou zaragatoas com hastes de madeira não são adequadas para uso com o teste de SARS-CoV-2.
  - As amostras colhidas fora da fase virêmica podem resultar em falsos negativos devido ao nível de RNA viral estar abaixo do LdD do ensaio.
  - Amostras entregues com atraso ou armazenadas incorrectamente antes do teste, ou seja, amostras com mais de 5 dias ou que não foram aliquotadas em frascos criogênicos e congeladas a ou abaixo de -70°C antes do teste, podem resultar em falsos negativos devido à degradação do RNA.

## FONTES ANALÍTICAS DE INCERTEZA

Falsos negativos podem surgir de:

- + Colheita de amostra inadequada.
- + Degradação de RNA
  - Degradação do RNA viral durante o transporte e/ou armazenamento.
  - Degradação por RNAses se os inibidores de RNase não foram adicionados à etapa de Transcriptase Reversa.
- + O uso de extracção ou reagentes de PCR não autorizada.
- + A presença de inibidores de PCR-TR.
- + Mutações no vírus SARS-CoV-2.
- + Falha em seguir os procedimentos operacionais padrão
- + O uso de pessoal não totalmente treinado ou competente.

Falsos positivos podem surgir da:

- + Contaminação
  - Contaminação cruzada durante o manuseio ou preparação da amostra.
  - Contaminação cruzada entre amostras de pacientes.
  - Mistura de amostra.
  - Contaminação de RNA durante o manuseio do reagente e/ou componente de PCR se *AmpErase UNG* não for usado.
  - O uso de luvas com pó e pontas de pipeta não filtradas.

Limites de Interpretação

- + O *software* usado para avaliar os dados pode estar desatualizado.

Limite de detecção (LdD)

- + O ensaio depende da quantidade de material de amostra inicial necessária (por exemplo, um mínimo de 700ul) ou da quantidade de amplicon adicionada à etapa de detecção.

Especificidade analítica

- + Um resultado negativo para qualquer teste de PCR não exclui conclusivamente a possibilidade de infecção.
- + O teste não pode descartar doenças causadas por outros patógenos.

## GARANTIA DE QUALIDADE PARA TESTES DE PCR

A garantia de qualidade é uma componente crítica dos testes de laboratório para serviços de diagnóstico para COVID-19. É essencial que cada amostra seja manipulada (desde o momento da colheita até o recepção no laboratório), processada, amplificada e detectada e os resultados registrados e relatados de acordo com os POPs do laboratório. Cada uma dessas etapas é examinada com frequência por meio de actividades de GQ, incluindo:

- + O tempo de transporte da amostra é monitorado verificando o tempo de colheita com o tempo de recepção, e a caixa do refrigerador e ou de transporte de amostras biológicas, se usada, é verificada para ver se as bolsas de gelo estão frias



- + Discrepâncias em relação a amostras e documentação de amostra são rastreadas (para fins de ICD) e resolvidas em tempo hábil.
- + Os instrumentos do laboratório são usados, mantidos e calibrados de acordo com os POPs do laboratório
- + O pessoal do laboratório é devidamente treinado antes de manusear as amostras sem supervisão. Demonstrações de capacidade podem ser usadas para documentar competência
- + A recuperação do RNA viral é monitorada através do uso dum controlo positivo conhecido no procedimento de extracção / processamento da amostra
- + O desempenho da extracção e dos reagentes de PCR é monitorado pelo teste de controlo da qualidade dos reagentes com uma carga viral conhecida
- + A precisão do teste de identificação do vírus de SARS-CoV-2 é monitorada através do uso de controlos positivos e negativos
- + A proficiência da precisão do teste e a competência técnica são monitoradas por meio de testes de amostras pontuadas num painel de teste de proficiência (TP) e avaliação externa da qualidade (AEQ)
- + Amostras de controlo interno da qualidade (CIQ) são analisadas da mesma maneira que amostras desconhecidas, são usadas para avaliar a validade dos resultados analíticos. Dados falsos negativos e falsos positivos para amostras de CQ são analisados rotineiramente
- + O número de resultados inválidos são examinados diariamente, investigados e rastreados para dados de tendências
- + Os processos de acção correctiva são iniciados e utilizados conforme necessário para determinar a (s) causa (s) da raiz e garantir que erros específicos não sejam repetidos
- + Os dados e relatórios finais são registrados nos formulários ou sistemas controlados e são revisados por pelo menos um primeiro e um segundo revisor antes da aprovação final e do envio.

As medidas postas em prática para monitorar o desempenho do ensaio, bem como a frequência do mesmo, são feitas e determinadas internamente pelo próprio laboratório (conforme descrito acima) e por um provedor de serviços AEQ credenciado considerado competente para fornecer painéis TP externos de acordo com a ISO 17043 (20). Alguns exemplos de fornecedores de TP que podem fornecer painéis de SARS-CoV-2 estão incluídos no [Apêndice 7](#).

## INDICADORES DE QUALIDADE

Para monitorar a qualidade do laboratório, o laboratório deve desenvolver, implementar e manter vários indicadores de qualidade ou indicadores-chave de desempenho (ICDs). IQs / ICDs referem-se à colheita e análise de dados em cada etapa do processo de teste que podem servir como indicador para o desempenho correcto de todo o processo de teste. Os ICDs incluem o seguinte e devem ser analisados e relatados regularmente, pelo menos mensalmente:

- + Número de amostras testados, por tipo de amostra
- + Número (%) de resultados de teste positivos, negativos e inválidos
- + Taxa de rejeição de amostra
- + Número (%) de resultados de CIQ com falha
  - Desempenho de AEQ / TP (aprovação / reprovação ou % pontuação)
  - Tempo de resposta Laboratorial (TRL):
    - % Dos resultados relatados dentro do TRL
    - Média e intervalo de TRL

# CONCLUSÃO

Quando um novo vírus surge, como o SARS-CoV-2 fez em Dezembro de 2019, os laboratórios devem contar com métodos comprovados de desenvolvimento de testes de diagnóstico para atender às suas necessidades quando os ensaios comerciais não estiverem disponíveis. Esses EDLs raramente são perfeitos na primeira tentativa - muitas pessoas levam vários ciclos de tentativa, erro, validação e verificação antes que novos testes de diagnósticos sensíveis e específicos possam ser colocados em uso. Idealmente, esses testes continuam ao longo do caminho de desenvolvimento e validação até que sejam formalmente certificados para uso diagnóstico in vitro por um órgão regulador apropriado, como a Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos ou um organismo europeu notificado como a *TÜV Rheinland LGA*. A maioria dos EDLs não progride até o ponto de certificação formal para uso; no entanto, ainda devem ser mantidos com o mais alto padrão de qualidade possível para mitigar os impactos económicos e de saúde da doença emergente e ajudar a proteger nossas populações mais vulneráveis.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wang D, Xu W, Wu G, Gao GF, Tan W. 2020. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 382:727–733. <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2001017>
2. Wu C, Liu Y, Yang Y, Zhang P, Zhong W, Wang Y, Wang Q, Xu Y, Li M, Li X, Zheng M, Chen L, Li H. 2020. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharm Sin B* 10:766–788. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102550/>
3. 2019. Undiagnosed pneumonia - China (HU): RFI. ProMED-mail. <https://promedmail.org/promed-post/?id=6864153>
4. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>
5. Fomsgaard AS, Rosenstjerne MW. 2020. An alternative workflow for molecular detection of SARS-CoV-2 – escape from the NA extraction kit-shortage, Copenhagen, Denmark, March 2020. *Eurosurveillance* 25:2000398. <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.14.2000398>
6. SARS-CoV-2 Resources - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sars-cov-2/>
7. Molecular assays to diagnose COVID-19: Summary table of available protocols. <https://www.who.int/publications/m/item/molecular-assays-to-diagnose-covid-19-summary-table-of-available-protocols>
8. Nucleotide BLAST: Search nucleotide databases using a nucleotide query. [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?LINK\\_LOC=blasthome&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&PROGRAM=blastn](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?LINK_LOC=blasthome&PAGE_TYPE=BlastSearch&PROGRAM=blastn)
9. Primer validation For Optimum Assay Performance - PCR Guide | Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/assay-optimization-and-validation.html>
10. Food and Drug Administration. HDPCRTM SARS-CoV-2 Assay 2 of 28 COVID-19 Emergency Use Authorization Only-Instructions for Use HDPCRTM SARS-CoV-2 Assay. <https://www.fda.gov/media/138786/download>
11. Organização Internacional de Normalização. 2012. ISO 15189: Laboratórios médicos - Requisitos de qualidade e competência.
12. Basic Method Validation, 3rd Edition, FAQs - Westgard. <https://www.westgard.com/bmv3edfaqs.htm>
13. Armbruster DA, Pry T. 2008. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev* 29 Suppl 1:S49-52. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2556583>
14. Burd EM. 2010. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. American Society for Microbiology. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2901657/>
15. OMS. 2020. Testes laboratoriais para novos coronavírus 2019 (nCoV 2019) em casos humanos suspeitos. <https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>
16. OMS. 2004. Manual de biossegurança de laboratório, 3ra ed. Geneva. <https://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>
17. Dieffenbach CW, Dveksler GS. 1993. Setting up a PCR laboratory. *PCR Methods Appl*. <https://genome.cshlp.org/content/3/2/S2.full.pdf+html>
18. Mifflin TE. Setting Up a PCR Laboratory. <http://www.dnalc.org/resources/BiologyAnimationLibrary.htm>
19. OMS. 2016. Estabelecimento do Laboratório de PCR em países em desenvolvimento. Índia. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/249549>
20. Organização Internacional de Normalização. 2010. ISO/IEC 17042: Avaliação de conformidade - requisitos gerais para ensaios de proficiência.

# APÊNDICES

- Apêndice 1:** Seleção de kits de extração de RNA e sistemas automatizados
- Apêndice 2:** Equipamento Mínimo Requerido
- Apêndice 3:** Seleccione os fabricantes de sistemas de PCR-TR em tempo real
- Apêndice 4:** Selecione os conceptores e sintetizadores de iniciadores e de sondas
- Apêndice 5:** Selecione Fornecedores de Master Mix
- Apêndice 6:** Práticas de Prevenção de Contaminação
- Apêndice 7:** Selecione Provedores de Teste de Proficiência de COVID-19

**Isenção de responsabilidade:** os sistemas, fornecedores, serviços e produtos listados nestes apêndices são uma pequena amostra dos recursos disponíveis para compra e distribuição global. As listas são fornecidas como uma conveniência e apenas para fins informativos; não constituem um endosso ou uma aprovação pelos autores de qualquer um dos produtos, serviços ou opiniões das corporações ou organizações listadas. Linhas adicionais são fornecidas nas tabelas para permitir que os usuários deste manual tomem nota de quaisquer sistemas, fornecedores ou produtos adicionais que eles usam ou com os quais estão familiarizados.

# APÊNDICE 1: SELECÇÃO DE KITS DE EXTRACÇÃO DE RNA E SISTEMAS AUTOMATIZADOS

## Kits de extracção manual

Fabricante	Kit de exemplo	O site
Beckman Coulter	RNAadvance Viral	<a href="https://www.beckman.com/reagents/genomic/rna-isolation/viral">https://www.beckman.com/reagents/genomic/rna-isolation/viral</a>
Invitex Molecular	Invisorb Spin Virus RNA Mini Kit	<a href="https://www.invitex-molecular.com/products/infectious-diseases.html">https://www.invitex-molecular.com/products/infectious-diseases.html</a>
Qiagen	QIAamp Viral RNA Mini Kit	<a href="https://www.qiagen.com/us/products/diagnostics-and-clinical-research/sample-processing/qiaamp-viral-rna-mini-kit/#orderinginformation">https://www.qiagen.com/us/products/diagnostics-and-clinical-research/sample-processing/qiaamp-viral-rna-mini-kit/#orderinginformation</a>
Roche	High Pure	<a href="https://lifescience.roche.com/en_us/search-results.html?searchTerm=high%20pure">https://lifescience.roche.com/en_us/search-results.html?searchTerm=high%20pure</a>
Thermo Fisher Scientific	PureLink™ RNA Mini Kit	<a href="https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/rna-extraction/rna-types/total-rna-extraction/purelink-rna-mini-kit.html">https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/rna-extraction/rna-types/total-rna-extraction/purelink-rna-mini-kit.html</a>
Takara	NucleoSpin/ NucleoMag Virus	<a href="https://www.takarabio.com/products/nucleic-acid-purification/viral-dna-and-rna-purification-kits">https://www.takarabio.com/products/nucleic-acid-purification/viral-dna-and-rna-purification-kits</a>

## Sistemas de extracção automatizados

Fabricante	Sistema	O site
bioMérieux	NUCLISENS® easyMAG®	<a href="https://www.biomerieux-usa.com/clinical/nuclisens-easymag">https://www.biomerieux-usa.com/clinical/nuclisens-easymag</a>
Perkin Elmer	Chemagi Prepito®	<a href="https://www.perkinelmer.com/product/chemagic-prepito-2022-0030">https://www.perkinelmer.com/product/chemagic-prepito-2022-0030</a>
Qiagen	EZ1 Advanced XL, QIAcube, QIASymphony	<a href="https://www.qiagen.com/us/products/instruments-and-automation/nucleic-acid-purification/">https://www.qiagen.com/us/products/instruments-and-automation/nucleic-acid-purification/</a>
Roche	MagNA Pure	<a href="https://lifescience.roche.com/en_us/brands/magnapure.html#magna-pure-systems">https://lifescience.roche.com/en_us/brands/magnapure.html#magna-pure-systems</a>
Thermo Fisher Scientific	KingFisher	<a href="https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/automated-purification-extraction/kingfisher-instruments.html">https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/automated-purification-extraction/kingfisher-instruments.html</a>



## APÊNDICE 2: EQUIPAMENTO MÍNIMO REQUERIDO

Pré-amplificação	Extração de ácido nucléico	Amplificação e detecção
Micropipetas dedicadas	Micropipetas dedicadas	Micropipetas dedicadas
Congelador de -20°C	Congelador de -20°C	Congelador de -20°C
Estação de trabalho de PCR (caixa de “ar morto” ou fluxo laminar)	Cabine de Segurança Biológica (classe II A2, classe II B2, classe II C1 ou classe III) ou porta-luvas portátil de pressão negativa	Cabine de Segurança Biológica (classe II A2, classe II B2 ou classe II C1)
Vortex	Vortex	Sistema de PCR em tempo real
Microcentrifuge	Sistema automatizado de extração de ácido nucleico ou microcentrífuga (preferencialmente tampa de contenção de aerossol)	Termociclador padrão (gradiente de temperatura preferido)
		Sistema de eletroforese em gel (fonte de alimentação, câmara de execução, bandeja de fundição e pentes ou géis pré-fabricados)
		Microondas (se estiver preparando géis próprios)
		Equilíbrio (se estiver preparando géis próprios)
		Mesa de luz UV ou sistema de imagem em gel

# APÊNDICE 3: SELECCIONE OS FABRICANTES DE SISTEMAS DE PCR-TR EM TEMPO REAL

Fabricante	Sistema de exemplo	O site
Agilent	Mx3000P	<a href="https://www.agilent.com/en/product/real-time-pcr-(qpcr)/real-time-pcr-(qpcr)-plastics-supplies/plastics-supplies-for-mx3000p-3005p-qpcr-system/mx3000p-qpcr-system-232710">https://www.agilent.com/en/product/real-time-pcr-(qpcr)/real-time-pcr-(qpcr)-plastics-supplies/plastics-supplies-for-mx3000p-3005p-qpcr-system/mx3000p-qpcr-system-232710</a>
Applied Biosystems	ABI 7500/7500 Fast Dx, QuantStudio	<a href="https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-instruments.html">https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-instruments.html</a>
Bio Molecular Systems	Mic	<a href="https://biomolecularsystems.com/mic-qpcr/">https://biomolecularsystems.com/mic-qpcr/</a>
Bio-Rad	CFX96	<a href="https://www.bio-rad.com/en-us/category/real-time-pcr-detection-systems?ID=059db09c-88a4-44ad-99f8-78635d8d54db">https://www.bio-rad.com/en-us/category/real-time-pcr-detection-systems?ID=059db09c-88a4-44ad-99f8-78635d8d54db</a>
Roche	LightCycler 2.0, LightCycler 96	<a href="https://lifescience.roche.com/en_us/brands/realtime-pcr-overview.html#qpcr-instruments">https://lifescience.roche.com/en_us/brands/realtime-pcr-overview.html#qpcr-instruments</a>

# APÊNDICE 4: SELECCIONE OS CONCEPTORES E SINTETIZADORES DE INICIADORES E DE SONDAS

## Apenas a Concepção do Iniciador

Nome da empresa	O site
Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (Estados Unidos)	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a>

## Concepção e síntese de iniciadores e sondas

Nome da empresa	O site
BioCat	<a href="https://www.biocat.com/genomics/real-time-pcr-custom-probes-and-primers">https://www.biocat.com/genomics/real-time-pcr-custom-probes-and-primers</a>
Eurofins Genomics	<a href="https://www.eurofinsgenomics.eu/en/dna-rna-oligonucleotides/">https://www.eurofinsgenomics.eu/en/dna-rna-oligonucleotides/</a>
Eurogentec	<a href="https://www.eurogentec.com/en/custom-manufacturing">https://www.eurogentec.com/en/custom-manufacturing</a>
GenScript	<a href="https://www.genscript.com/molecular-biology-service.html?src=pullmenu">https://www.genscript.com/molecular-biology-service.html?src=pullmenu</a>
IDT	<a href="https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index">https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index</a>
OriGene	<a href="https://www.origene.com/products/gene-expression/qpcr/primer-pairs">https://www.origene.com/products/gene-expression/qpcr/primer-pairs</a>
Sigma Aldrich	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/oligoarchitect-online.html">https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/oligoarchitect-online.html</a>
Thermo Fisher Scientific	<a href="https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/oligonucleotides-primers-probes-genes/applied-biosystems-custom-primers-probes.html">https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/oligonucleotides-primers-probes-genes/applied-biosystems-custom-primers-probes.html</a>
Tib MolBiol	<a href="https://www.tib-molbiol.com/">https://www.tib-molbiol.com/</a>

## APÊNDICE 5: SELECCIONE FORNECEDORES DE MASTER MIX

Nome	O site
Bio-Rad	<a href="https://www.bio-rad.com/en-us/category/pcr-reagents-qpcr-reagents?ID=M87EKA15">https://www.bio-rad.com/en-us/category/pcr-reagents-qpcr-reagents?ID=M87EKA15</a>
GeneOn	<a href="https://www.geneon.net/products/rt-pcr-reverse-transcription/lyophilized-mastermix-for-rt-pcr-1/">https://www.geneon.net/products/rt-pcr-reverse-transcription/lyophilized-mastermix-for-rt-pcr-1/</a>
Norgen Biotek	<a href="https://norgenbiotek.com/category/pcr-mastermix">https://norgenbiotek.com/category/pcr-mastermix</a>
Promega	<a href="https://www.promega.com/products/pcr/">https://www.promega.com/products/pcr/</a>
Takara	<a href="https://www.takarabio.com/products/pcr/pcr-master-mixes">https://www.takarabio.com/products/pcr/pcr-master-mixes</a>
Techne	<a href="http://www.techne.com/product.asp?dsl=7085">http://www.techne.com/product.asp?dsl=7085</a>
Thermo Fisher Scientific	<a href="https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-reagents/one-step-real-time-rt-master-mix.html">https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-reagents/one-step-real-time-rt-master-mix.html</a>

# APPENDIX 6: PRÁTICAS DE PREVENÇÃO DE CONTAMINAÇÃO

## ÁREA 1: ÁREA DE PRÉ-AMPLIFICAÇÃO

### As seguintes precauções são recomendadas:

- + Fluxos de trabalho diários devem ser planeados para garantir que não haja reentrada na Área 1 se as Áreas 2 ou 3 forem entradas.
- + Absolutamente nenhuma amostra ou amplicon deve ser trazida ou autorizado a entrar nesta sala.
- + Nenhum reagente removido desta sala deve ser trazido de volta para esta sala.
- + Nenhum celular/laptop / pertences privados deve ser trazido ou usado nesta sala.
- + Pipetas e outros instrumentos necessários devem ser sempre mantidos nesta área e usados exclusivamente para actividades de pré-PCR.
- + Cada componente deve ser colocado de lado antes de trabalhar com o próximo componente para evitar a contaminação do componente anterior com soluções subsequentes.
- + Se efectuadas várias rodadas de PCRs em várias plataformas devem ser realizadas no mesmo dia, todos os master mixes devem ser preparadas consecutivamente e levadas para a área de adição do modelo.
- + Todos os materiais de limpeza e vassouras para esta sala devem ser armazenados nesta sala
- + A equipa de limpeza de rotina do laboratório não deve ter acesso a esta sala, para que contaminantes de outras áreas não sejam rastreados inadvertidamente.

### Limpeza semanal da sala de pré-amplificação

- + No final de cada semana, a sala de pré-amplificação deve ser cuidadosamente limpa
- + A limpeza deve ser de cima para baixo, começando pelos tampo das bancadas e terminando no chão.
- + Uma vez que as superfícies superiores tenham sido limpas, o chão deve ser varrido com uma vassoura.
- + O chão deve ser esfregado com Hipoclorito de sódio a 1%, primeiro usando a lixívia diluída restante e, em seguida, preparando mais hipoclorito de sódio a 1%, se necessário.
- + Limpe o esfregão com água corrente.
- + Pulverize e esfregue o chão com álcool a 70%.

### Limpeza de tampo de bancada, incluindo pipetas e equipamentos de PCR

#### Método diário:

- + Vista roupas de protecção, máscara e luvas.
- + Limpe os tampo das bancadas e o equipamento de PCR cuidadosamente antes de terminar o trabalho nesta sala.
- + Conforme indicado acima, use Hipoclorito de sódio a 1% primeiro, seguido após um intervalo de 30 segundos por etanol a 70%.
- + Após a limpeza, os master mixes para o dia devem ser preparadas.
- + Assim que os reagentes forem preparados, as superfícies e o equipamento de PCR devem ser limpos novamente.

## ÁREA 2: ÁREA DE EXTRACÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO

### Limpeza semanal

- + No final de cada semana, a área de extracção de ácido nucleico deve ser cuidadosamente limpa.
- + A limpeza deve ser de cima para baixo, começando pelos tamos das bancadas e terminando no chão.
- + Uma vez que as superfícies superiores tenham sido limpas, o chão deve ser varrido com uma vassoura.
- + O chão deve ser esfregado com Hipoclorito de sódio a 1%, primeiro usando a lixívia diluída restante e, em seguida, preparando mais Hipoclorito de sódio a 1%, se necessário.
- + Limpe o esfregão com água corrente.
- + Pulverize e esfregue o chão com álcool a 70%.

### Cabine de Segurança Biológica (CSB)

#### Método diário:

- + Vista roupas de protecção, máscara e luvas.
- + Limpe o CSB completamente antes e depois de cada lote de amostras.
- + Hipoclorito de sódio a 1% deve ser usado primeiro, seguido por etanol a 70% após um intervalo de 30 segundos.
- + Limpe o painel de vidro também. Desligue a luz do capô após a limpeza.

#### Método semanal:

- + Vista roupas de protecção, máscara e luvas.
- + Prepare papel ou toalhas de rolo suficientes com hipoclorito de sódio a 1% e etanol a 70%.
- + Remova a superfície de trabalho interna da CSB e limpe-a e todo o interior da CSB com Hipoclorito de sódio a 1% e etanol a 70% conforme descrito acima.
- + A janela de vidro do exaustor deve ser limpa para garantir que todas as manchas no vidro sejam eliminadas.
- + Substitua a superfície de trabalho interna de metal da CSB.
- + Após a limpeza ser concluída, execute um teste de fumaça para garantir que a CSB está funcionando correctamente, ou seja, a fumaça deve ser “sugada” para as aberturas e NÃO escapar para o ambiente externo.



## ÁREA 3: ÁREA (S) DE AMPLIFICAÇÃO E DETECÇÃO

### Limpeza semanal da área (s) de amplificação

- + No final de cada semana, a sala de amplificação deve ser cuidadosamente limpa.
- + A limpeza deve ser de cima para baixo, começando pelos tampo das bancadas e terminando no chão.
- + Uma vez que as superfícies superiores tenham sido limpas, o chão deve ser varrido com uma vassoura.
- + O chão deve ser esfregado com hipoclorito de sódio a 1%, primeiro usando a lixívia diluída restante e, em seguida, preparando mais Hipoclorito de sódio a 1%, se necessário.
- + Limpe o esfregão com água corrente.
- + Pulverize e esfregue o chão com álcool a 70%.
- + As pontas usadas, os tubos de PCR completos e as placas de 96 poços devem ser colocados em baldes de resíduos apropriados e autoclavados para destruir qualquer amplicon contaminante.

### Bancadas incluindo termociclador, pipetas e equipamento de PCR

#### Método diário:

- + Vista roupas de protecção, máscara e luvas.
- + Limpe os tampo das bancadas e o equipamento de PCR completamente antes de terminar o trabalho nesta sala.
- + Conforme indicado acima, use Hipoclorito de sódio a 1% primeiro, seguido após um intervalo de 30 segundos por etanol a 70%.
- + Adicione cuidadosamente o material do modelo a cada tubo de reacção e coloque os tubos no termociclador ou vede a placa de 96 poços com folha de plástico e insira a placa selada no termociclador.
- + Após iniciar a execução do termociclador, limpe as bancadas e o equipamento de PCR conforme acima.

### Termociclador (máquina PCR)

#### Método semanal:

- + Vista roupas de protecção, máscara e luvas.
- + Limpe completamente o exterior do termociclador.
- + Use Hipoclorito de sódio a 1% seguido após um intervalo de 30 segundos por etanol a 70%.

## APÊNDICE 7: SELECCIONE PROVEDORES DE TESTE DE PROFICIÊNCIA DE COVID-19

Nome	O site
Colégio de Patologistas Americanos	<a href="https://www.cap.org/laboratory-improvement/international-laboratories/external-quality-assurance-proficiency-testing-for-international-laboratories">https://www.cap.org/laboratory-improvement/international-laboratories/external-quality-assurance-proficiency-testing-for-international-laboratories</a>
Instand (other coronaviruses)	<a href="https://www.instand-ev.de/en/eqas/eqa-program.html">https://www.instand-ev.de/en/eqas/eqa-program.html</a>
Oneworld Accuracy	<a href="https://www.oneworldaccuracy.com/1wa/#/covid-19">https://www.oneworldaccuracy.com/1wa/#/covid-19</a>
Randox/ QCMD	<a href="https://www.randox.com/coronavirus-qcmd/">https://www.randox.com/coronavirus-qcmd/</a>