

FERNANDA MARIA  
FERNANDES DOS  
SANTOS MIGUEL

**IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO  
DO PROCEDIMENTO  
LABORATORIAL POR *PCR* EM  
TEMPO REAL PARA DIAGNÓSTICO  
DO COVID-19, NOS LABORATÓRIOS  
DA ESTBARREIRO/IPS**

Relatório de Estágio do Mestrado em  
Engenharia Biológica e Química

**ORIENTADORA**

Professora Doutora Marta Sofia Guedes de  
Campos Justino

**COORIENTADORA**

Professora Doutora Maria de Fátima Nunes  
Serralha

Dezembro 2022

FERNANDA MARIA  
FERNANDES DOS  
SANTOS MIGUEL

**IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO  
DO PROCEDIMENTO  
LABORATORIAL POR *PCR* EM  
TEMPO REAL PARA DIAGNÓSTICO  
DO COVID-19, NOS LABORATÓRIOS  
DA ESTBARREIRO/IPS**

**JÚRI**

*Presidente: Professora Doutora Maria de Lurdes de Figueiredo Gameiro, Escola Superior de Tecnologia do Barreiro, Instituto Politécnico de Setúbal*

*Orientadora: Professora Doutora Marta Sofia Guedes de Campos Justino, Escola Superior de Tecnologia do Barreiro, Instituto Politécnico de Setúbal*

*Vogal: Professora Doutora Leonilde Morais Moreira, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa*

Dezembro 2022

Minha querida Avó Maria, dedico-te este relatório, por todo o amor e carinho que todos os dias me transmites, tornando-me na pessoa que sou hoje. No dia que nasci fui o teu melhor presente de aniversário, e tu, todos os dias, és o meu.

*Na vida, não existe nada a temer, mas a entender*

*Marie Curie*



## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente quero agradecer ao Sr<sup>o</sup> Presidente do Instituto Politécnico de Setúbal, Professor Doutor Pedro Dominginhos, pela iniciativa da criação do IPS COVID Lab, pois valoriza a nossa instituição e conseqüentemente a nossa escola.

Agradecer também à Professora Dr<sup>a</sup> Marta Justino por todo o acompanhamento, incentivo e pela liberdade que nos deu para que pudéssemos pensar e aprofundar conhecimentos. À Professora Dr<sup>a</sup> Gabriela Gomes, mesmo estando menos presente, sempre nos ajudou quando foi necessário. Às duas agradeço o carinho que tiveram connosco ao longos destes meses.

À Professora Dr<sup>a</sup> Fátima Serralha, que mesmo alterando o tema deste relatório, sempre continuou a me apoiar e esteve disponível para qualquer assunto, mesmo não sendo a sua área de formação.

Às minhas colegas de laboratório, Beatriz Santos, Joana Barros e Raquel Baleizão, por todo o trabalho em equipa, companheirismo e acima de tudo amizade. Foi um prazer poder fazer parte desta equipa.

Por fim e não menos importante, agradecer à minha família, e amigos, por todo o amor e carinho que me deram, pois sem o apoio das pessoas que gostamos, tudo se torna mais difícil.



## **RESUMO**

O presente documento descreve as atividades desenvolvidas no IPS COVID Lab, implementado nos laboratórios da Escola Superior de Tecnologia do Barreiro do Instituto Politécnico de Setúbal (ESTBarreiro/IPS), ao qual foi validado o procedimento obtendo o certificado pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA).

Aborda o desenvolvimento da técnica de Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) para o diagnóstico da COVID-19, provocando pelo vírus SARS-CoV-2. Esta técnica foi estudada para uso de uma versão simplex (uso de um único tipo de sonda por reação) e versão multiplex (uso de vários tipos de sondas por reação). Ambas permitem detetar a presença do RNA do vírus em amostras biológicas nasofaríngeas e orofaríngeas, conseguindo assim, identificar indivíduos que tenham ou não a presença de zonas específicas do código genético do vírus (alvos virais N1 e N2).

Com este estudo conclui-se que é possível utilizar sondas simplex e multiplex para a deteção do vírus SARS-CoV-2, contudo, em multiplex, deverá ser utilizado apenas os alvos N1 e N2, pois em triplex existe competição de recurso que pode dar falsos resultados.

Também foi possível resolver problemas que foram aparecendo com a implementação do laboratório, como reações inespecíficas no alvo N2 e amplificação dos controlos negativos do alvo RP.

**PALAVRAS-CHAVE:** COVID-19; MULTIPLEX; RT-QPCR, SARS-COV-2, SIMPLEX



## **ABSTRACT**

This report describes the activities developed at IPS COVID Lab, implemented in the laboratories of Escola Superior de Tecnologia do Barreiro do Instituto Politécnico de Setúbal (ESTBarreiro/IPS). In these facilities a procedure was validated obtaining a certification provided by Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA).

The development of the Polymerase Chain Reaction technique in real time (RT-qPCR) for the COVID-19 diagnosis caused by the SARS-COV-2, is presented in this thesis. This technique was studied to be used in a simplex version (usage of one single reaction probe) and in a multiplex version (usage of several reaction probe types). Both methods allow to detect the virus RNA in nasopharyngeal and oropharyngeal biological samples, identifying those individuals who have parts of the genetic code of the virus (viral targets N1 and N2).

This study proves that it is possible to use simplex and multiplex probes to detect the SARS-CoV-2 virus even though the multiplex must be used only on N1 and N2 targets, considering that in triplex exists competition for the resources originating misleading results.

When implementing the laboratory some issues occurred, such as unspecific reactions on N2 target and amplification of negative controls on RP target.

**KEYWORDS:** COVID-19; MULTIPLEX; RT-QPCR, SARS-COV-2, SIMPLEX



## ÍNDICE GERAL

Agradecimentos .....	i
Resumo.....	iii
Abstract.....	v
<b>1. INTRODUÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>1</b>
1.1. Coronavírus.....	3
1.2. Estrutura e Genoma do SARS-CoV-2.....	5
1.2.1. Variabilidade do genoma do SARS-CoV-2 .....	7
1.3. Propagação do SARS-Cov-2 .....	13
1.4. infecção do SARS-Cov-2.....	15
1.5. Testes e amostras para detecção da COVID-19 .....	16
1.5.1. PCR, RT-PCR, qPCR e RT-qPCR.....	20
1.5.2. PCR Multiplex.....	29
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
2.1. Instalações e Circuito .....	31
2.2. Preparação de amostra e Extração de RNA Viral .....	32
2.3. Detecção do SARS-CoV-2 por RT-qPCR, Método Padrão ou <i>Simplex</i> .....	33
2.4. <i>Desenvolvimento de um Protocolo Multiplex para detecção do SARS-CoV-2</i> .....	36
2.4.1. <i>Primers</i> e sondas multiplex para alvos genómicos RP, N1 e N2.....	36
2.4.2. Avaliação de Reações RT-qPCR em <i>Multiplex</i> .....	37
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
3.1. Implementação e Certificação do método Padrão (Simplex) para detecção de RNA Viral do SARS-CoV-2 .....	39
3.1.1. Interpretação de resultados e diagnóstico .....	39

3.1.2.	Troubleshooting .....	43
3.1.3.	Limites de deteção e eficiência .....	45
3.1.4.	Certificação.....	47
3.2.	Avaliação protocolo multiplex para alvos genómicos RP, N1 e N2.....	49
3.2.1.	Comparação dos limites de deteção e eficiência .....	49
3.2.2.	Avaliação do limite de deteção de reações em multiplex .....	50
3.2.3.	Reprodutibilidade em reações em Multiplex.....	51
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>55</b>
<b>5.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>57</b>
<b>6.</b>	<b>Anexo 1.....</b>	<b>63</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 – Casos confirmados de COVID-19 no mundo a 26 de Dezembro de 2020, reportando por intensidade de cores os locais de maior contágio. .... 2
- Figura 2 – Evolução pandémica da COVID-19 em Portugal, até ao dia 9 de agosto de 2021. O gráfico superior indica o número de casos confirmados de infeção e o de baixo, o número de mortes. Os valores totais são apresentados à esquerda. .... 2
- Figura 3 - Evolução pandémica da COVID-19 em Portugal, até ao dia 17 de outubro de 2022. O gráfico superior indica o número de casos confirmados de infeção e o de baixo, o número de mortes. Os valores totais são apresentados à esquerda. .... 3
- Figura 4 - Observação de coronavírus em microscopia eletrónica de transmissão em 1975. 3
- Figura 5 - Representação dos últimos três coronavírus que infetam humanos, desde o primeiro que apareceu e as suas derivantes. .... 4
- Figura 6 – Esquematização da Taxionomia do SARS-CoV-2, onde representa a sua ordem, família, subfamília e género. .... 5
- Figura 7 (A e B) – Representação da estrutura do SARS-CoV-2. (A) Representação da superfície do vírus. (B) Esquema da composição do vírus. Em ambas estão identificadas as proteínas constituintes: a proteína M (membrana), a proteína S (Spike) e a proteína E (envelope). Na figura B está identificada a proteína N (nucleocapsídeo), associada ao RNA do genoma viral. .... 6
- Figura 8 – *Representação do genoma do SARS-CoV-2, indicando as regiões que codificam proteínas estruturais (S, E, M e N), as ORF1a e ORF1b que codificam as proteínas não estruturais (nsp1-16) e as ORFs que codificam proteínas acessórias.* A representação foi feita com base no genoma de referência sequenciado do SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 (sequência nº NC\_045512.2 da NCBI). No topo encontra-se a escala da sequência. Os retângulos representam as ORFs conforme a anotação da NCBI, e entre parêntesis é indicado o número de resíduos de aminoácidos (aa). Retângulos a preto representam as proteínas estruturais. As ORFs a azul correspondem a genes hipotéticos, não anotados pela NCBI. .... 7
- Figura 9 – Diversidade genómica do vírus SARS-CoV-2, desde dezembro de 2019 até julho de 2021. A cinza encontram-se as primeiras variações, a azul a variação Alfa, a azul escuro a variação Beta, a azul claro a variação Gamma, a verde água a variação Delta, a Laranja a

variação Lota e a vermelho a variação Lambda que são as representadas com maior expressão.....	8
Figura 10 – Distribuição dos genomas do SARS-CoV-2 pelo mundo, em julho de 2021 consoante as variantes e respetivas cores.....	8
Figura 11 - Distribuição dos genomas do SARS-CoV-2 pelo mundo, em abril de 2022 consoante as variantes e respetivas cores.....	9
Figura 12 - Evolução temporal das variantes em circulação no mundo desde janeiro de 2020 até abril de 2022 .....	9
Figura 13 – Estudo da variabilidade genómica ao longo do tempo em Portugal, onde a cinza estão representados os genomas 19A, 20A, 20E, a azul está representado o genoma 20I, a verde o genoma 21J e a laranja o genoma 21K e 21L. ....	10
Figura 14 - Representação da frequência das variantes em Portugal entre a semana 22 de 2021(31 de maio) até a semana 13 de 2022 (3 de abril de 2022) .....	10
Figura 15 – exemplificação da transmissão de COVID-19 através de gotículas que contém partículas virais.....	13
Figura 16 - Medidas preventivas a ter para combate e prevenção da COVID-19.....	14
Figura 17 – Representação do ciclo infeção do SARS-CoV-2 na célula do hospedeiro, desde a sua entrada na célula, replicação, transcrição, produção de proteínas e saída da célula de novas partículas virais capazes de infetar outra.....	15
Figura 18 – Representação simplificada dos testes existentes para deteção do SARS-Cov-2 <sup>44</sup> .....	16
Figura 19 – Recolha de amostras nasofaríngeas e orofaríngeas. ....	17
Figura 20 – Representação da presença de RNA viral em amostras ao longo do tempo, mostrando se o RNA é infeccioso ou não . ....	18
Figura 21 - Esquematização simplificada dos testes de RT-qPCR.....	19
Figura 22 - Ligação dos primers 1 e 2 na região de interesse da cadeia molde. ....	20
Figura 23 – Extensão dos primers e síntese das novas cadeias. ....	21
Figura 24 – Representação das três etapas da técnica de PCR. ....	22

Figura 25 – Representação da amplificação exponencial do DNA presente na amostra, em cada ciclo.....	23
Figura 26 - Diferença entre as técnicas de RT-PCR, qPCR e RT-qPCR. A – Descreve a transcrição reversa, para obtenção de cDNA; B – Descreve quantificação em tempo real da amplificação de cadeias molde; C- Junção do método A e B, conseguindo assim transcreever RNA para cDNA e quantificar as cadeias amplificadas. ....	24
Figura 27 – Esquematização do processo de ligação da sonda a cadeia molde, e da emissão de fluorescência aquando da degradação da sonda feita pela DNA polimerase. ....	25
Figura 28 – Definição do Cp numa curva de fluorescência de qPCR, onde o ponto verde é o crossing point, representando o momento para o qual é detetado o valor mínimo definido para à qual a fluorescência é detetada (limite threshold). ....	26
Figura 29 – Genoma do SARS-CoV-2 com especificação dos alvos genómicos N1 e N2. As regiões alvo propostas pelo CDC estão marcadas a azul. Outros alvos propostos por outras entidades estão marcados a preto. ....	27
Figura 30 – Esquema da Localização dos <i>primers</i> e sonda do alvo N1 no genoma viral, obtido com o programa <i>Benchling</i> . ....	28
Figura 31 – Comprimentos de onda onde são detetados os fluoróforos FAM, SYBR Green I, Eva Green, JOE, HEX, Cy3, ROX e Cy5. Entre parêntesis está indicado o comprimento máximo de excitação e de emissão (em negrito). ....	30
Figura 32 – Representação do IPS COVID Lab, com o respetivo fluxo de trabalho. ....	31
Figura 33 - Distribuição dos equipamentos na sala de RT-qPCR nos laboratórios ....	32
Figura 34 – Esquema do processo de extração com os vários passos do processo, onde em 1 tem-se a amostra por purificar com etanol, em 2 realiza-se a centrifugação para o RNA ficar agregado à membrana, em 3 temos os processos de lavagens, em 4 a eluição do RNA presente na membrada da coluna e em 5 o RNA extraído.....	33
Figura 35 – Procedimento final do método padrão sintetizado.....	35
Figura 36 - Exemplificação das soluções mãe realizadas RP, N1 e N2 (da esquerda para a direita) .....	36
Figura 37 – Representação das diluições realizadas nesta atividade, com as suas respetivas concentrações de RNA viral.....	38

Figura 38 -Resultado da amplificação do produto alvo RP nas amostras A e B .....	41
Figura 39 - Resultado da amplificação do produto alvo N1 nas amostras A e B .....	41
Figura 40 - Resultado da amplificação do produto alvo N2 nas amostras A e B .....	42
Figura 41 – A - Resultados das amostras C a I, onde as amostras I e H são amostras positivas e as amostras F e C, bem como os controlos negativos apresentam reações inespecíficas; B - Resultados das amostras C a I, onde as amostras I e H são amostras positivas e as amostras restantes negativas, onde já não há verificação de reações inespecíficas.....	44
Figura 42 – Representação Gráfica da avaliação do Método Padrão em RNA vs Método padrão em água através de diluições sucessivas. ....	46
Figura 43 - Representação Gráfica da avaliação do Método Padrão em água vs Método simplex em água através de diluições sucessivas, para cada alvo genómico RP, N1 e N2.	49

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades das VOC que circulam na União europeia e no Espaço Económico Europeu (UE/EEE).....	11
Tabela 2 – <i>Primers</i> e sondas utilizados para a deteção por RT-qPCR do SARS-CoV-2 .....	29
Tabela 3 - Componentes da <i>mix</i> reacional.....	34
Tabela 4 – Programa de amplificação utilizado.....	35
Tabela 5 – Representação das sondas utilizadas para cada alvo genómico na técnica multiplex. ....	36
Tabela 6 – Volumes das soluções utilizadas para os diversos ensaio onde varia a utilização ou não dos alvos genéticos a analisar .....	37
Tabela 7 – Preparação da Master <i>Mix</i> para cada ensaio. ....	38
Tabela 8 – Interpretação dos resultados possíveis de obter nos testes para a presença de SARS-CoV-2 .....	40
Tabela 9 – Esquematização dos resultados das amostras A e B e dos respetivos controlos.....	42
Tabela 10 – Compilação das eficiencias e minimos de deteção para os dois métodos.....	47
Tabela 11 – Resultado das amostras enviadas para certificação do laboratório .....	48
Tabela 12 – Avaliação das Eficiencias por cada alvo em água (sondas padrão vs sondas simplex) .....	50
Tabela 13 – Avaliação dos ensaios multiplex (triplicados ou em duos) em diluições de RNA e água .....	51
Tabela 14 – Quantificação de resultados de amostras reanalisadas pelo método multiplex.....	52



## **SÍMBOLOS E ABREVIATURAS**

ACE2	Enzima conversora de angiotensina 2
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças (Estados Unidos)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Covid-19	Doença provocada pelo vírus SARS-CoV-2
Cp	Crossig point
Cp/ $\mu$ L	Cópias por microlitro
Ct	Cycle threshold
DGS	Direção Geral da saúde (Portugal)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECDC	Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ESTBarreiro/IPS	Escola Superior de Tecnologia do Barreiro do Instituto Politécnico de Setúbal
EU/EEE	União Europeia/ Espaço Económico Europeu
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IMM	Instituto de Medicina Molecular

INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
MERS-CoV	Coronavírus associado a síndrome respiratória do médio oriente, provoca a doença MERS
Mix	Mistura Reacional
N1	Região genómica do SARS-CoV-2, alvo de deteção nas reações de RT-qPCR
N2	Região genómica do SARS-CoV-2, alvo de deteção nas reações de RT-qPCR
NCBI	Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (Estados Unidos)
NIID	Instituto Nacional de doenças infecciosas do Japão
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	Open reading frame
PCR	Reação em cadeia da DNA polimerase
PLP	Papain-like protease
qPCR	Reação em cadeia da DNA polimerase quantitativa ou em tempo real
RdRp	RNA Polimerase
RNA	Ácido ribonucleico. Material genético do genoma do SARS-CoV-2
RP	Gene da Rnase P humana. Alvo de deteção usado como controlo de qualidade da extração de RNA
rRt-PCR	Teste rápidos de reação em cadeia da DNA polimerase, sucedido por uma etapa de transcrição reversa (em sistema fechado)
RT-PCR	Reação em cadeia da DNA polimerase, sucedido por uma etapa de transcrição reversa

RT-qPCR	Reação em cadeia da DNA polimerase, quantitativa em tempo real e precedida de transcrição reversa
SARS-CoV	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave, provoca a doença SARS
SARS-CoV-2	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave, provoca a doença COVID-19
sgRNAs	RNAs subgenômicos
SOP PCR	Procedimento Operacional Padrão e Avaliação de Riscos da Sala de PCR
TRag	Testes Rápidos de Antigene
VOC	Variantes de preocupação
VOI	Variantes de interesse
VUM	Variantes em monitorização
3CL	3C-like protéase
ERGIC	Retículo Endoplasmático - complexo de Golgi



# 1. INTRODUÇÃO TEÓRICA

No início de dezembro de 2019, em Wuhan, na China, ocorreu um pico de pneumonias graves. Para se tentar descobrir a sua causa e origem, foram colhidas amostras de pessoas que apresentavam a sintomatologia, a partir das quais isolaram um vírus e fizeram a sequenciação do genoma viral. A partir desta sequenciação foi determinado que esta doença seria provocada por um vírus da família Coronaviridae, pois apresentava uma identidade de aproximadamente 85% com outros coronavírus já existentes. Assim sendo, inicialmente este vírus foi denominado por *2019-nCoV*, e mais tarde, após vários estudos, foi alterado para *SARS-CoV-2* <sup>1-7</sup>.

O *SARS-CoV-2*, do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave), é a segunda variante existente do vírus SARS-CoV. Estes vírus são de origem zoonótica, ou seja, são normalmente encontrados em animais, neste caso em algumas espécies de morcegos e pangolins <sup>2,5</sup>.

Os indivíduos que são infetados com o vírus *SARS-CoV-2* são diagnosticados com *COVID-19*, nome que foi dado à doença (em inglês, *Coronavirus Disease* de 2019). Estas pessoas apresentam sintomas variados, costumam revelar-se no período de incubação entre 2 a 14 dias, e que incluem febre, tosse, mal-estar, dificuldades respiratórias, entre outros. A variabilidade dos sintomas é grande, e a Direção Geral da Saúde (DGS) tem atualizado a sintomatologia existente com frequência. Em casos graves, a infeção pode causar pneumonia, síndrome respiratória aguda grave, insuficiência renal e até morte. Também existem situações onde a infeção é assintomática e o paciente não apresenta qualquer sintoma, porém, mesmo não apresentando sintomas, pode transmitir o vírus, facto este que tem dificultado o controlo pandémico <sup>2</sup>.

Este vírus pode ser transmitido por via aérea, por contato direto com secreções infecciosas ou por aerossóis em procedimentos terapêuticos. Acredita-se que a transmissão ocorra durante uma exposição próxima com infetados através de tosse, espirros, que entrando em contato com os olhos, nariz e boca levam à infeção pelo mesmo. O vírus também pode permanecer viável no meio ambiente durante alguns dias, tendo em conta fatores externos que invalidem ou não a sua viabilidade <sup>2</sup>.

Por estes motivos, a doença propagou-se à escala mundial, apesar de terem sido implementadas diversas medidas de contenção, incluindo a ocorrência de confinamentos obrigatórios, o uso obrigatório de máscara, promoção do distanciamento social, entre outras medidas preventivas, aplicadas para tentar reduzir o impacto da COVID-19.

Segundo dados de dezembro de 2020 da Organização Mundial de Saúde (OMS), um ano após o aparecimento deste vírus, tinham sido infetadas 78 604 532 pessoas a nível mundial, tendo falecido 1 744 235. Os continentes mais afetados neste primeiro ano, foram a América do Norte e do Sul, e a Europa, como se pode observar na figura seguinte (Figura 1) <sup>8</sup>:

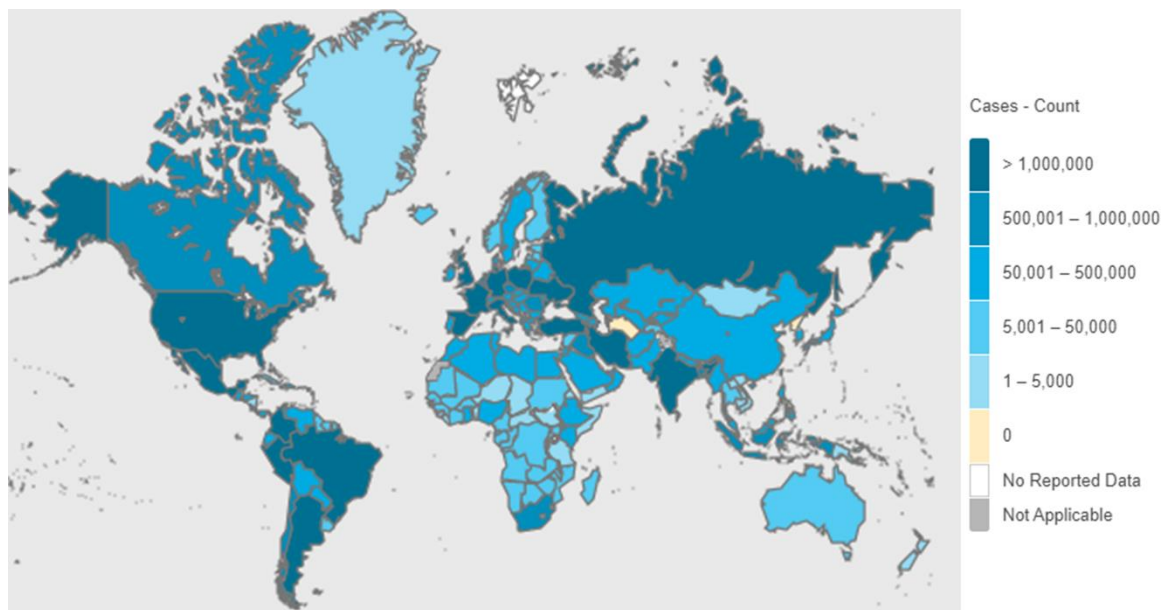


Figura 1 – Casos confirmados de COVID-19 no mundo a 26 de Dezembro de 2020, reportando por intensidade de cores os locais de maior contágio <sup>8</sup>.

No dia 9 de agosto de 2021, a OMS, tinha confirmado 202 608 306 casos e 4 293 591 mortes. Com o avançar das descobertas sobre este vírus, foram criadas várias vacinas, sendo que, até ao dia referido, foram vacinadas 4 033 274 676, o que corresponde aproximadamente a 51% da população mundial <sup>8</sup>.

Falando especificamente no caso de Portugal, foram registados os primeiros dois infetados no dia 2 de março de 2020, que marcaram o início da primeira vaga da doença, demonstrando o primeiro pico de casos visualizado na Figura 2. A primeira vaga teve um número de casos muito menor do que qualquer uma das seguintes. Na Figura 2 é possível também visualizar-se a segunda vaga, que teve início em setembro de 2020 e o seu pico a meio de novembro, a terceira vaga, que teve início entre o final de 2020 e o início de 2021, sendo o seu pico no final do mês de janeiro, e a quarta vaga, que teve início em junho.

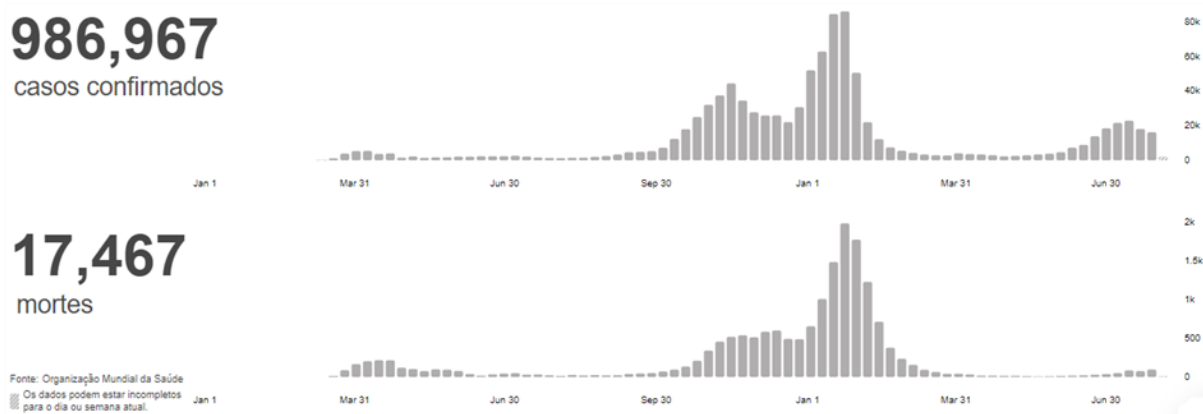


Figura 2 – Evolução pandémica da COVID-19 em Portugal, até ao dia 9 de agosto de 2021. O gráfico superior indica o número de casos confirmados de infeção e o de baixo, o número de mortes. Os valores totais são apresentados à esquerda <sup>8</sup>.

Desde dia 9 de agosto de 2021 até finais de outubro de 2022, a situação evoluiu bastante. A OMS confirmou 623 893 894 casos de infeção com COVID-19 (+ 421 285 588 que em agosto de 2021) e 6 553 936 mortes (+ 2 260 345 que em agosto de 2021). Em relação às campanhas de vacinação foram administradas 12 814 704 622 doses (+ 8 781 429 946 que em agosto de 2021). Esta informação demonstra que o número de infetados aumentou o dobro em relação a agosto de 2021, mas que isso não se traduziu no dobro de número de mortes, o que demonstra que a taxa de vacinação em toda a população mundial ou as variantes menos agressivas levaram nas vagas posteriores a um maior número de casos mas proporcionalmente a um menor número de mortes. <sup>8</sup>

Esta conclusões obtidas a nível mundial, também são idênticas ao que aconteceu em Portugal no mesmo período, como é possível verificar na Figura 3.

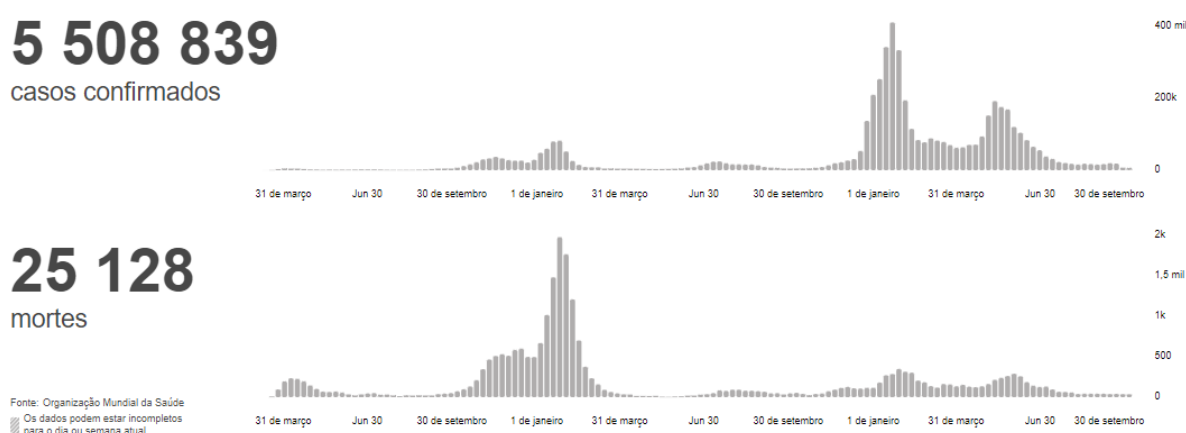


Figura 3 - Evolução pandémica da COVID-19 em Portugal, até ao dia 17 de outubro de 2022. O gráfico superior indica o número de casos confirmados de infeção e o de baixo, o número de mortes. Os valores totais são apresentados à esquerda <sup>8</sup>.

## 1.1. CORONAVÍRUS

Os coronavírus são um grupo de vírus identificados em meados de 1960. Taxonomicamente são reconhecidos por pertencerem à subfamília *Coronavirinae*, da família *Coronaviridae* da ordem *Nidovirales* (Figura 4). Estes vírus têm um genoma de RNA de cadeia simples positiva (+), ou seja, a cadeia codificante varia entre 26 a 32 kb. Normalmente, nos humanos causam infeções respiratórias brandas e moderadas de curta duração <sup>2,7,9</sup>.

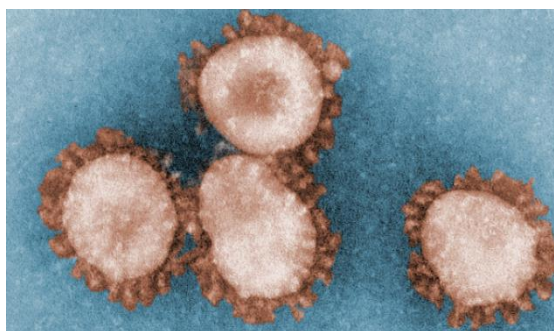


Figura 4 - Observação de coronavírus em microscopia eletrónica de transmissão em 1975<sup>10</sup>.

Contudo, nas últimas duas décadas surgiram exceções de coronavírus, que se revelaram como agentes infecciosos altamente patogênicos para os humanos, provocando infecções altamente letais, nomeadamente o SARS, do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus* (Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave) ou SARS-CoV (que surgiu em 2003) , o MERS-CoV ,do inglês *Middle East Respiratory Syndrome-related Coronavirus* (Coronavírus associado a síndrome respiratória do médio oriente, que surgiu em 2012), e atualmente o SARS-CoV-2 (segundo tipo do SARS) (Figura 5). Este último é o terceiro detetado nas últimas duas décadas, e o que provocou a pandemia atual, declarada a 11 de março de 2020 pela OMS <sup>2; 3; 7; 11</sup>.

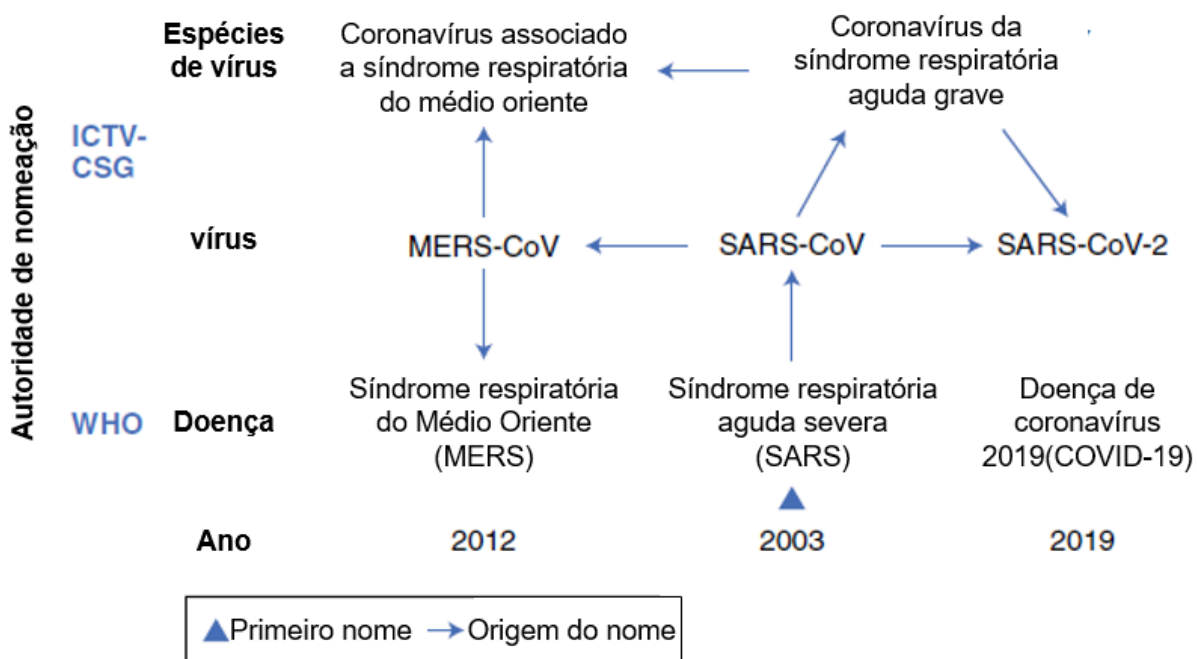


Figura 5 - Representação dos últimos três coronavírus que infetam humanos, desde o primeiro que apareceu e as suas derivantes <sup>1</sup> (adaptado por Fernanda Miguel).

O SARS-CoV, o MERS e o SARS-CoV-2, são coronavírus do género Beta. Existem quatro géneros de coronavírus: os Alfa, os Beta, os Gama e os Delta (Figura 6) <sup>12</sup>.

Os Alfa e os Beta coronavírus infetam principalmente mamíferos, incluindo os humanos, enquanto os Gama e Delta coronavírus infetam pássaros <sup>9</sup>.

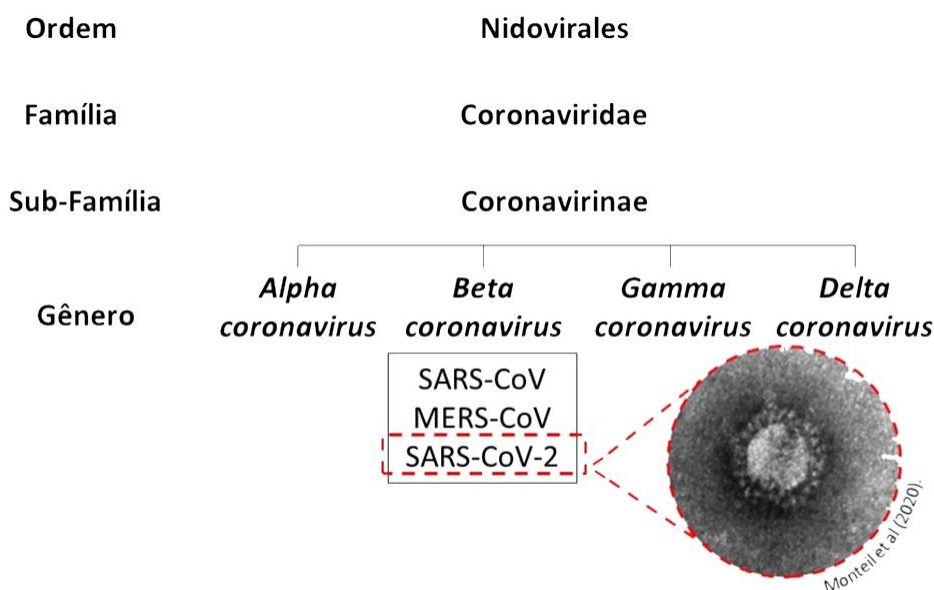


Figura 6 – Esquemática da Taxionomia do SARS-CoV-2, onde representa a sua ordem, família, subfamília e gênero <sup>13</sup>.

Dada a alta prevalência e ampla distribuição de coronavírus em animais, a grande diversidade genética e recombinação frequente dos seus genomas, acoplado ao aumento das atividades de interface humano-animal e de infecções frequentes entre espécies, é expectável que se torne cada vez mais frequente o aparecimento de novos coronavírus que infetem humanos. Estes efeitos zoonóticos estão na base do surgimento de algumas das novas variantes do SARS-CoV-2, tais como as variantes Alfa (Reino Unido), Beta (Africa do Sul), Gama (Brasil) e Delta (India) <sup>9; 14; 15</sup>.

Houve mesmo medidas drásticas implementadas em alguns países para conter potenciais zoonoses, como o abate de martas em países como a Holanda, Dinamarca, Espanha, entre outros, para que não ocorresse disseminação de novas variantes, já que estes animais estariam infetados com SARS-CoV-2 <sup>16-20</sup>.

## 1.2. ESTRUTURA E GENOMA DO SARS-CoV-2

Os coronavírus, são vírus de RNA de cadeia simples positiva codificante, que na sua morfologia apresentam “espigões ou espículas”, em inglês *Spike* (proteína S), dando uma aparência de uma coroa (Figura 7 A), daí a origem do nome <sup>12</sup>. O genoma deste vírus e o nucleocapsídeo (associação da proteína N ao RNA genómico) estão dentro de um envelope feito de uma membrana celular do hospedeiro, que contém proteínas virais sintetizadas a partir do genoma viral. Este vírus apresenta três proteínas no envelope necessárias para que ocorra a infeção e propagação do mesmo. Estas designam-se por proteína *M*, que confere a forma redonda do vírus, a já referida proteína *S*, que tem a função de se ligar ao recetor da célula alvo do hospedeiro para que ocorra infeção, e a proteína *E*, que ajuda na libertação do vírus na célula infetada. Para a criação de novas partículas virais (ou viriões) e a sua libertação na célula hospedeira é necessária tanto a presença da proteína *M*, como a da proteína *E* (Figura 7) <sup>9</sup>.

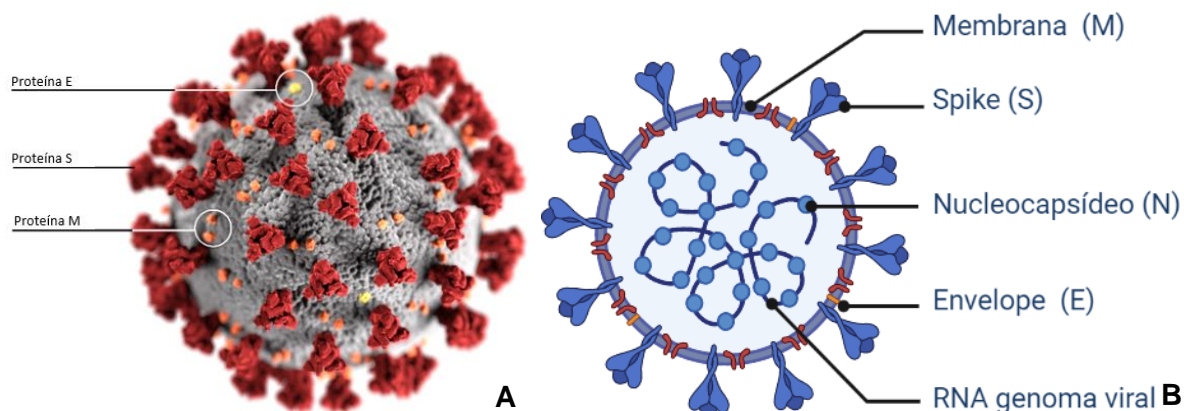


Figura 7 (A e B) – Representação da estrutura do SARS-CoV-2. (A) Representação da superfície do vírus. (B) Esquema da composição do vírus. Em ambas estão identificadas as proteínas constituintes: a proteína M (membrana), a proteína S (Spike) e a proteína E (envelope). Na figura B está identificada a proteína N (nucleocapsídeo), associada ao RNA do genoma viral <sup>21,22</sup> (adaptado por Fernanda Miguel).

Não obstante a importância destas três proteínas virais, o genoma viral do SARS-CoV-2 não tem só regiões que codificam estas proteínas, mas também outras regiões essenciais. Este vírus tem uma estrutura genômica com 29,9 kb. Como se pode observar na Figura 8, a maior parte deste genoma (mais que 20 kb) é constituído pela região que codifica a *ORF1a* e *ORF1b*. O *ORF1a* é uma região de grelha de leitura aberta (do inglês *Open Reading Frame* ou *ORF*), que codifica onze proteínas não estruturais designadas de *nsp1* até à *nsp11*. Já o *ORF1b* codifica cinco proteínas não estruturais designadas de *nsp12* até à *nsp16*. Sabe-se que as *nsp3* e *nsp5* codificam proteases, uma delas semelhante à papaína (PLP do inglês *papain-like protease*), e a outra, semelhante à protease de cisteína 3CL (do inglês, *3C-like protease*), respetivamente. Estas proteases são responsáveis pela clivagem das cadeias polipeptídicas geradas da tradução da *ORF1a* e da *ORF1b*, libertando as proteínas *nsp*. De referir que a tradução da *ORF1b* é conseguida por um desvio ribossomal na grelha de leitura (em inglês, *frameshift*) no final da tradução da *ORF1a*, que permite continuar a tradução da *ORF1b* numa única cadeia polipeptídica designada por *ORF1ab*, que contém as proteínas *nsp1* a *nsp10* e *nsp12* a *nsp16*. As proteases bloqueiam também a resposta imune inata no hospedeiro, promovendo a infeção viral. A *nsp12* codifica para a RNA polimerase (*RdRp*) e a *nsp15* codifica para a RNA helicase, sendo essenciais para a replicação do RNA viral e expressão das proteínas virais <sup>23; 24</sup>.

Na parte final deste genoma (ilustrado na Figura 8) consegue-se observar outras regiões codificantes, ou *ORFs*, numeradas de 2 a 14, que codificam outras proteínas virais, incluindo as proteínas estruturais *S*, *E*, *M* e *N*, assim como outras proteínas acessórias cujo número e função ainda não estão bem clarificadas particularmente nos casos de sobreposição de genes codificantes. Na Figura 8 as *ORFs* indicadas com letras pretas são as que estão anotadas no genoma de referência (NC 045512.2), na plataforma do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), enquanto que as indicadas a azul indicam outras *ORFs* hipotéticas <sup>23; 25-29</sup>.

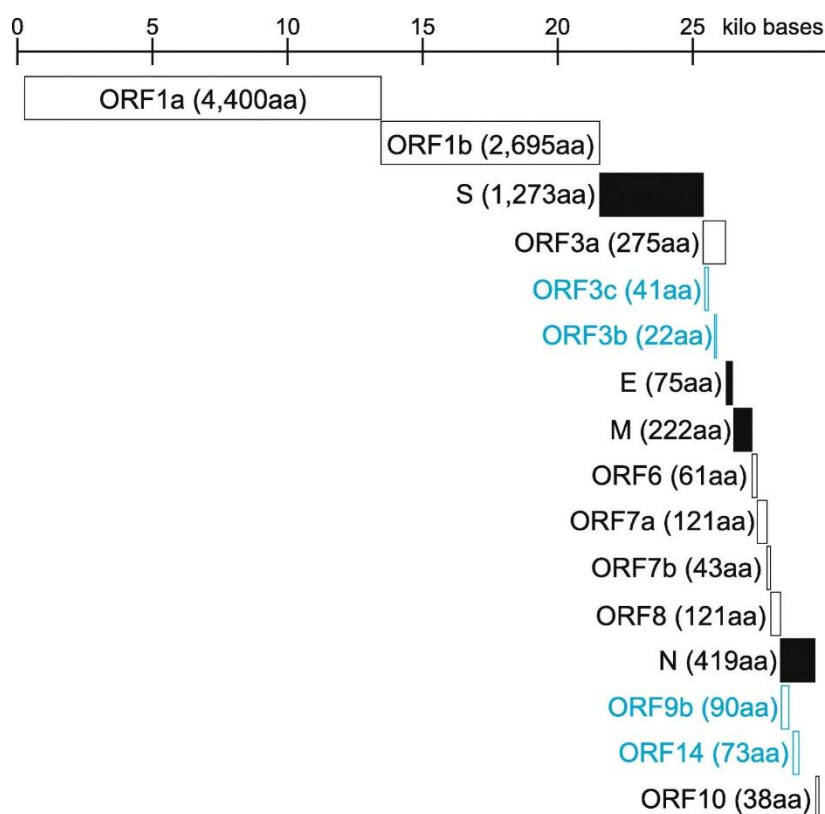


Figura 8 – Representação do genoma do SARS-CoV-2, indicando as regiões que codificam proteínas estruturais (S, E, M e N), as ORF1a e ORF1b que codificam as proteínas não estruturais (*nsp1-16*) e as ORFs que codificam proteínas acessórias. A representação foi feita com base no genoma de referência sequenciado do SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 (sequência nº NC\_045512.2 da NCBI). No topo encontra-se a escala da sequência. Os retângulos representam as ORFs conforme a anotação da NCBI, e entre parêntesis é indicado o número de resíduos de aminoácidos (aa). Retângulos a preto representam as proteínas estruturais. As ORFs a azul correspondem a genes hipotéticos, não anotados pela NCBI <sup>23</sup>.

### 1.2.1. VARIABILIDADE DO GENOMA DO SARS-CoV-2

Uma das maiores preocupações a nível da saúde pública no combate à pandemia da COVID-19 é a possibilidade de surgirem mutações no seu genoma, que torna-se o vírus ainda mais perigoso. Neste sentido, diversos estudos têm sido conduzidos para monitorizar a ocorrência de mutações no genoma viral.

Assim, desde dezembro de 2019 até dezembro de 2020, já tinham sido sequenciados 9956 genomas do SARS-Cov-2 através de recolha de amostras. Estes genomas, são derivações ou variações do primeiro genoma, onde ocorreram mutações nos alvos genómicos que podem levar a que a disseminação do vírus seja ou não mais rápida, ou à alteração do local de ligação do vírus, etc. (Figura 9) <sup>30,31</sup>.

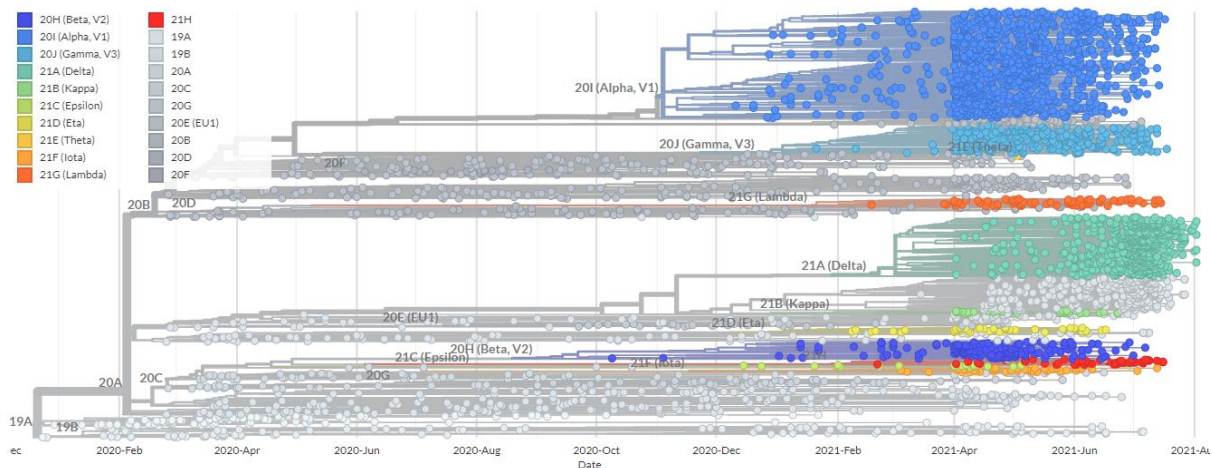


Figura 9 – Diversidade genómica do vírus SARS-CoV-2, desde dezembro de 2019 até julho de 2021. A cinza encontram-se as primeiras variações, a azul a variação Alfa, a azul escuro a variação Beta, a azul claro a variação Gamma, a verde água a variação Delta, a Laranja a variação Lota e a vermelho a variação Lambda que são as representadas com maior expressão <sup>30</sup>.

Destes estudos, também se consegue identificar geograficamente onde estas variantes (com as variações genómicas) tendem a estar mais concentradas e traçar um perfil da origem e progressão das infeções. Na Figura 10, que se refere a dados de julho de 2021, pode-se observar que a maioria dos países apresenta casos de infeção maioritariamente da variante Alfa (azul), Beta (azul escuro) e Delta (verde água), e que na América do Sul existe predominância da variante 21H (vermelho), que não existe nos restantes locais.

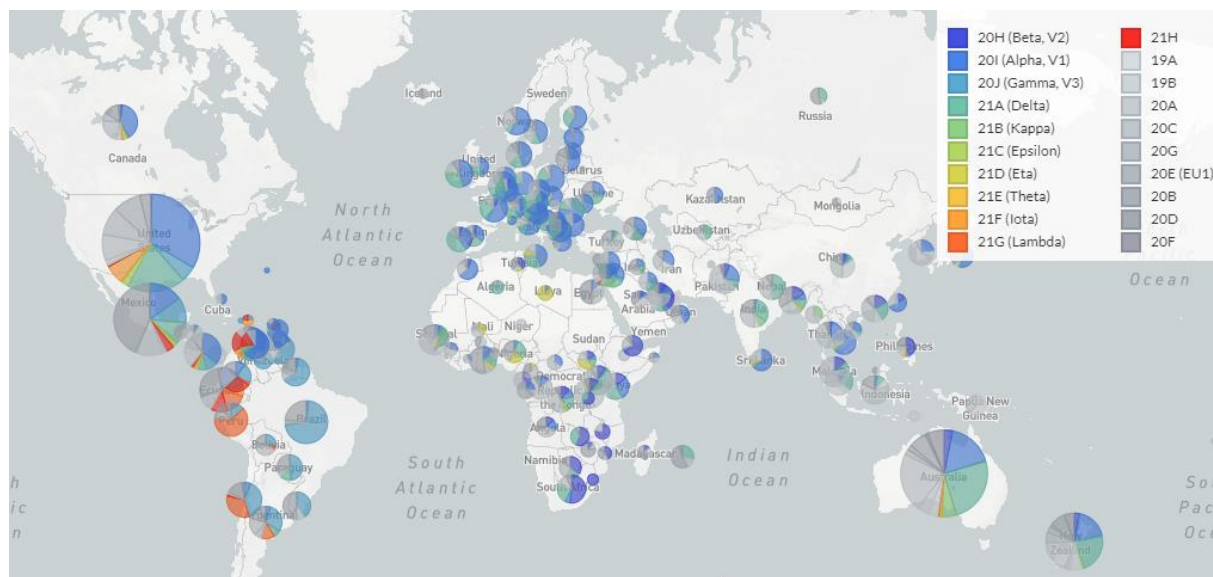


Figura 10 – Distribuição dos genomas do SARS-CoV-2 pelo mundo, em julho de 2021 consoante as variantes e respetivas cores <sup>30</sup>.

Se verificar-se numa data temporal posterior, como abril de 2022, constata-se com uma predominancia completamente diferente, passou-se a ser perdominante a variante Omicron (laranja) em todo o mundo, o mesmo não se pode observar na figura anterior, que indica que esta variante é muito transmissível como se podeverificar esta informação na Figura 11.

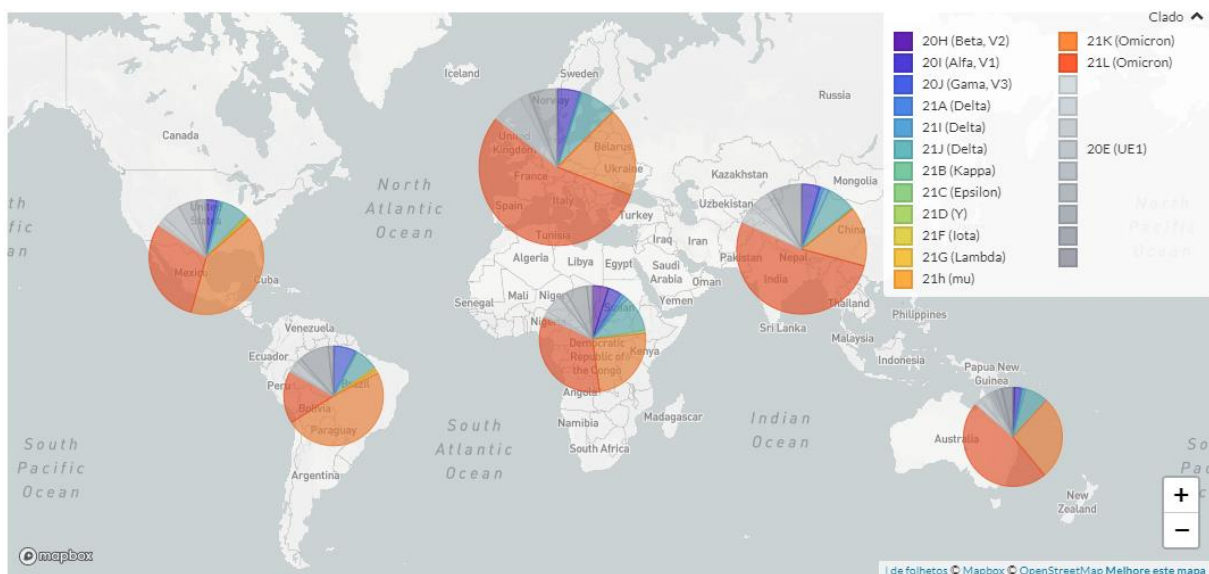


Figura 11 - Distribuição dos genomas do SARS-CoV-2 pelo mundo, em abril de 2022 consoante as variantes e respetivas cores <sup>30; 32</sup>.

De facto, consegue-se verificar que as variantes existentes nas primeiras vagas não são as mesmas que se encontram em circulação no início de 2022. Como se verifica a Figura 12, inicialmente estavam presentes as variantes 19A, 19B, 20A e 20B, mais tarde aparece a 20E, e gradualmente estas vão deixando de estar em circulação até se extinguirem dando lugar às variantes com mais expressão (entre março a outubro de 2021), neste caso as variantes Alfa e Delta. Estas referidas anteriormente deixam de ser predominantes no final de outubro de 2021 e dão lugar a uma nova variante denominada Ómicron que passa a ser a variante com mais expressão.

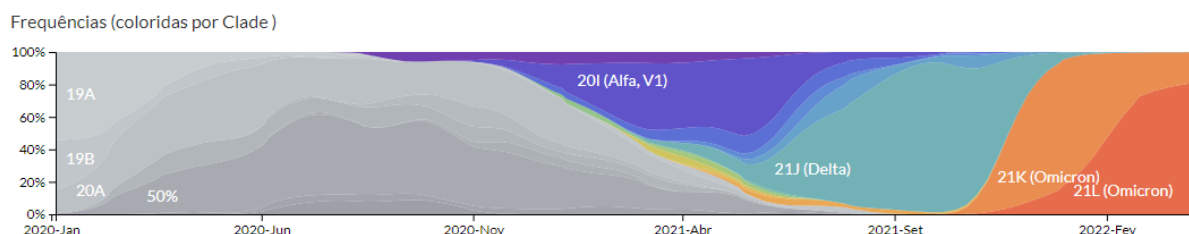


Figura 12 - Evolução temporal das variantes em circulação no mundo desde janeiro de 2020 até abril de 2022 <sup>32; 33</sup>.

No caso de Portugal, também foi possível determinar as variações genéticas predominantes. Na primeira vaga, era predominante encontrar as variantes 19A, 20B, e 20A e algumas 20C <sup>34</sup>. Mais tarde verificou-se uma fase em que maioritariamente apareciam infeções da variante 20 B do vírus, e no início da segunda vaga o genoma predominante era o da 20 E. Foi a partir do final do ano de 2020 e início de 2021, e à semelhança do que aconteceu na maior parte dos países, que as variantes referidas anteriormente deixaram de circular, dando espaço às variantes Alfa (forte causadora da terceira vaga e do segundo confinamento imposto) e da variante Delta <sup>33; 35</sup>. Mais tarde estas deixam de circular, por meados de outubro de 2021, dando lugar a uma nova variante, Ómicron que até ao momento continua predominante (Figura 13)

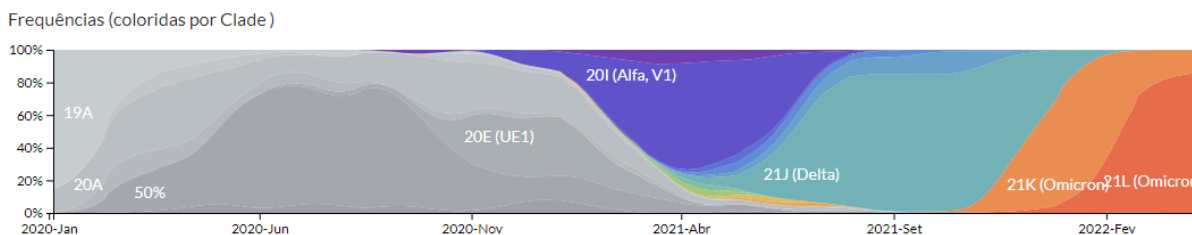


Figura 13 – Estudo da variabilidade genómica ao longo do tempo em Portugal, onde a cinza estão representados os genomas 19A, 20A, 20E, a azul está representado o genoma 20I, a verde o genoma 21J e a laranja o genoma 21K e 21L <sup>32; 33; 35</sup>.

Falando essencialmente desde o início do ano de 2021 (momento em que o IPS COVID Lab iniciou o seu funcionamento) até agora, pode-se verificar uma presença muito dominante das variantes Alfa e Delta. Estas variantes são consideradas preocupantes, pelo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), pois são consideradas de risco elevado, dando-lhes o nome de *Variant of Concern*, as chamadas VOC<sup>15</sup>.

No caso de Portugal, verificou-se que as infeções em 2021 foram predominantemente da variante Alfa, até que a variante Delta chegou ao país, tornando-se assim a variante com maior predominância em Portugal até meio de dezembro de 2021, depois a partir dessa apareceu a variante Omicron (BA) que rapidamente se tornou predominante. Estas informações podem ser observadas na Figura 14.

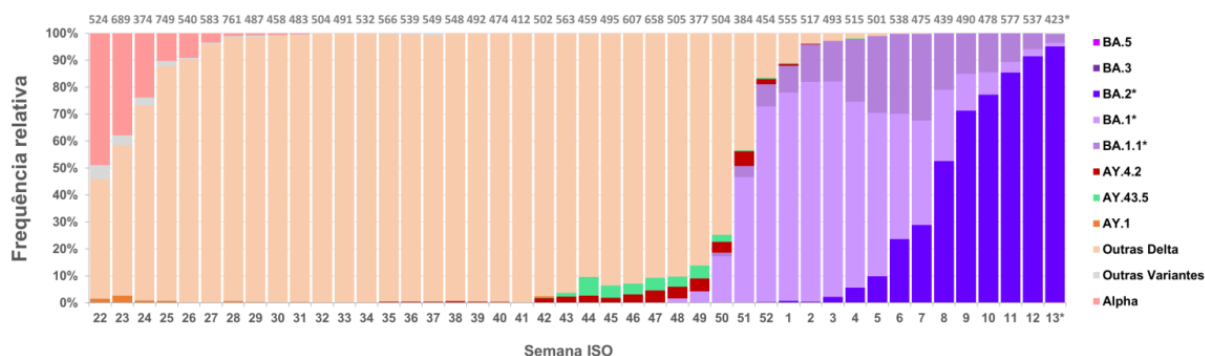


Figura 14 - Representação da frequência das variantes em Portugal entre a semana 22 de 2021(31 de maio) até a semana 13 de 2022 (3 de abril de 2022)

#### 1.2.1.1. – Variantes de preocupação

As variantes de preocupação, as chamadas VOC, são variantes do vírus SARS-CoV-2 para as quais foram comprovados impactos significativos na transmissibilidade, gravidade e/ou imunidade que provavelmente possam ter impacto na atual situação pandémica. Estas variantes são assim classificadas quando existem provas genómicas, epidemiológicas e *in vitro* que expressam uma confiança moderada <sup>15; 36</sup>.

Com estas características, teve-se 5 variantes, a Alfa, Beta, Gama, Delta e Ómicron cujas propriedades se podem observar na Tabela 1.

Tabela 1 – Propriedades das VOC que circulam na União europeia e no Espaço Económico Europeu (UE/EEE)  
15; 36

Nome dado pela OMS	Local de primeira infeção	Transmissão na UE/EEE	Evidências de Impacto		
			Transmissibilidade	Imunidade	Gravidade
Alfa	Reino Unido (setembro de 2020)	Comunitária	Sim	Não	Sim
Beta	África do Sul (setembro de 2020)	Surto	Sim	Sim	Sim
Gama	Brasil (dezembro de 2020)	Comunitária	Sim	Sim	Sim
Delta	Índia (dezembro de 2020)	Dominante	Sim	Sim	Sim
Omicron	África do Sul (novembro de 2021)	Dominante (BA.2)/ Comunitária (BA.1; BA.4; BA.5)	Sim	sim	Reduzido

A variante Alfa consegue ligar-se melhor às células, sendo mais difícil a defesa por parte do organismo hospedeiro, e também apresenta maior transmissibilidade. Em julho de 2021 esta variante estava presente em 178 países <sup>14; 15</sup>.

A variante Beta foi detetada na África do Sul em setembro de 2020. Apresenta transmissibilidade maior e diminuição da ação dos anticorpos, tornando assim mais difícil o tratamento e recuperação de indivíduos infetados. Em julho de 2021 esta variante estava presente em 123 países <sup>14; 15</sup>.

A variante Gama apresenta mutações na proteína S, aumentando a capacidade de ligação às células e apresentando transmissibilidade 2,4 vezes superior à variante original. Em julho de 2021 esta variante estava presente em 178 países <sup>14; 15</sup>.

A variante Delta, tal como a Gama, também apresenta mutações na proteína S. Em julho de 2021 esta variante estava presente em 111 países <sup>14; 15</sup>.

A variante Omicron também apresenta diversas mutações na proteína S. A gravidade da doença pode estar mascarada pelo efeito protetor das vacinas. <sup>36; 37</sup>

Embora exibam mutações em várias regiões do seu genoma, são as mutações no gene que codifica a proteína S que são consideradas as mais importantes. Estas mutações dão origem a deleções de um ou mais resíduos de aminoácidos ou a troca de resíduos de aminoácidos. A variante Alfa contém as seguintes mutações: 69-70del, Y144del, N501Y, D614G, P681H. A variante Beta tem em comum a mutação D614G, e também as K417N, E484K, N501Y e A701V. A variante Gama também apresenta algumas mutações comuns à Alfa e Beta, nomeadamente a D614G e E484K, N501Y, mas exibe uma mutação diferente no resíduo 417, nomeadamente K417T. A variante Delta apresenta a mesma mutação D614G, mas além desta, apresenta as seguintes mutações: L452R, T478K e P681R<sup>15, 38</sup>. Por fim, a Variante Ómicron apresenta as seguintes mutações: BA.1 - A67V, Δ69-70, T95I, G142D, Δ143-145, N211I, Δ212, ins215EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496s, Q498R, N501y, Y505H, T547K, D614G, H655y, N679K, P681H, N764K, D796y, N856K, Q954H, N969k, L981F; BA.2 - G142D, N211I, Δ212, V213G, G339D, S371F, S373P, S375F, T376A, D405N, R408S, K417N, N440K, S477N, T478K, E484A, Q493R, Q498R, N501Y, Y505H, D614G, H655y, N679K, P681H, N764K, D796y, Q954H, N969k; BA.4 - L452R, F486V, R493Q; BA.5 - L452R, F486V, R493Q.

#### 1.2.1.2. Variantes de Interesse

As variantes de interesse, ou as VOI, do inglês *Variants of interest*, são variantes que, tal como as VOC, apresentam evidências sobre propriedades genómicas. Estas evidências podem ser epidemiológicas ou in vitro, e podem influenciar significativamente na transmissibilidade, gravidade e/ou imunidade, tendo um resultado realista na situação atual. Contudo, estas evidências são preliminares ou ainda apresentam um grande grau de incerteza, para o qual também são aplicados os critérios referentes a variantes que estão em monitorização (VUM do inglês *Variants under monitoring*)<sup>15</sup>.

Atualmente, nesta situação encontram-se, por exemplo, as variantes Eta, Teta, Kapa e Lambda<sup>15</sup>.

#### 1.2.1.3. Variantes em monitorização

As VUM são variantes para as quais existe qualquer indicação de que possam ter propriedades semelhantes às VOC, embora as evidências sejam ainda poucas ou não tenham sido ainda avaliadas pela ECDC. São identificadas através de previsões de inteligência epidemiológica e de rastreios de sequenciação genómica, usando algoritmos de “rules-based genomic screening” para a vigilância de variações genómicas potencialmente relevantes, e também com base em estudos científicos preliminares. Estas variantes são introduzidas na lista quando existe pelo menos um surto detetado numa comunidade dentro da UE / EEE, ou quando há evidências de que há transmissão comunitária da variante em outras partes do mundo<sup>15</sup>.

#### 1.2.1.4. Variantes reescaloadas

Estas variantes adicionais de SARS-CoV-2 foram reescaloadas e despromovidas de relevância com base em pelo menos um dos seguintes critérios: (1) a variante já não está em circulação, (2) a variante tem circulado por um longo tempo sem qualquer impacto sobre a situação epidemiológica geral, (3) as evidências científicas demonstram que a variante não está associada a nenhuma propriedade preocupante <sup>15</sup>.

### 1.3. PROPAGAÇÃO DO SARS-COV-2

O SARS-CoV-2 que provoca a COVID-19, transmite-se entre pessoas de forma direta quando existe contato com pessoas infetadas, ou de forma indireta quando existe contato com superfícies e objetos contaminados. As transmissões diretas ocorrem maioritariamente através de gotículas que contêm partículas virais, que são libertadas pelo nariz ou boca (Figura 15). Isto pode ocorrer quando existe tosse ou espirros, que ao atingirem outro indivíduo próximo, seja pelos olhos, boca e/ou nariz, pode ficar contaminado. Também pode ocorrer o depósito destas partículas virais presentes nas gotículas em superfícies ou objetos, que depois em contato com os mesmos, levam à infeção por via direta ou indireta <sup>39; 40</sup>.

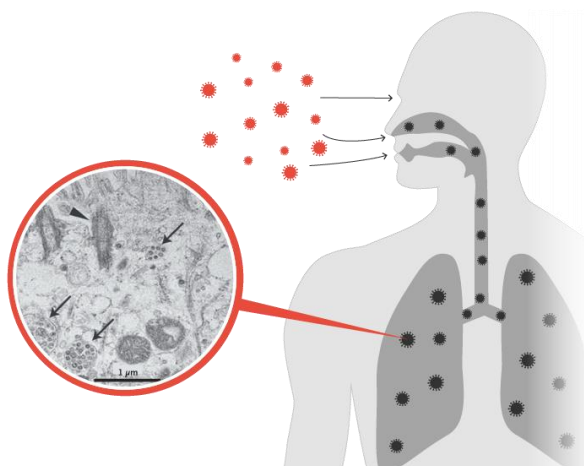


Figura 15 – exemplificação da transmissão de COVID-19 através de gotículas que contêm partículas virais <sup>40</sup>.

A transmissão pode ocorrer mesmo antes da pessoa infetada saber que o está, ou seja antes de haver a sintomatologia, até porque existem muitos casos em que a infeção é assintomática. No início da pandemia, pensava-se que o período de incubação ocorra entre 1 a 14 dias após o contato com a pessoa infetada. Já a pessoa infetada poderia infetar outras entre 7 a 12 dias em casos moderados, e em casos mais graves até duas semanas. Já no caso de infeção através de superfícies, o vírus pode sobreviver em superfícies durante horas ou até mesmo dias, consoante os materiais (como por exemplo: cobre 4 horas; cartão 24 horas; aço inoxidável e plástico 2 a 3 dias) <sup>39; 40; 41</sup>. Depois, com o levantamento das medidas de isolamento obrigatório (finais de setembro de 2022) as recomendações da DGS eram de que a pessoa sempre que saiam do seu local de isolamento até ao 10º dia após a data do início de sintomas ou do teste positivo, é obrigatório o uso de máscara. Também era obrigatório, para pessoas que estiveram em contacto com casos confirmados da doença, o uso de máscara durante 14 dias após a data da última exposição.<sup>42</sup>

Algumas medidas preventivas para que não haja infeção por contato através de superfícies é a sua desinfecção. Para que haja inativação deste vírus basta expô-lo durante alguns minutos a uma solução de etanol diluído a 70%, água oxigenada a 10 volumes, ou soluções a 0,1% de hipoclorito de sódio (convencionalmente conhecida como lixívia). Neste sentido, foram indicadas pela DGS diversas medidas de prevenção contra a COVID-19, nomeadamente: ter-se atenção a superfícies e objetos como o dinheiro, maçanetas, telemóveis, comandos, botões de máquinas e elevadores, ar condicionado, corrimões, etc., como prováveis fontes de contágio; descalçar-se os sapatos à chegada a casa, lavar-se a roupa que esteve no exterior entre os 60º a 90º graus, e não partilhar objetos pessoais, maioritariamente, criar hábitos de desinfecção regular das mãos, e de evitar levar as mesmas à cara para não haver contato com a boca, olhos e nariz (Figura 16) <sup>2; 41</sup>.



Figura 16 - Medidas preventivas a ter para combate e prevenção da COVID-19 <sup>43</sup>.

### 1.4. INFEÇÃO DO SARS-COV-2

Ao nível da infecção, como se pode observar na Figura 17, o vírus inicia o processo de infecção na célula quando a proteína S se liga ao recetor ACE2 (enzima conversora de angiotensina 2) e entra na célula alvo criando um endossoma. Depois disto, o RNA viral é libertado para o citoplasma, onde os ribossomas do hospedeiro vão traduzir a ORF1ab, criando as estruturas necessárias para a formação do complexo da replicação – transcrição. Este complexo é responsável por criar em primeiro lugar, uma cópia *antisense* (-) do genoma viral, que serve de base para a produção de cópias do RNA viral (replicação) e expressão das várias proteínas estruturais e acessórias (transcrição). A transcrição destes genes é feita num processo designado por transcrição descontínua (transcrição fragmentada), sendo produzido um conjunto aninhado de RNAs subgenómicos (sgRNAs). Estes, mesmo que possam ter várias grelhas de leitura aberta (ORFs), apenas as que estão mais perto da extremidade 5´serão traduzidas. À medida que ocorre a produção das proteínas estruturais, os RNAs genómicos produzidos associam-se à proteína N, formando os nucleocapsídeos no citoplasma, e seguidamente que depois se associam às proteínas S, M e E que se encontram no compartimento intermediário do retículo endoplasmático – complexo de Golgi (ERGIC), permitindo assim a formação de novas partículas virais. No final, os virões são expulsos do interior da célula infetada através de exocitose <sup>24</sup>.

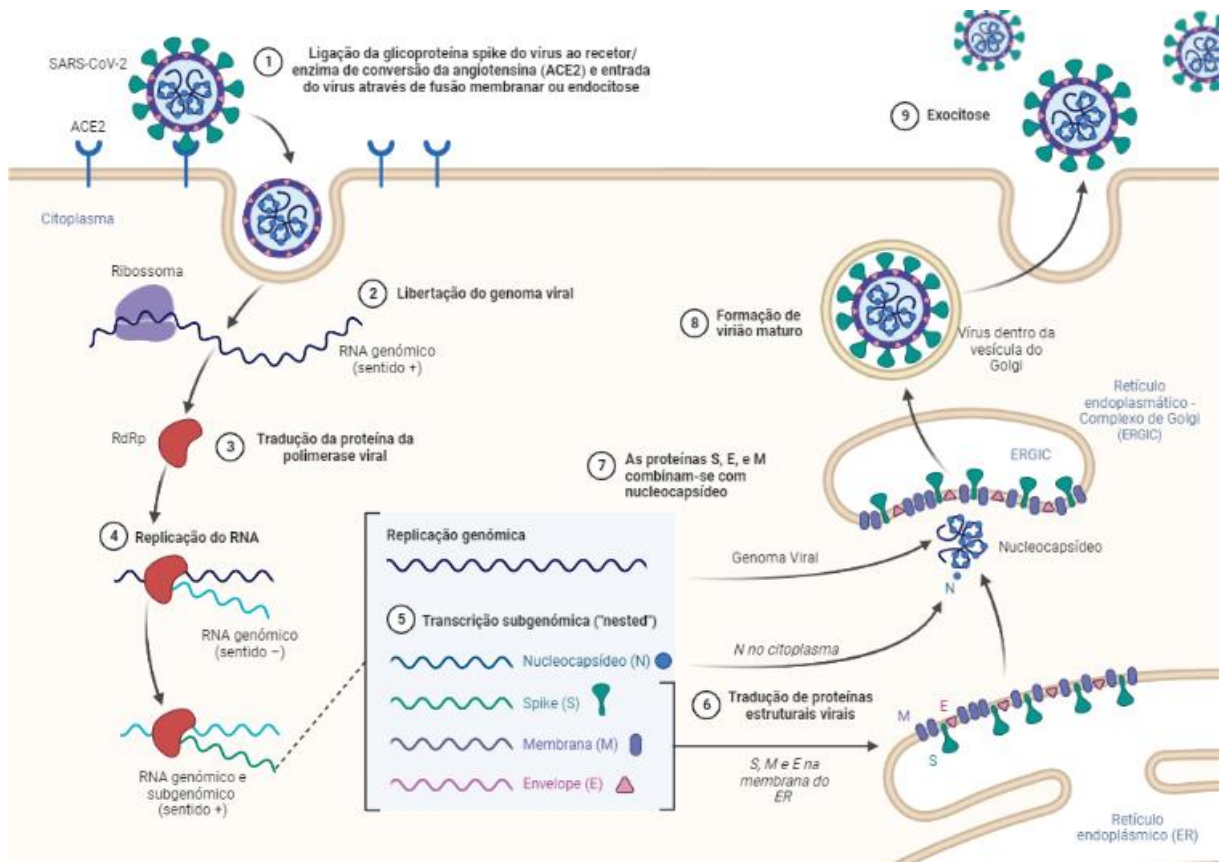


Figura 17 – Representação do ciclo infecção do SARS-CoV-2 na célula do hospedeiro, desde a sua entrada na célula, replicação, transcrição, produção de proteínas e saída da célula de novas partículas virais capazes de infectar outra <sup>24</sup> (adaptado por Fernanda Miguel).

### 1.5. TESTES E AMOSTRAS PARA DETEÇÃO DA COVID-19

Os testes para a detecção da COVID-19 são baseados em duas estratégias diferentes. A primeira estratégia é através da detecção de componentes do vírus, que inclui os testes moleculares (PCR em tempo real) e os testes de antígeno, que detetam proteínas (por exemplo as proteínas do envelope). A segunda estratégia é através da detecção de anticorpos que o organismo produz como forma de dar resposta à infeção causada pelo vírus (que podem ser anticorpos do tipo *IgA*, *IgM* e ou *IgG*), também chamados testes serológicos <sup>44; 45</sup>. A representação simplificada dos testes para a detecção do SARS-Cov-2 encontra-se esquematizada na Figura 18.

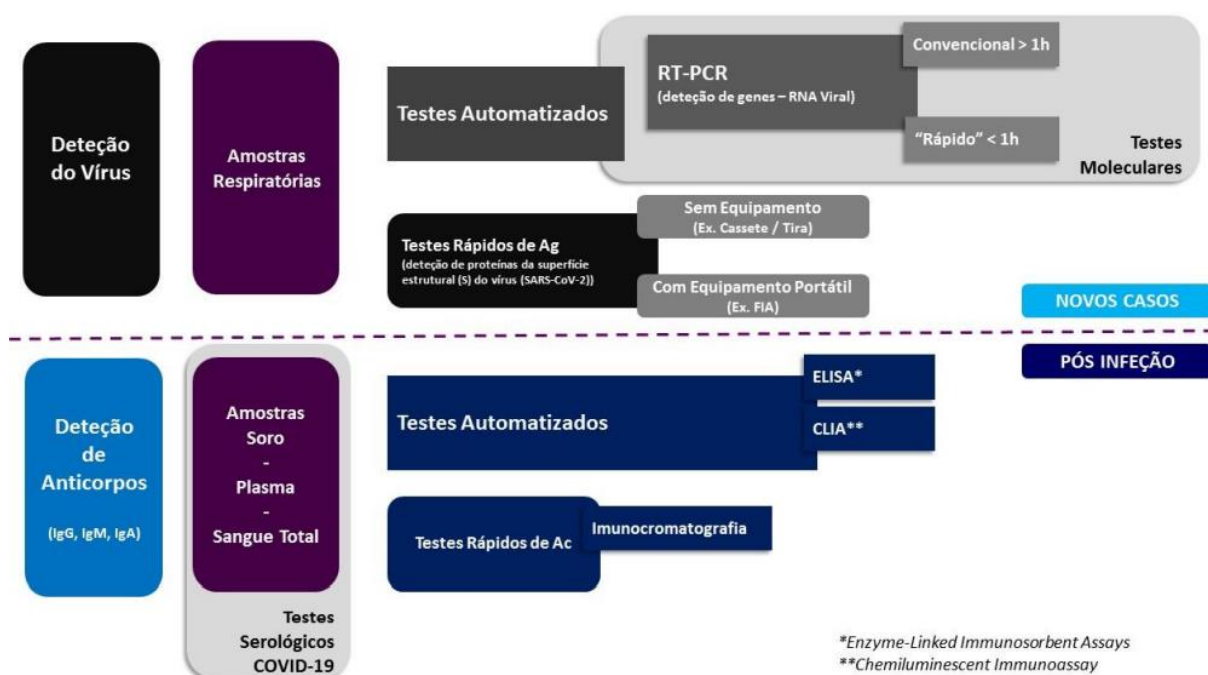


Figura 18 – Representação simplificada dos testes existentes para detecção do SARS-Cov-2 <sup>44</sup>.

Em relação à tecnologia que pode ser aplicada nestas duas estratégias, pode-se utilizar testes automatizados que podem ser: testes de PCR em tempo real ou convencional, testes rápidos de *rRT-PCR* (teste em sistema fechado, que permite obter resultados mais rápidos), e os testes ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Estes últimos são maioritariamente usados nos testes serológicos, e também para componentes proteicos do vírus. No caso dos não automatizados ou os chamados “testes rápidos”, estes realizam um diagnóstico *in vitro*, com uma execução técnica de baixa complexidade, e conseguem obter resultados entre 10 a 30 minutos. Estes podem ser: de detecção de proteínas/anticorpos com base na detecção de componentes virais, ditos testes de antígeno ou de anticorpos, com base em testes semi-quantitativos (tipicamente de imunocromatografia). O problema destes testes é que, por terem menor complexidade, tendem a ser menos sensíveis, podendo levar a resultados incorretos (falsos negativos). De referir que os testes moleculares que recorrem à técnica de PCR molecular têm a vantagem de multiplicar o material genético viral favorecendo assim a capacidade de detecção <sup>44; 45</sup>.

Para os testes de diagnóstico da presença do SARS-CoV-2 normalmente recolhem-se amostras nasofaríngeas (recolhidas do trato respiratório superior através do nariz) e orofaríngeas (recolhidas do trato respiratório inferior através da boca) como esquematizado na Figura 19. Os testes são feitos com o auxílio de zaragatoas de fibras sintéticas com hastes plásticas, uma vez que as zaragatoas de madeira ou que contenham alginato de cálcio podem inativar o vírus. Também podem ser recolhidas amostras de lavagens broncoalveolar, aspiração traqueal, esputo, urina e sangue <sup>45</sup>.

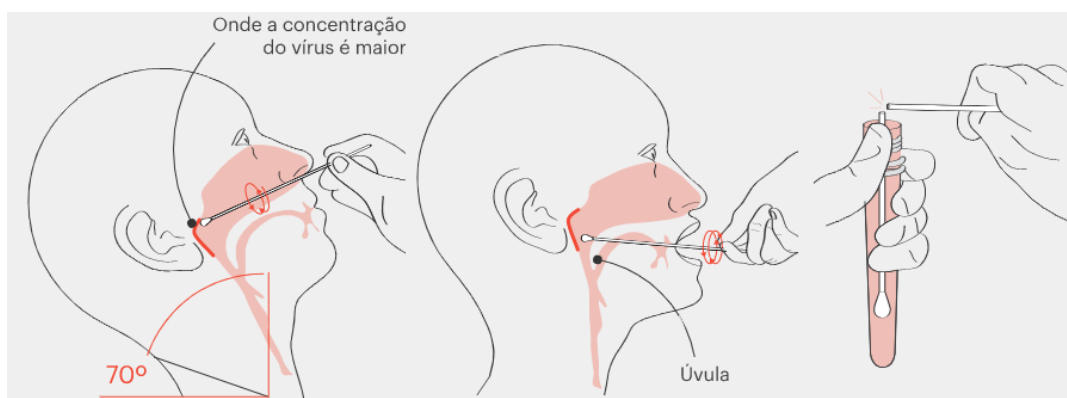


Figura 19 – Recolha de amostras nasofaríngeas e orofaríngeas <sup>46</sup>.

A norma nº 19/2020 “COVID-19 Estratégia Nacional de Testes para SARS-CoV-2”, emitida pela DGS, sofreu diversas atualizações desde a sua publicação inicial <sup>47</sup>, e atualmente refere apenas a recolha nasofaríngea ou a de saliva para utilização no teste de PCR em tempo real (Figura 21), e deteção de RNA viral do SARS-CoV-2. É de referir que a deteção deste vírus pode ser feita 1 a 2 dias antes do início dos sintomas, podendo, com esta técnica persistir em casos moderados até 8 a 12 dias depois do início da doença, e nos casos mais graves tende a estender-se o número de dias em que a presença de vírus é detetável. De facto, embora sejam aceites os Testes Rápidos de Antigene (TRag) como teste para rastreio da COVID-19, a norma 019/2020 definia até ao início de 2022, que o diagnóstico, em caso positivo, deve ser feito por confirmação através de Teste PCR, realizado até 24 horas após o primeiro resultado. Um dos motivos de exclusão dos outros testes, tende a ser o facto de que só após alguns dias de infeção é que começam a aparecer proteínas virais em quantidades detetáveis, e, para os serológicos, que os anticorpos *IgA*, *IgM* e particularmente os *IgG* só começam a manifestar-se ainda mais tarde, senão mesmo depois de ocorrer a infeção. É por estes motivos que os testes serológicos não são considerados testes para o diagnóstico, pois, um indivíduo pode estar infetado e não apresentar os critérios para os testes darem positivo, e podendo assim infetar outras pessoas<sup>44</sup>; <sup>47</sup>. Para além disso, com a vacinação massiva da população, quase todos os indivíduos acusaram positivo nos testes de imunidade, sem por isso terem estado infetados.

Apesar da vulgarização dos testes rápidos de antigénio, e em particular dos auto-testes, o diagnóstico molecular por PCR manteve-se como a técnica de referência para a confirmação

do diagnóstico, e ainda é solução indicada pelo SNS 24 quando há forte suspeita e repetidos testes TRAg negativos <sup>47</sup>.

O diagnóstico molecular por RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) permite ainda detetar a presença do vírus, ou mais concretamente, do seu material genético, para lá dos 8 a 12 dias após o início da doença e conseqüentemente para lá do período em que o indivíduo se encontra contagioso <sup>24</sup>. Estudos comprovam que, nessas situações, apesar de ainda ser encontrado no organismo carga viral do SARS-CoV-2, não significa que este indivíduo seja capaz de infectar outros. Ou seja, a presença de RNA viral não equivale a infecciosidade ou à presença de vírus viável. Referem ainda que, em 73 pacientes que contraíram a doença, quando estes apresentavam testes de PCR com valores de Ct acima de 30 (valores que significam carga viral reduzida), nenhum vírus viável foi encontrado em culturas, verificando também que o vírus não pode ser isolado ou cultivado após 11º dia de doença (Figura 20). Assim, afirmam que o período infeccioso do vírus em indivíduos sintomáticos podem manifestar-se 2 dias antes do início dos sintomas e persistir por cerca de 7 a 10 dias após o seu início <sup>48</sup>.

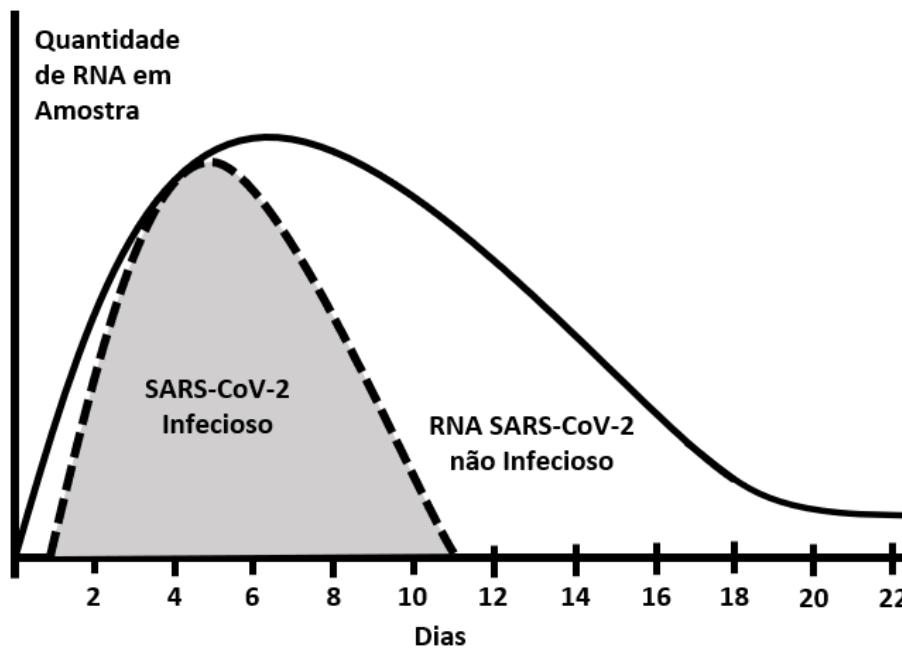


Figura 20 – Representação da presença de RNA viral em amostras ao longo do tempo, mostrando se o RNA é infeccioso ou não <sup>48; 49</sup> (adaptado por Fernanda Miguel).

Em algumas circunstâncias, pode ainda ser detetado o material genético viral num período de 90 dias após infecção, razão pela qual a norma da DGS recomenda, atualmente, que não sejam efetuados testes PCR a indivíduos nesse intervalo de tempo <sup>47</sup>.

O diagnóstico molecular da COVID-19, por RT-qPCR, encontra-se esquematizado na Figura 21, e engloba a já referida etapa da colheita de uma amostra biológica, seguida do isolamento do material genético do vírus e subsequente amplificação por PCR em Tempo Real, precedido de transcrição reversa do RNA em DNA.

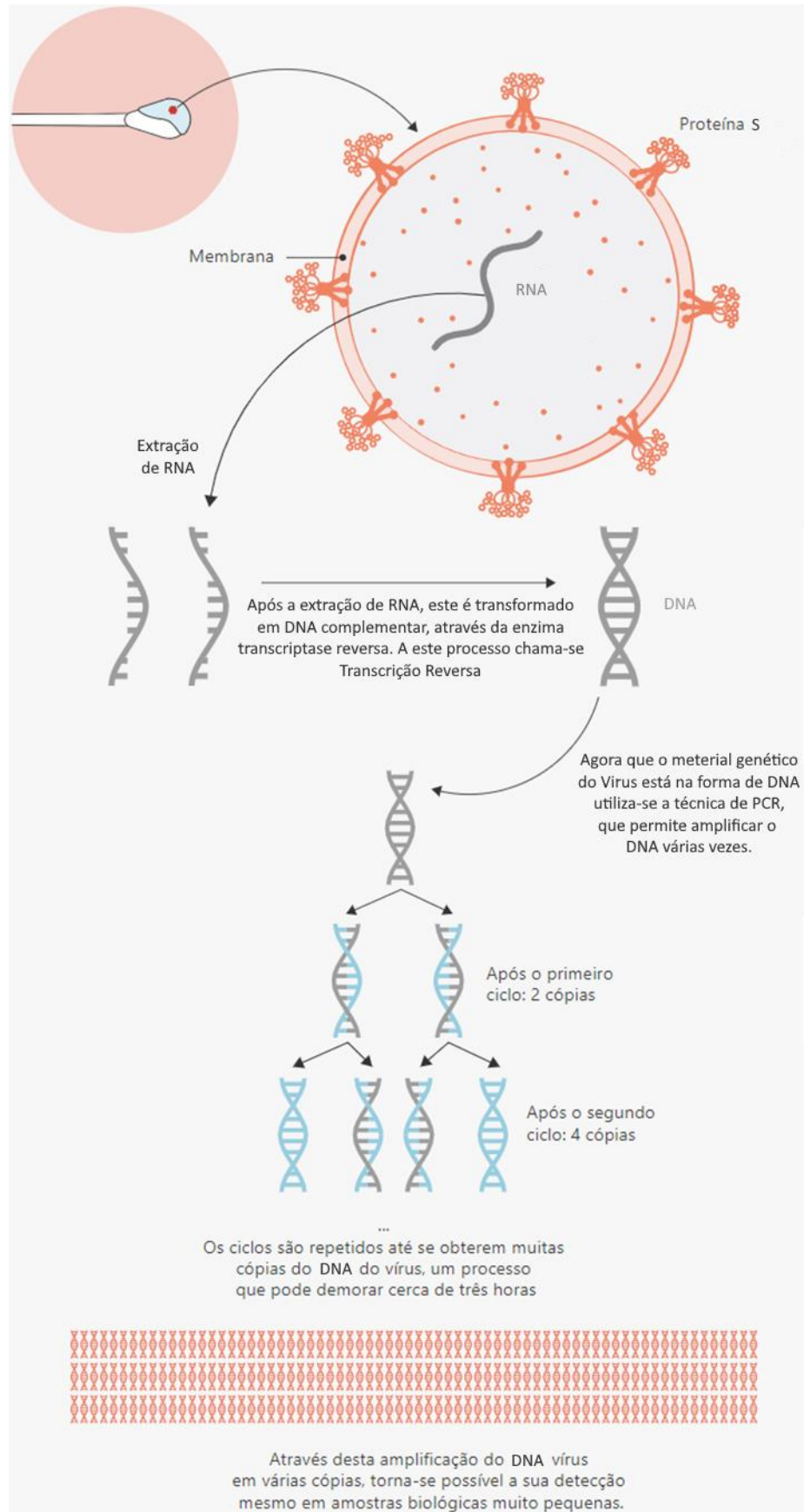


Figura 21 - Esquematização simplificada dos testes de RT-qPCR <sup>46</sup>.

### 1.5.1. PCR, RT-PCR, qPCR E RT-qPCR

A reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa quantificada em tempo real, *RT-qPCR* é uma variação da técnica de reação em cadeia da polimerase (comumente designada por *PCR*) e foi a usada neste trabalho.

O *PCR* é uma técnica que tem como objetivo a criação de novas cópias de uma cadeia de DNA específica. Esta cópia pode ser da sequência completa de DNA ou só de uma região específica que se pretenda amplificar. Para que esta reação ocorra é necessário a presença de uma DNA polimerase (tipicamente a *Taq* polimerase), de *primers* (oligonucleótidos iniciadores), de cofatores e de nucleóticos para criação da nova cadeia <sup>50</sup>.

A *Taq* DNA polimerase é uma enzima que foi isolada da bactéria *Thermus aquaticus*, uma bactéria termófila que suporta altas temperaturas. Nesta técnica utilizam-se apenas DNA polimerases de organismos termófilos, pois outras polimerases não conseguem atuar numa gama de valores entre 55 °C a 96 °C, como é o caso da polimerase humana. A *Taq* DNA polimerase é bastante estável e atinge o seu ponto máximo de atividade por volta dos 70 °C. Os *primers* são fragmentos de DNA de cadeia simples, que normalmente têm um comprimento de 20 nucleótidos. Os *primers* tem como função ligarem-se à cadeia molde quando se separa, (Figura 22), para que a polimerase consiga prolongar ou estender o resto dessa nova cadeia (Figura 23) <sup>50; 51</sup>.

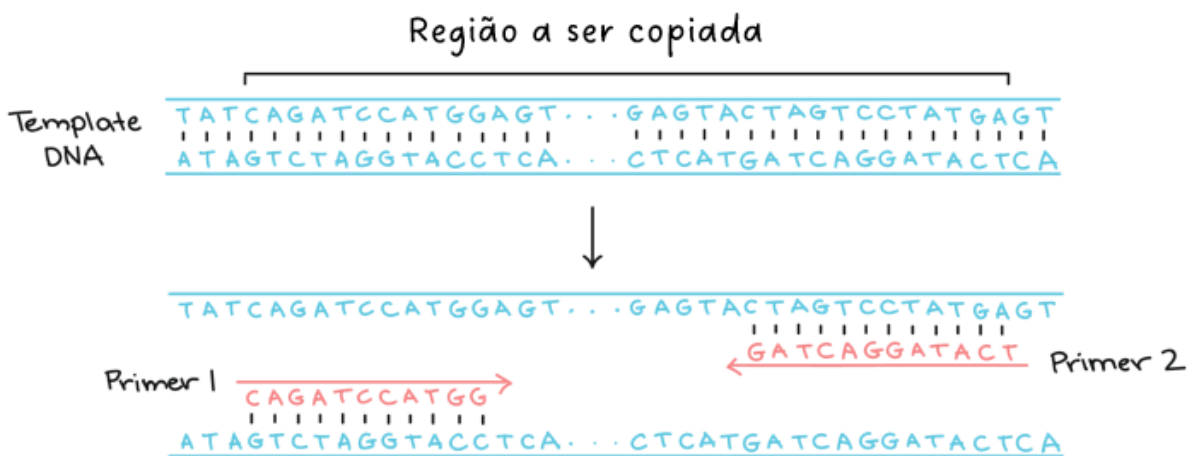


Figura 22 - Ligação dos primers 1 e 2 na região de interesse da cadeia molde <sup>50</sup> (adaptado por Fernanda Miguel).

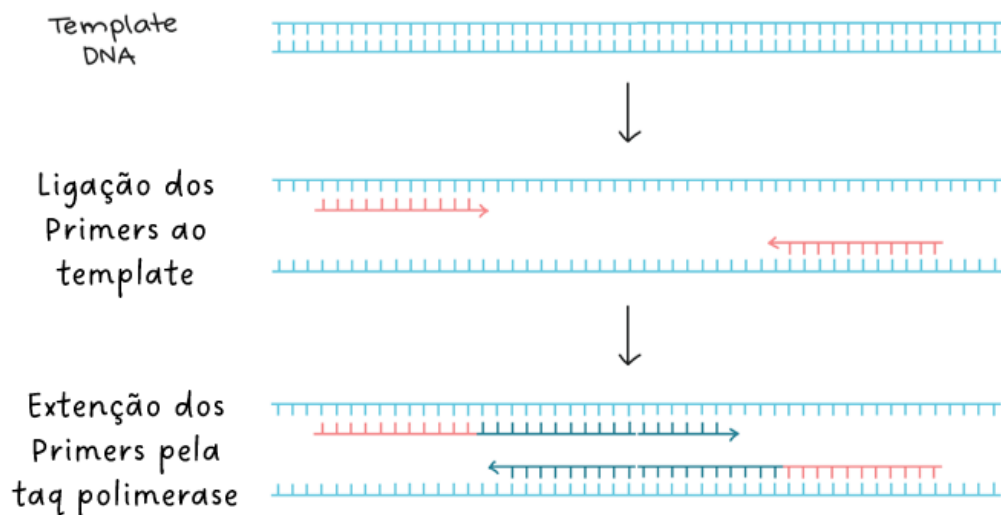


Figura 23 – Extensão dos primers e síntese das novas cadeias <sup>50</sup> (adaptado por Fernanda Miguel).

Para que isto aconteça, é crucial a alternância da temperatura de incubação do processo, e por isso existem três passos (Figura 24) que são repetidos a cada ciclo <sup>50; 51</sup>:

**Desnaturação:** Este passo ocorre entre os 94°C a 98°C, dependendo da termoestabilidade da DNA polimerase. A temperatura muito elevada faz ocorrer, na molécula de DNA, a quebra das pontes de hidrogénio que unem as 2 cadeias da molécula de DNA, ficando com as cadeias separadas. A esta perda da estrutura terciária da molécula chama-se desnaturação.

**Hibridação:** Este passo ocorre entre os 50°C a 65°C. A temperatura desce para que os *primers* se possam ligar às sequências complementares do DNA simples. A temperatura ótima da hibridação ou *annealing* depende da composição e sequência de cada um dos primers, e é determinada experimentalmente para cada par de primers.

**Extensão:** Este passo ocorre tipicamente a 72°C, mas é dependente da temperatura ótima da DNA polimerase. Aumenta-se a temperatura para que a DNA polimerase amplifique as cadeias a partir dos *primers*, criando uma nova cadeia de DNA.

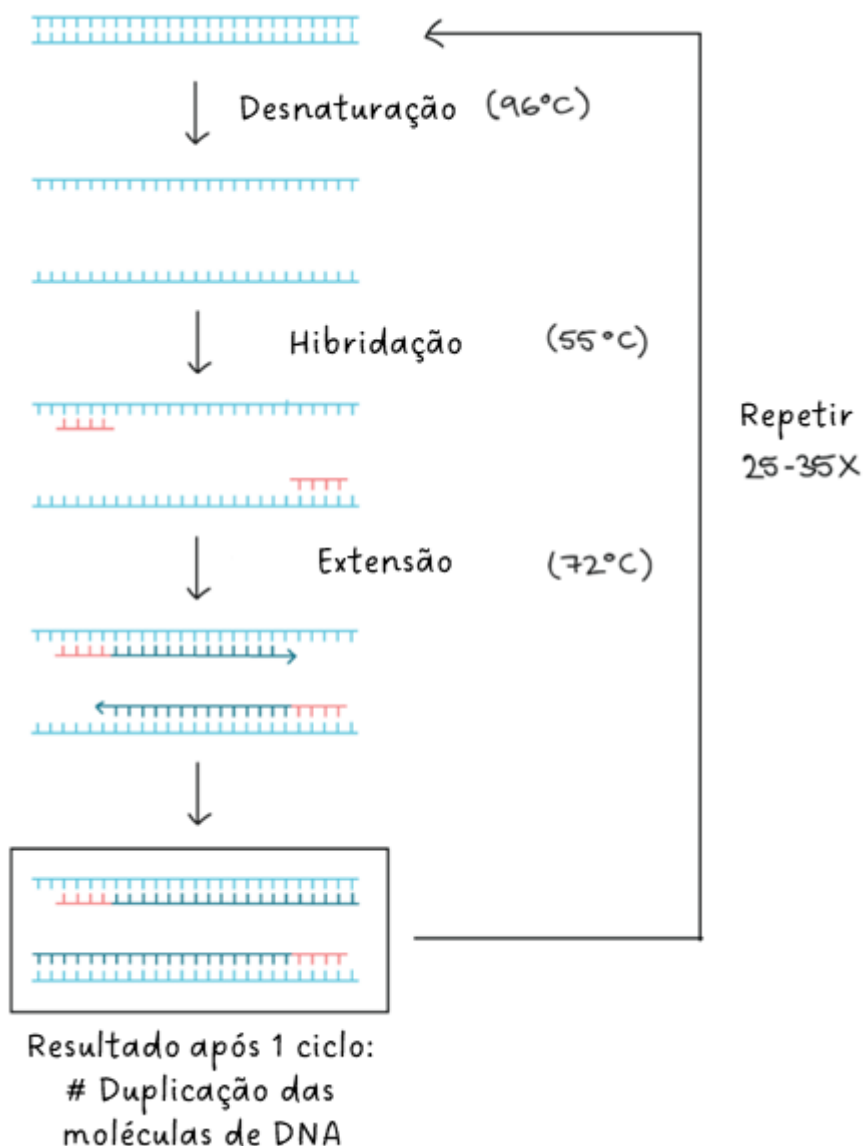


Figura 24 – Representação das três etapas da técnica de PCR <sup>50</sup> (adaptado por Fernanda Miguel).

Cada ciclo de desnaturação, hibridação e extensão é repetido normalmente entre 25 a 35 vezes, de modo a amplificar exponencialmente o material genético presente na amostra (Figura 25). Em certas situações em que a temperatura de hibridação é quase idêntica à de extensão, ou na situação presente do diagnóstico da COVID-19, em que a região a amplificar é tão pequena que a polimerase consegue atuar a uma temperatura sub-ótima com uma velocidade de catálise aceitável, os ciclos são reduzidos a 2 etapas: desnaturação e hibridação + extensão <sup>50; 51</sup>.

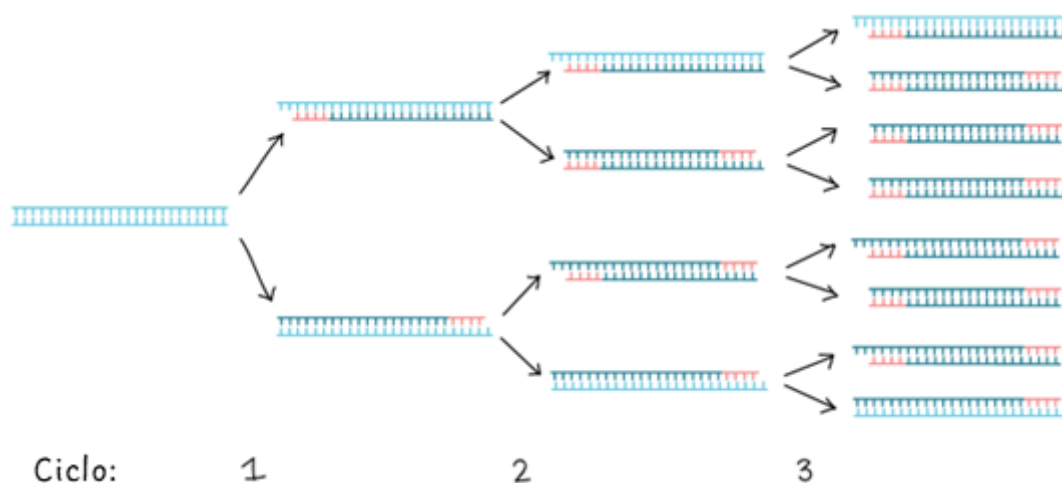


Figura 25 – Representação da amplificação exponencial do DNA presente na amostra, em cada ciclo <sup>50</sup> (adaptado por Fernanda Miguel).

A técnica de *PCR* tradicional não permite aferir a quantidade de produto amplificado e correlacioná-la com a quantidade de DNA molde inicial, com um elevado grau de precisão. Requer no final da reação o uso de outra técnica como a eletroforese em gel de agarose para se ter a percepção do tamanho dos fragmentos amplificados, e de um modo qualitativo avaliar a quantidade de produto formado pela comparação da intensidade das bandas. Sendo uma técnica de análise *end-point*, a quantificação ficará afetada pela potencial perda de eficiência ao longo dos ciclos <sup>50; 51</sup>.

A técnica apresenta ainda outra limitação, que é o facto de apenas ser possível amplificar a partir de um molde de DNA. Contudo, foram desenvolvidas outras técnicas que contornam estas limitações, nomeadamente a técnica de qPCR (PCR quantitativo em tempo real), o RT-PCR (PCR sucedido por etapa de transcrição reversa) e o RT-qPCR, uma conjugação das últimas duas <sup>52; 53</sup>.

A sigla *RT-PCR* serve para descrever o *PCR* precedido de transcrição reversa e não o *PCR* em tempo real, como muitas vezes é confundido. Esta técnica permite usar RNA como molde, para depois se criar um DNA complementar (cDNA). Esta transformação é feita pela ação da transcriptase reversa, uma enzima presente nos retrovírus (como o HIV), que são vírus de RNA com capacidade de integrar o seu genoma no genoma do hospedeiro, e é a partir desse momento que ocorre amplificação, como no processo de *PCR* original (Figura 26 A) <sup>52; 53; 54; 55</sup>.

A sigla *qPCR* (*PCR quantitativo ou PCR em tempo real*) descreve o *PCR* quantitativo em tempo real, que consiste na amplificação do DNA por *PCR*, mas visualizando-se o processo da reação em tempo real. São usadas sondas marcadas com fluoróforos, que se ligam especificamente ao produto que se pretende amplificar, ou a presença de agentes fluoróforos intercalantes (genéricos) que vão permitir a quantificação do produto formado a cada ciclo, à medida que a reação progride (Figura 26 B) <sup>52</sup>.

Assim, a técnica de *RT-qPCR* baseia-se na junção dos dois anteriores. Esta técnica junta a transcriptase reversa para formação de cDNA à detecção da fluorescência indicadora de formação de produto a cada novo ciclo, permitindo uma detecção rápida de presença de RNA. (Figura 26 C) <sup>52</sup>.

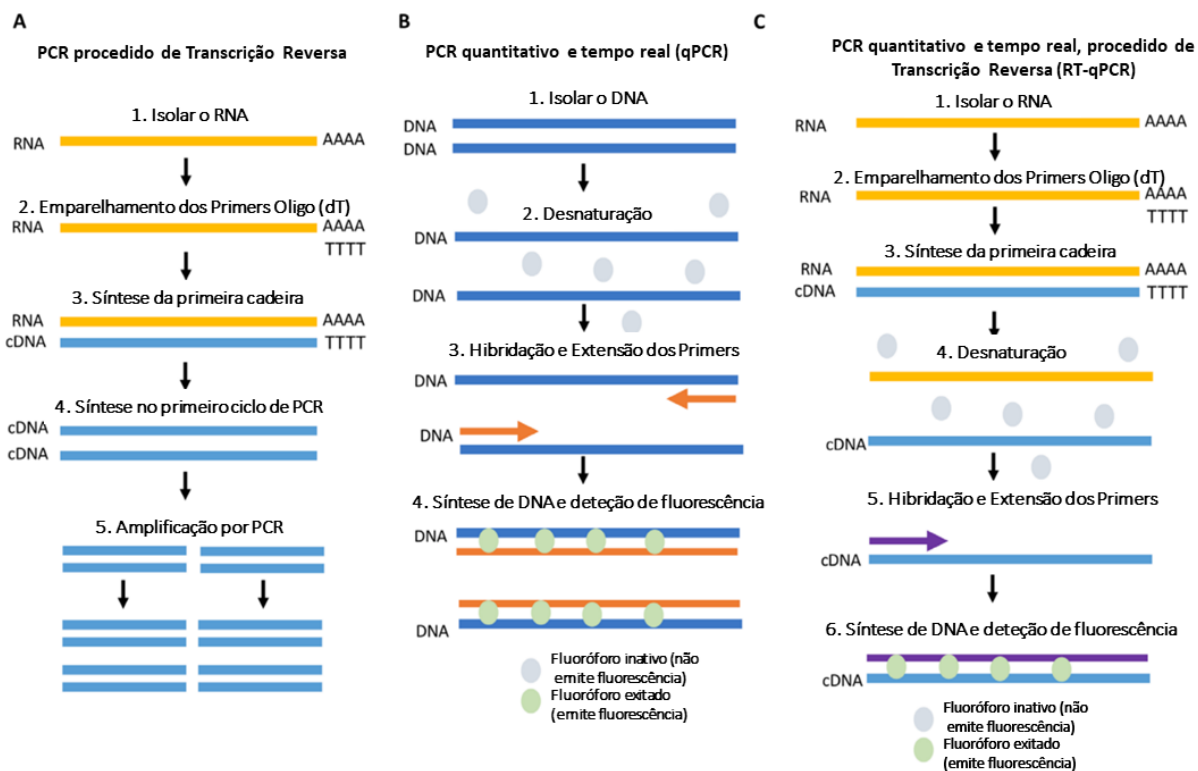


Figura 26 - Diferença entre as técnicas de RT-PCR, qPCR e RT-qPCR. A – Descreve a transcrição reversa, para obtenção de cDNA; B – Descreve quantificação em tempo real da amplificação de cadeias molde; C- Junção do método A e B, conseguindo assim transcrever RNA para cDNA e quantificar as cadeias amplificadas <sup>52</sup> (adaptado por Fernanda Miguel).

Neste trabalho, foi utilizada a técnica de RT-qPCR, aplicando a estratégia do uso de sondas (*probe*), que se baseia num sistema de fluorescência, capaz de detetar sequências específicas de nucleótidos. As sondas são desenhadas para detetar uma sequência específica de nucleótidos e ligarem-se a essa sequência quando a encontram. Em geral, para a detecção de um determinado alvo, são desenhados um par de *primers* para amplificar especificamente uma região, e uma sonda que emparelha e se liga no meio da região amplificada, como ilustrado na Figura 27. Na extremidade 5' da sonda, encontra-se um fluoróforo repórter, capaz de emitir fluorescência, e na extremidade 3' encontra-se uma molécula que aceita a energia do fluoróforo (*quencher*), fazendo com que esta emissão não seja detetada (por ser consumida). Quando no *PCR* em tempo real ocorre a etapa de hibridação, a sonda e os *primers* ligam-se, e na extensão, a *Taq* DNA polimerase, que tem também atividade de exonuclease de 5' → 3' para completar a nova cadeia, degrada a sonda, libertando o fluoróforo para o meio reacional. O afastamento do fluoróforo e do *quencher* faz com que este último não consiga absorver a energia libertada, e permite a emissão e detecção

de fluorescência (estado excitado do fluoróforo). Esta reação pode ser observada na Figura 27<sup>51; 54; 56- 58</sup>.

### Fluorescent Probe-Based Real Time PCR (qPCR)

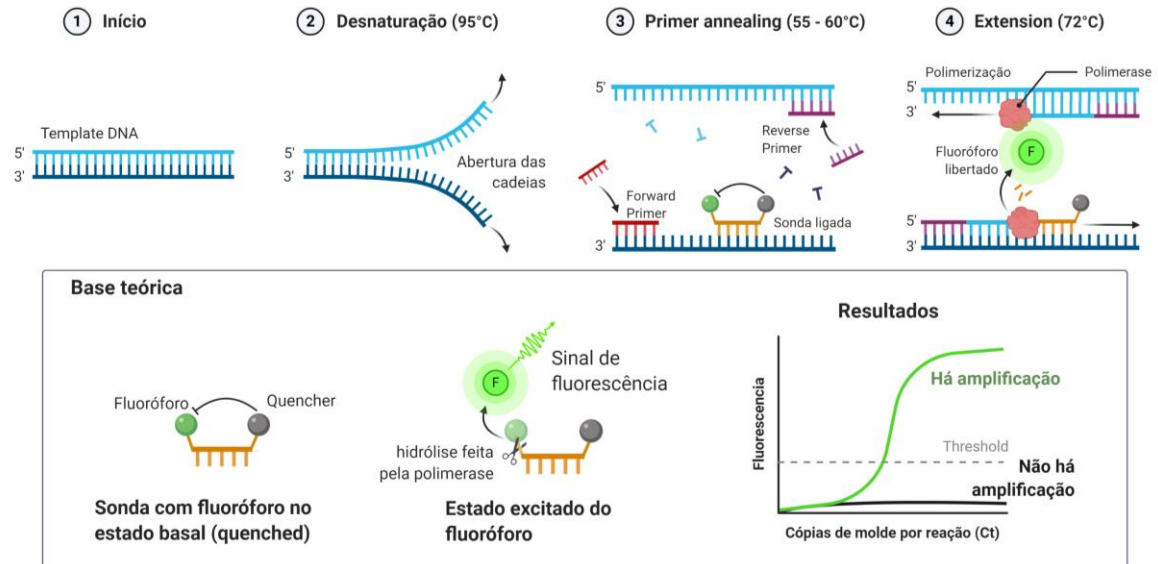


Figura 27 – Esquemática do processo de ligação da sonda a cadeia molde, e da emissão de fluorescência aquando da degradação da sonda feita pela DNA polimerase<sup>22</sup>.

A fluorescência emitida pelo fluoróforo no estado excitado, é detetada pelo aparelho a cada ciclo do PCR, e esses dados são integrados, transformados e analisados temporalmente numa representação cartesiana da fluorescência em função dos ciclos de PCR após a filtragem de ruído de fundo. Deste modo, quando existe amplificação, é possível determinar um valor numérico,  $C_p$  (*crossing point* Figura 28) ou  $C_t$  (*Cycle threshold* Figura 27) que indica genericamente o ciclo de PCR em que a fluorescência atingiu um valor limite acima do ruído de fundo<sup>54; 55; 59; 60</sup>.

A determinação do  $C_t$  é feita de um modo mais simplista, correspondendo simplesmente à determinação da coordenada de ciclos de PCR à qual a curva de fluorescência ultrapassa uma linha limite de fluorescência pré-definida pelo operador (a linha de *threshold*)<sup>54; 55; 59; 60</sup>.

O  $C_p$  é um valor similar ao  $C_t$  mas que é determinado com base na análise matemática do comportamento da curva de fluorescência em função dos ciclos de PCR. O algoritmo exato para a determinação do valor de  $C_p$  depende do programa usado, podendo o operador definir os parâmetros que irão definir o limiar a partir do qual se considera que a emissão de fluorescência é significativa. No presente trabalho optou-se pela determinação do  $C_p$ <sup>54; 55; 59; 60</sup>.

Estes valores de  $C_p$  permitem ao operador identificar a presença do alvo de interesse numa amostra, evidenciado pela sua amplificação durante a reação, pois sempre que ocorre amplificação, um valor  $C_p$  é calculado pelo programa associado ao equipamento e emitido ao operador. Sabendo que, idealmente, a cada ciclo ocorre a duplicação da molécula de DNA alvo, o valor de  $C_p$  permite ainda, por comparação com um conjunto de reações com quantidades de alvo conhecidas, criar uma curva padrão e quantificar o alvo. O  $C_p$  será

indiretamente proporcional à quantidade de alvo na amostra, ou seja, quanto menor, maior a quantidade de molde presente inicialmente <sup>54; 55; 59; 60</sup>.

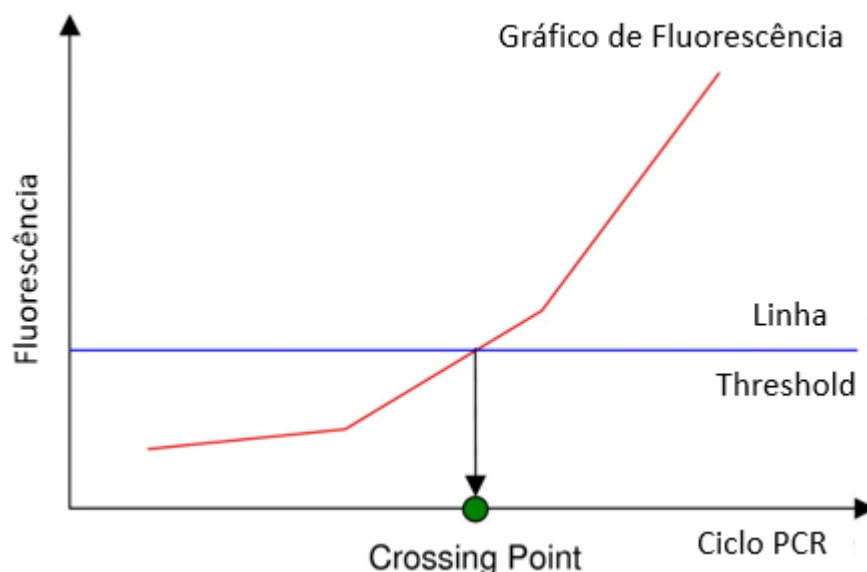


Figura 28 – Definição do Cp numa curva de fluorescência de qPCR, onde o ponto verde é o crossing point, representando o momento para o qual é detetado o valor mínimo definido para a qual a fluorescência é detetada (limite threshold) <sup>59</sup> (adaptado por Fernanda Miguel).

#### 1.5.1.1. Primers e sondas usados para a deteção do SARS-Cov-2 por RT-qPCR

No final de 2019, dada a necessidade premente de se conseguir diagnosticar os casos de infeção pelo SARS-CoV-2, para a deteção do SARS-CoV-2 por RT-qPCR foram propostos vários protocolos, por diferentes agências e laboratórios de referência, que foram rapidamente partilhados na plataforma da OMS. Todos estes métodos se baseiam na identificação de um alvo viral e na confirmação do diagnóstico por amplificação de um segundo alvo viral, senão mesmo de um terceiro.

No presente trabalho, implementou-se a metodologia recomendada pelo CDC (Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos da América), por ser a metodologia que o IMM (Instituto de Medicina Molecular) validou junto do INSA.

Assim, para detetar o SARS-CoV-2 foram usados 2 conjuntos de *primers* e *sonda*, cujo gene alvo é o que codifica a proteína N do nucleocapsídeo, e que se encontra localizado na região 3' do genoma viral. Cada par de *primers* e sonda amplificam uma zona alvo no gene conforme ilustrado a azul na Figura 29, e que foram denominados N1 e N2 respetivamente <sup>61</sup>.

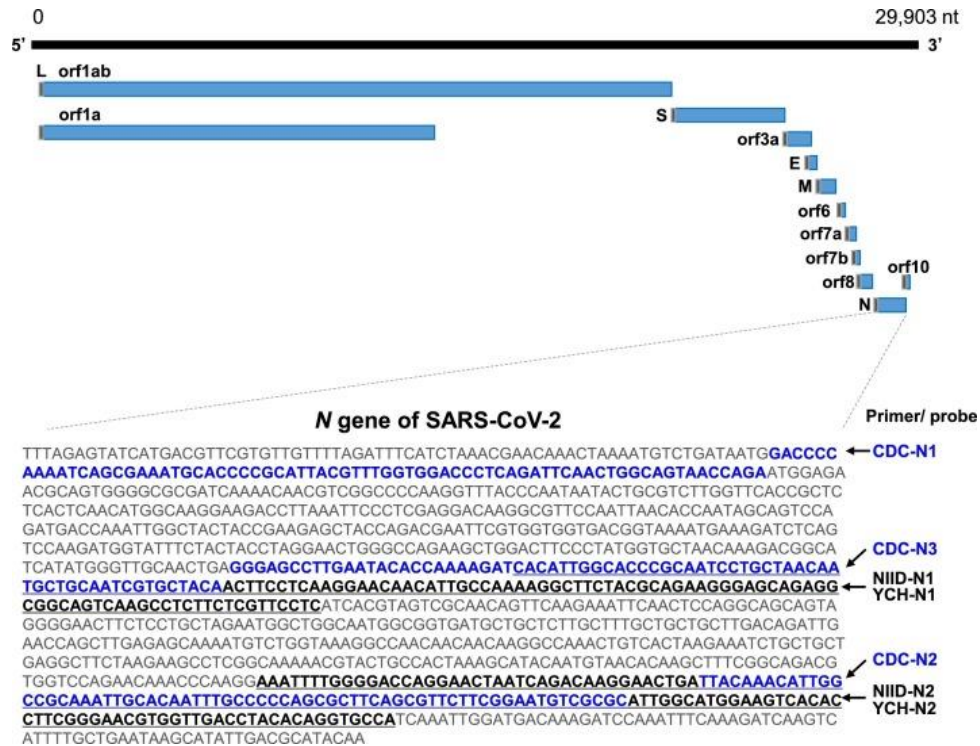


Figura 29 – Genoma do SARS-CoV-2 com especificação dos alvos genômicos N1 e N2. As regiões alvo propostas pelo CDC estão marcadas a azul. Outros alvos propostos por outras entidades estão marcados a preto.<sup>61</sup>

Como se pode ver na Figura 29, o CDC apresentou uma terceira região alvo (N3), mas descartou a sua utilização, e outras regiões do gene N foram escolhidas como alvos de identificação do SARS-CoV-2, por entidades como por exemplo o Instituto Nacional de doenças infecciosas do Japão (NIID)<sup>61</sup>.

Na Europa, tanto o Institute Pasteur como o Hospital Le Charité de Berlim propuseram alvos fora do gene N, abordando neste último caso a identificação de regiões típicas do coronavírus tipo SARS, e o segundo alvo específico do SARS-CoV-2. Esta abordagem tinha um intuito de diferenciar as infeções, numa altura em que não se previa uma expansão tão aguda da pandemia.

Alguns destes alvos vieram a certificar-se pouco robustos para acompanhar o aparecimento de variantes genéticas, podendo ser atualmente usados como mecanismos de identificação preliminar de VOCs, pela amplificação deficiente ou não amplificação de alvos (por exemplo na proteína S).

A Figura 30, ilustra a localização dos primers e sonda dos alvos virais N1 e N2.

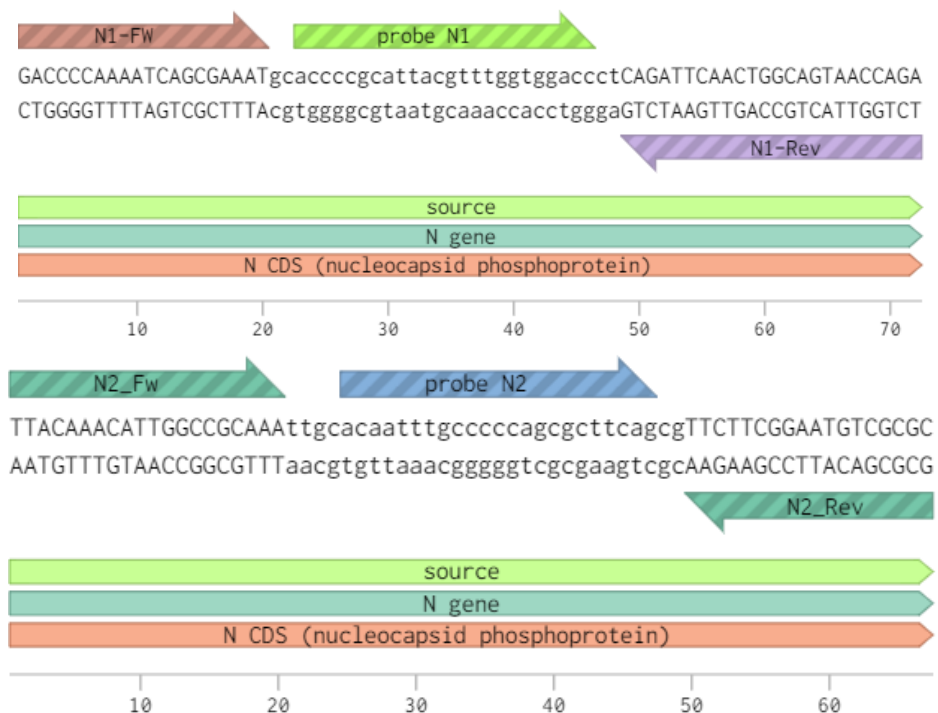


Figura 30 – Esquema da Localização dos primers e sonda do alvo N1 e N2 no genoma viral, obtido com o programa *Benchling*.

Para além dos alvos genómicos do vírus, também foi usado um alvo como controlo positivo da qualidade da amostra, nomeadamente a deteção da RNAse *P* humana (RP), pois estas amostras são recolhidas de humanos e vêm sempre contaminadas com material genético do hospedeiro.

Para cada alvo existe um *primer F* (do inglês *forward*) que se liga à cadeia complementar na região 5', e o *primers R* (do inglês *reverse*) que se ligam à cadeia molde na região 3', e as sondas recomendadas têm ligado na sua extremidade 5' o fluoróforo *FAM* e na extremidade 3' o *quencher BHQ1*, cujas sequências estão descritas na Tabela 2 <sup>62</sup>.

Tabela 2 – Primers e sondas utilizados para a detecção por RT-qPCR do SARS-CoV-2 <sup>62</sup>.

Nome	Descrição	Sequência de oligonucleotídeos
2019-nCov_N1-F	Primer Forward 2019-nCov_N1	5'-GAC CCC AAA ATC AGC GAA AT-3'
2019-nCov_N1-R	Primer Reverse 2019-nCov_N1	5'-TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG -3'
2019-nCov_N1-P	Sonda 2019-nCov_N1	5'-FAM-ACC CCG CAT TAC GTT TGG TGG ACC- BHQ1-3'
2019-nCov_N2-F	Primer Forward 2019-nCov_N2	5'-TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA -3'
2019-nCov_N2-R	Primer Reverse 2019-nCov_N2	5'-GCG CGA CAT TCC GAA GAA -3'
2019-nCov_N2-P	Sonda 2019-nCov_N2	5'-FAM-ACA ATT TGC CCC CAG CGC TTC AG- BHQ1 -3'
2019-nCov_RP-F	Primer Forward RNase P	5'-AGA TTT GGA CCT GCG AGC G -3'
2019-nCov_RP-R	Primer Reverse RNase P	5'-GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT -3'
2019-nCov_RP-P	Sonda RNase P	5'-FAM- TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG- BHQ1 -3'

### 1.5.2. PCR MULTIPLEX

A técnica de PCR *Multiplex* consiste na amplificação simultânea de vários produtos, na mesma reação PCR, recorrendo à utilização de vários *primers* e sondas diferentes. Esta tem como objetivo amplificar diversas zonas genómicas diferentes, ao mesmo tempo, e no caso do *RT-qPCR*, poder identificar a amplificação que cada alvo genómico teve, devido a presença de sondas que emitem sinais de fluorescência distintos. Para que esta detecção possa ocorrer cada sonda emite uma fluorescência específica através do uso de fluoróforos distintos <sup>58, 60; 63</sup>.

A Figura 31 ilustra os diferentes fluoróforos com os respetivos comprimentos de onda, que podem ser usados nas técnicas de PCR em tempo real, e o respetivo comprimento de onda de excitação e emissão, que permite a sua detecção através de diferentes canais do aparelho <sup>58; 60; 63</sup>.

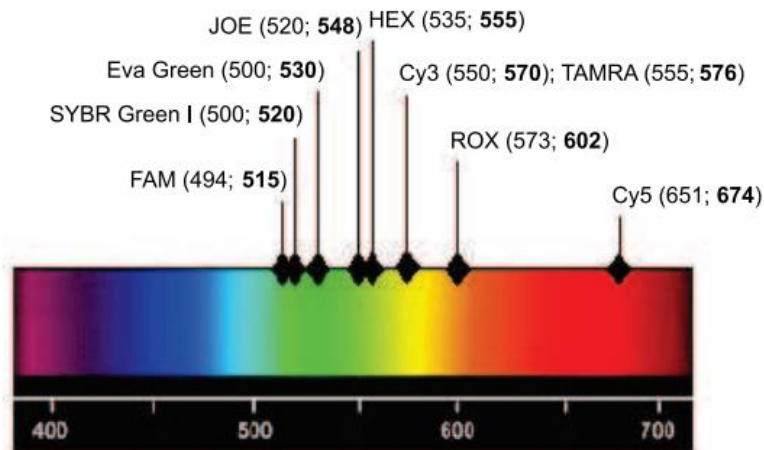


Figura 31 – Comprimentos de onda onde são detetados os fluoróforos FAM, SYBR Green I, Eva Green, JOE, HEX, Cy3, ROX e Cy5. Entre parêntesis está indicado o comprimento máximo de excitação e de emissão (em negrito) <sup>63</sup>.

Esta técnica tem a vantagem de reduzir o número de reações distintas individuais que são feitas para cada amostra. No caso da detecção do SARS-CoV-2, é bastante útil pois são realizadas 3 reações para cada amostra.

A técnica exige aparelhagem específica, com capacidade de detecção simultânea de vários canais de detecção diferentes, ou seja, em comprimentos de onda diferentes, para que ao ler no comprimento de onda de cada fluoróforo, na mesma reação se possam obter resultados diferentes <sup>63; 64</sup>.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo é descrita sumariamente a metodologia aplicada para a implementação do IPS COVID Lab nas infraestruturas da ESTBarreiro/IPS focando a validação do procedimento de análise por PCR em tempo real, e o desenvolvimento de um protocolo de análise por PCR multiplex. Como parte deste trabalho foi ainda preparado um documento referente aos procedimentos operacionais padrão do laboratório para a etapa de análise por RT-qPCR, que se encontra em anexo (Anexo 1), e onde os procedimentos estão mais detalhados.

### 2.1. INSTALAÇÕES E CIRCUITO

O IPS COVID Lab encontra-se sediado na ESTBarreiro/IPS, nos Laboratórios de Engenharia Química e Biológica. Este encontra-se dividido em duas salas distintas, a sala de extração de RNA e a sala de RT-qPCR. Na Figura 32 encontra-se representado o fluxo das amostras e a planta do piso com a indicação das salas usadas.

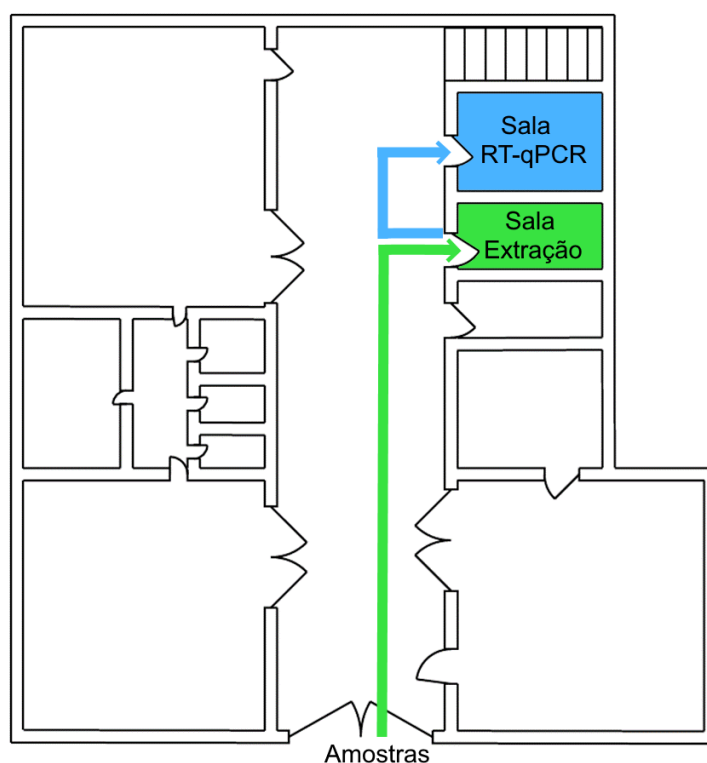


Figura 32 – Representação do IPS COVID Lab, com o respetivo fluxo de trabalho.

O fluxo de trabalho realizado neste laboratório, começa com a chegada das amostras, que são encaminhadas para a sala de extração. Nesta sala os tubos onde se encontram as amostras de colheitas naso/oro-faríngeas são devidamente desinfetados com lixívia a 15 % e são encaminhados para o processo de inativação térmica das amostras (embora as amostras sejam colocadas em meio inativante, faz-se uma inativação térmica por extra segurança).

Depois desta inativação, faz-se o processo de extração com os seus devidos passos (subcapítulo 2.2) e no fim são colocadas numa caixa de transporte e transportadas para a sala de PCR onde são recebidas e aplicadas numa placa de PCR (com os reagentes necessários) nos poços definidos para cada amostra. mesma placa é colocada no aparelho de Real Time, que incuba a(s) reação(ões), e depois de terminado o programa, é feita a análise e são emitidos os resultados.



Figura 33 - Distribuição dos equipamentos na sala de RT-qPCR nos laboratórios

## 2.2. PREPARAÇÃO DE AMOSTRA E EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL

Atualmente, para realizar extrações e purificações de DNA ou RNA, são utilizados *Kits* comerciais que se baseiam em propriedades de adsorção à sílica, do DNA e RNA e que combinam com a tecnologia de micro centrifugação (colunas de spin). No manuseamento de amostras com RNA, deve-se ter sempre uma atenção redobrada, pois este é mais instável que o DNA <sup>65</sup>.

Neste estudo foi utilizado o kit de extração NZY Viral RNA Isolation kit (NZYTech), seguindo as instruções do fornecedor. Neste processo, uma alíquota da amostra do exsudado naso/oro-faríngeo pré-inativada por aquecimento durante 15min a 56°C, foi transferida para um tubo e perfeito o volume até 350 µL com o *buffer* de inativação e *lise* (NVL), de seguida foi misturado com igual volume de etanol, para que o vírus se desintegrasse e o RNA ficasse livre na solução e em condições de adsorver-se à sílica. De seguida esta solução foi colocada numa coluna de purificação (passo1 da Figura 34) e centrifugada (passo 2 da Figura 34). Depois deste processo, como o RNA tem afinidade com a coluna de sílica, fica retido. Na coluna também podem ficar agregados outros componentes, por isso foram efetuadas lavagens consecutivas com os *buffers* NV e NVW, para que esses componentes se libertem da membrana e para que nesta fique só RNA (passo 3 da Figura 34). Por fim, foi adicionado o meio de eluição (60 µL de água sem nucleases), para que o RNA deixasse de ter afinidade com a membrana (passo 4 da Figura 34), e que com uma centrifugação seja eluído no líquido de eluição (5 da Figura 34). Concluída a extração e purificação do RNA de cada amostra, este fica armazenado num *ependorf* que é transferido para a sala de PCR, onde é guardado provisoriamente nas caixas de amostras a analisar, a -20°C, e está pronto para a etapa seguinte, a da análise por RT-qPCR. O armazenamento a longo prazo é feito a -80 °C.

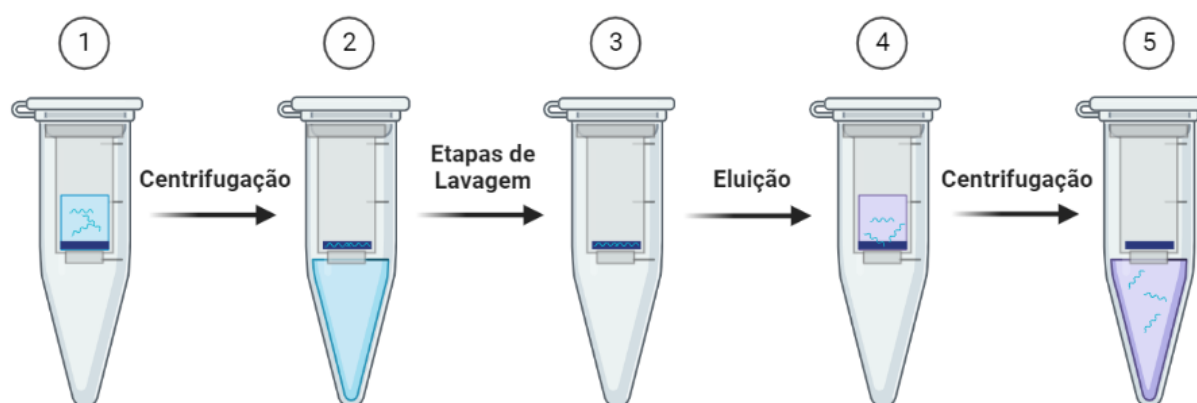


Figura 34 – Esquema do processo de extração com os vários passos do processo, onde em 1 tem-se a amostra por purificar com etanol, em 2 realiza-se a centrifugação para o RNA ficar agregado à membrana, em 3 temos os processos de lavagens, em 4 a eluição do RNA presente na membrada da coluna e em 5 o RNA extraído <sup>22</sup>  
(adaptado por Fernanda Miguel)

### 2.3. DETEÇÃO DO SARS-CoV-2 POR RT-qPCR, MÉTODO PADRÃO OU *SIMPLEX*

O método padrão, é um método adaptado do *Standard Operating Procedure and Risk Assessment do IMM Covid 19 Diagnostic* <sup>66</sup>. Com base neste, foi realizado um Procedimento Operacional Padrão e Avaliação de Risco – Preparação de amostras para análise por PCR em tempo real do IPS COVID LAB, que se encontra em anexo (Anexo 1)

Este método tem como base a detecção de um alvo genómico de interesse por cada reação. Neste caso em específico temos 3 alvos genómicos diferentes, RP referente ao alvo da RNase P Humana, N1 e N2 regiões do gene N do vírus SARS-CoV-2, previamente referidos na Tabela 2 no ponto 1.5.1.1. Para a detecção destes alvos, existem duas etapas distintas antes de colocar as amostras a analisar por PCR de tempo real. Estas etapas são a preparação das misturas reacionais (ou *mix*) e a adição de amostras e controlos positivos, sendo estas executadas em duas câmaras distintas, para que existam condições que garantam a ausência de potenciais contaminações por ácidos nucleicos.

Na primeira etapa efetua-se a preparação de todos os reagentes da reação obtendo uma *mix* reacional para o alvo RP, outra para o alvo N1 e outra para o alvo N2.

Cada *mix* reacional contém o par de *primers* e sonda dos genes/alvo de interesse (usando-se o kit *2019-nCoV CDC Probe and Primer Kit for SARS-Cov-2* da BIOSEARCH TECHNOLOGIES), uma *master mix* (*One-step RT-qPCR Master Mix (2x)* da NZYTech) que contém a transcriptase reversa, a Taq DNA polimerase, os nucleótidos e outros componentes necessários à reação, água sem nucleases (água de grau de pureza para biologia molecular, da NZYTech) para perfazer o volume de reação, um estabilizador de reações de hibridação inespecíficas, nomeadamente o DNA de testículos de salmão (Deoxyribonucleic acid sodium salt da *Sigma-Aldrich*). Este último apenas se adiciona nas reações para o alvo N2. Foi ainda adicionado à *mix* reacional do alvo N2, pois verificou-se a ocorrência de reações inespecíficas, com amplificações fracas e tardias, que depois levavam a resultados inconclusivos. Este facto foi observado por outros autores. A adição do DNA de Salmão levou a uma diminuição destas ocorrências conforme demonstrado nos resultados (capítulo 3.1.2.1) <sup>67,68</sup>.

O volume final de cada reação é de 20  $\mu\text{L}$ , após a adição de 5  $\mu\text{L}$  de amostra ou solução de controlo positivo ou negativo. A composição e ordem de adição para a preparação de cada *mix* reacional encontra-se esquematizada na Tabela 3.

Tabela 3 - Componentes da *mix* reacional.

Reagentes	Volume por uma Reação		Concentração
	RP e N1	N2	
Água sem nucleasse	4 $\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L}$	
One-step RT-qPCR Master <i>Mix</i> (2x)	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	
DNA de testículos de Salmão	0 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	0,1 ng/mL
<i>Mix</i> de <i>Primers</i> e sondas	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	<i>Primers</i> – 400 nM <i>Sondas</i> – 100 nM
Volume Total	15 $\mu\text{L}$	15 $\mu\text{L}$	

As *mix* são preparadas para  $n + 3$  amostras (1 reação de controlo positivo e 2 reações de controlo negativo), e com um excesso de 15% (no documento SOP PCR, em anexo, foi criada uma tabela de preparação das *mix* para os diversos números de amostras possíveis). Depois de preparadas as *mix*, são distribuídos 15  $\mu\text{L}$  pelos poços da placa de PCR, como se encontra esquematizado no anexo 1. Esta distribuição foi realizada de forma a ser mais prático para o operador. Após esta distribuição, é adicionado 5  $\mu\text{L}$  de água sem nucleases nos poços destinados aos controlos negativos, e são tapados. Concluindo este trabalho, a placa é transferida para a câmara de amostras.

Na câmara de amostras são adicionadas as amostras nos respetivos poços, para cada alvo genómico, e são também adicionadas as soluções de controlo positivo. O volume é sempre 5  $\mu\text{L}$ , conforme já referido. No caso dos alvos virais, a solução é feita por diluição de RNA sintético do vírus SARS-CoV-2, da *European Commission - Joint Research Centre*, de modo a serem colocados aproximadamente 500 000 cópias em cada reação. Inicialmente, para o alvo humano (RP), usou-se uma solução gentilmente cedida pelo Dr. Ricardo Leite do Instituto Gulbenkian de Ciência, e posteriormente adotou-se a utilização de *pools* de amostras negativas, analisadas no laboratório e com Cp conhecido.

Depois da placa conter todos os reagentes, é selada com um selo ótico (Opti-seal Optical Sealing Sheet da marca Bioron), e colocada numa centrífuga para efetuar um *spin-down* e garantir que todas as gotículas que possam ter ficado nas paredes dos tubos se reúnem no fundo do tubo. Terminado este passo, é colocada a placa no aparelho de RT-qPCR (Bioron

Diagnostics GmbH, RealLine 96-5), selecionado o programa no software de controlo RealTime\_PCR e versão de setembro de 2019 (Bioron Diagnostics) e iniciada a corrida.

O programa usado é o indicado no protocolo usado no IMM<sup>66</sup>, e encontra-se esquematizado na seguinte tabela:

Tabela 4 – Programa de amplificação utilizado.

Fases	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	50 °C	10 min	1
2	95 °C	5 min	1
3	95 °C	5 seg	45
	55 °C	30 seg	

O procedimento final, encontra-se sistematizado na figura 35:

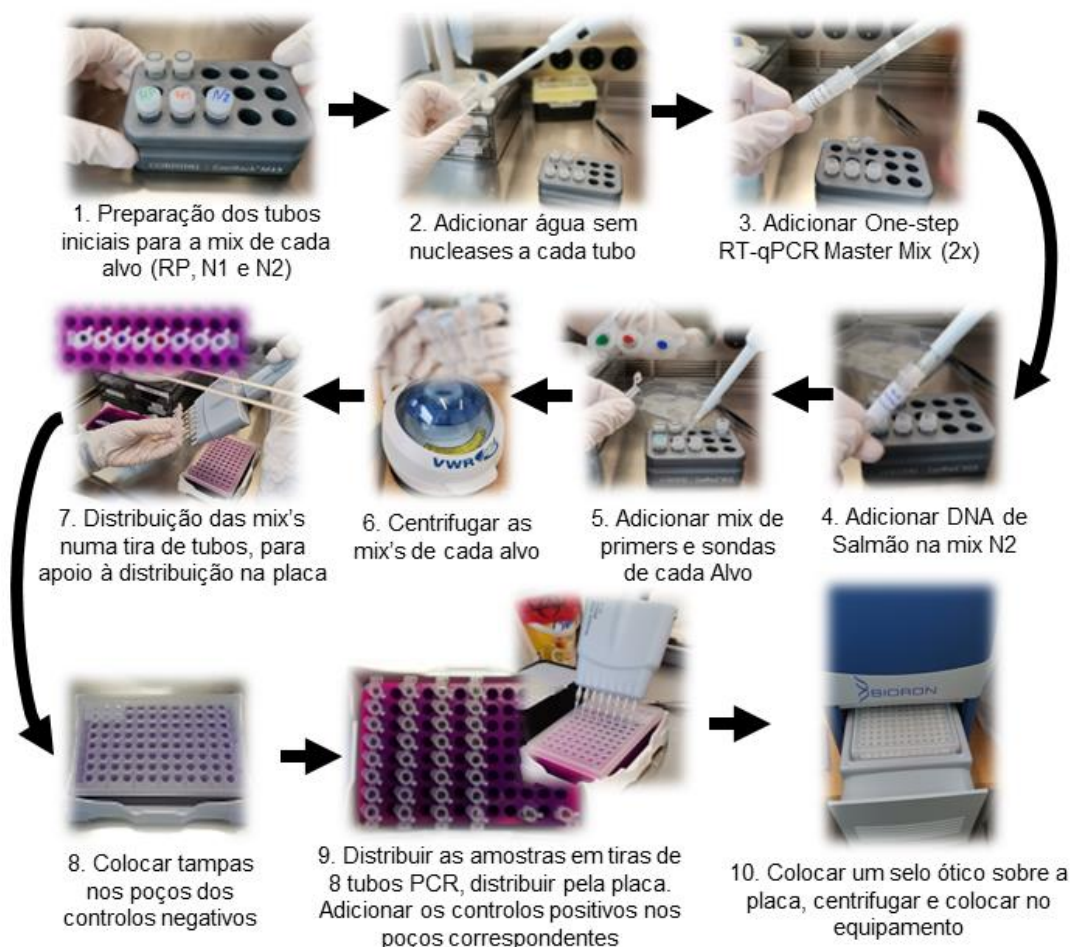


Figura 35 – Procedimento final do método padrão sintetizado.

## 2.4. DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DO SARS-CoV-2

A grande diferença do método padrão (simplex) para o multiplex é que na técnica simplex, cada gene alvo é avaliado em um único poço da placa de PCR, utilizando sondas que tem o mesmo fluoróforo. Na técnica multiplex existe um fluoróforo diferente na sonda para cada alvo de interesse, o que permite obter resultados de amplificação de cada alvo, em simultâneo utilizando um único poço da placa de PCR, aumentando assim a capacidade de resposta por parte do laboratório.

### 2.4.1. PRIMERS E SONDAS MULTIPLEX PARA ALVOS GENÓMICOS RP, N1 E N2

Sendo uma adaptação do método Padrão validado, os alvos genómicos a serem analisados foram os mesmos, nomeadamente o alvo N1 e N2 viral, e o alvo RP como controlo de qualidade. As sequências dos *primers* e sondas também não sofreram alteração. Os *primers* e sondas foram sintetizados pela STAB Vida, Lda, e a única alteração que foi introduzida foram os fluoróforos e respetivos *quenchers* das sondas, conforme listado na Tabela 5

Tabela 5 – Representação das sondas utilizadas para cada alvo genómico na técnica multiplex.

Alvo Genómico	Fluoróforo 5'	Quencher 3'
RP	HEX	Tamra
N1	FAM	BHQ-1
N2	ROX	BHQ-2

Os *primers* e sondas foram fornecidos liofilizados e foram ressuspensos em água ultrapura para biologia molecular (NZYTech), à concentração de 100 µM. A preparação das sondas foi feita com atenção a proteger da luz.

Depois de ressuspensos, prepararam-se as 3 soluções-mãe de *primers*+sonda para cada alvo (RP, N1 e N2) adicionando-se 10 µL de *Primer F*, 10 µL de *Primer R*, 2,5 µL da sonda e 17,5 µL de água de biologia molecular, ficando cada solução final com 40 µL de volume (volume calculado como necessário para preparar todos os ensaios). Estas soluções encontram-se visualizadas na Figura 36

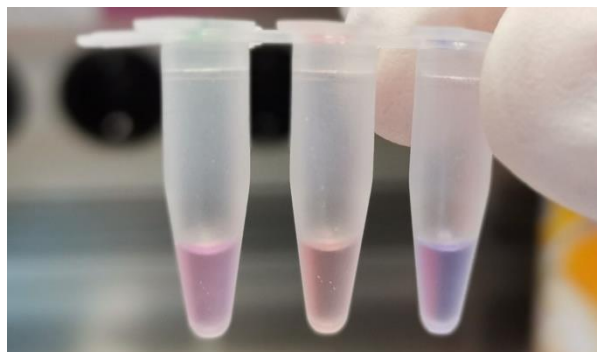


Figura 36 - Exemplificação das soluções mãe realizadas RP, N1 e N2 (da esquerda para a direita)

Os *primers* encontram-se a uma concentração de 25  $\mu\text{M}$  e a sonda a uma concentração de 6,25  $\mu\text{M}$ .

#### 2.4.2. AVALIAÇÃO DE REAÇÕES RT-QPCR EM *MULTIPLEX*

Com o intuito de avaliar a capacidade de detecção em simultâneo de vários alvos, usando a técnica de PCR *multiplex*, e comparar com o método padrão, foram realizados vários ensaios, variando o número de alvos a analisar em simultâneo, que incluiu, os 3 alvos, diferentes combinações de 2 alvos e, para controlo da eficiência com a alteração do fluoróforo, em *simplex*.

Para tal, foram preparadas 7 soluções de *primers*+sonda(s), e cuja constituição se encontra na Tabela 6. De acordo com o número de alvos a analisar em cada solução, foram adicionados 8  $\mu\text{L}$  de cada solução-mãe de cada alvo escolhido (descrita em 2.4.1) e o restante volume perfeito com água de biologia molecular até um volume de 40  $\mu\text{L}$ , de modo a ficarem com cada primer a 5  $\mu\text{M}$  e a sonda a 1,25  $\mu\text{M}$

Tabela 6 – Volumes das soluções utilizadas para os diversos ensaio onde varia a utilização ou não dos alvos genéticos a analisar

Solução (40 $\mu\text{L}$ )	RP	N1	N2	H2O
Triplex (RP+N1+N2)	8 $\mu\text{L}$	8 $\mu\text{L}$	8 $\mu\text{L}$	16 $\mu\text{L}$
Duplex (N1+N2)	-	8 $\mu\text{L}$	8 $\mu\text{L}$	24 $\mu\text{L}$
Duplex (RP+N1)	8 $\mu\text{L}$	8 $\mu\text{L}$	-	24 $\mu\text{L}$
Duplex (RP+N2)	8 $\mu\text{L}$	-	8 $\mu\text{L}$	24 $\mu\text{L}$
Simplex N1	-	8 $\mu\text{L}$	-	32 $\mu\text{L}$
Simplex N2	-	-	8 $\mu\text{L}$	32 $\mu\text{L}$
Simplex RP	8 $\mu\text{L}$	-	-	32 $\mu\text{L}$

Usaram-se concentrações inferiores de *primers* e sondas no método padrão do laboratório de acordo com as sugestões do fabricante da mistura enzimática para procedimentos em *multiplex*.

Para caracterizar o método analisou-se a capacidade de deteção e a eficiência das reações sendo preparadas 8 diluições sucessivas 1/5 das soluções de controlo positivo (de RNA viral artificial ou de mistura de RNA extraídos de indivíduos não infetados), usando como solvente água ultrapura e ainda um conjunto de 8 diluições sucessivas 1/5 do RNA viral artificial usando como solvente uma *pool* de RNAs extraídos de indivíduos não infetados. A gama analisada de concentração de RNA viral é de 20 000 a 0,256 cp/  $\mu$ L em água (Figura 37), e em RNA extraídos de indivíduos não infetados de 20 000 a 32 cp/  $\mu$ L

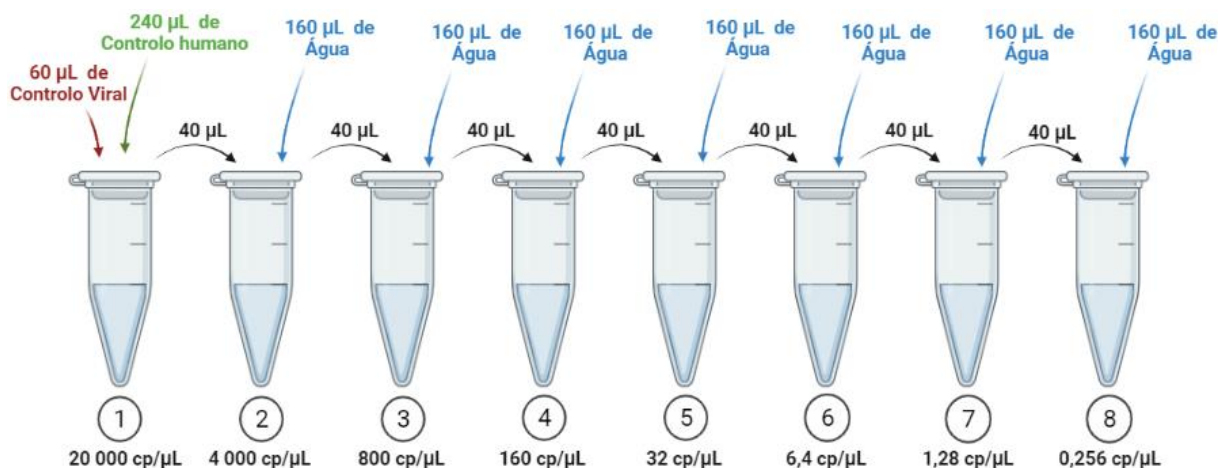


Figura 37 – Representação das diluições realizadas nesta atividade, com as suas respetivas concentrações de RNA viral

Foram preparadas misturas reacionais usando as 7 soluções de combinação de *primers*+sonda(s) anteriormente referidas, conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7 – Preparação da Master *Mix* para cada ensaio.

	1 X	27 X	27 X + 15%
H <sub>2</sub> O	3 $\mu$ L	81 $\mu$ L	93,15 $\mu$ L
Taq 2X	10 $\mu$ L	270 $\mu$ L	310,5 $\mu$ L
DNA Salmão	1 $\mu$ L	27 $\mu$ L	31,05 $\mu$ L
Solução PP (Tabela 6)	1 $\mu$ L	27 $\mu$ L	31,05 $\mu$ L

Nota: 27 X corresponde ao nº reações a realizar (8 diluições em triplicados + 2 controlos negativos e 1 controlo positivo)

Depois de preparadas, as misturas reacionais foram distribuídas pela placa de PCR (15  $\mu$ L em cada poço), sendo posteriormente adicionado 5  $\mu$ L de cada uma das 8 diluições de RNA, ou 5  $\mu$ L da solução usada no método padrão como controlo positivo (do RNA viral ou do alvo humano) ou 5  $\mu$ L de água para os controlos negativos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para análise de amostras, foi utilizado um equipamento PCR (Bioron Diagnostics GmbH, RealLine 96-5), que tem capacidade de leitura de 5 canais sem simultâneo, e com o programa “real time PCR” do mesmo. Foram estudadas duas metodologias diferentes: o Método Padrão ou *simplex* seguindo o protocolo definido pelo IMM e que consiste na detecção de um único alvo genético por reação, e um método *multiplex*, desenvolvido no laboratório, que consiste na detecção de vários alvos genéticos por reação.

### 3.1. IMPLEMENTAÇÃO E CERTIFICAÇÃO DO MÉTODO PADRÃO (SIMPLEX) PARA DETECÇÃO DE RNA VIRAL DO SARS-CoV-2

#### 3.1.1. INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS E DIAGNÓSTICO

O método Padrão<sup>66</sup> baseia-se na utilização de 3 alvos genéticos: N1 e N2 para a detecção da presença do RNA Viral do SARS-CoV-2 e RP, para o controlo de qualidade da amostra de RNA.

Para cada amostra é necessário realizar uma reação de teste para o alvo RP, uma para o alvo N1 e outra para o alvo N2 (alvos que foram escolhidos pelo nosso laboratório, existindo outros que também poderiam ser utilizados). Os alvos N1 e N2 são alvos genómicos do SARS-CoV-2 permitindo assim verificar a sua presença na amostra, já o RP é um alvo do genoma humano, que serve como controlo interno da amostra, conseguindo assim avaliar a qualidade do RNA da amostra e se na etapa de extração, o RNA foi extraído exemplarmente, pois as amostras são recolhidas de humanos havendo sempre a contaminação com material genético do paciente.

Assim sendo, é realizada uma *mix* reacional para cada um destes alvos, que é distribuída pelos poços da placa de PCR onde queremos adicionar a amostra (subcapítulo 2.3). Para cada *mix* é necessário a utilização de controlos negativos e positivos, para que se comprove que toda a mistura reacional se apresenta (ou não) em condições e se pode (ou não) apresentar contaminações com ácidos nucleicos que possam gerar falsos positivos.

Para se considerar se o resultado é positivo ou negativo, tem-se em consideração a amplificação de produtos PCR durante a reação. Tratando-se de reações de PCR em tempo real, é avaliada a forma através da detecção de emissão de fluorescência em cada etapa de extensão, pelos fluoróforos (neste caso, o FAM) que são libertados da sonda. O perfil temporal do nível de fluorescência emitida em cada reação é tratado matematicamente pelo software do equipamento, mediante alguns parâmetros pré-definidos, sendo emitido em valor numérico para os Cps, que conforme já referido, corresponde ao nº de ciclos que foi necessário para que o sinal de fluorescência ultrapassasse um limite (*crossing point*). Em reações em que não ocorre amplificação (não se observa um aumento de fluorescência), não é emitido nenhum valor de Cp. Quando os valores de Cp são acima de 35, estes são também desprezáveis e consideradas reações em que não é detetável.

Tendo em conta o que foi referido, são utilizados critérios referência, para determinar qual o resultado de diagnóstico para cada amostra. Por exemplo, para que uma amostra se considere que é detetável a presença deste vírus, os testes ao gene alvo RP, N1 e N2 têm de ser positivos, os controlos negativos de cada *mix* têm de dar resultados negativos e os controlos positivos de cada *mix* dar um resultado positivo. Já se for uma amostra onde não é detetado a presença do vírus, o teste ao gene alvo RP tem de ser positivo, o alvo N1 e N2 positivo e os controlos negativos, negativos e os controlos positivos, positivos. No caso dos resultados inconclusivos existem diversos fatores que podem influenciar este resultado. Pode ser considerado inconclusivo caso os controlos, positivos e negativos, derem resultados diferentes dos esperados, quando o N1 e o N2 derem resultados diferentes um do outro, e no caso do RP caso este dê um resultado negativo e o N1 e N2 resultado positivo, cabe ao operador decidir conforme os valores apresentados considerar se é um inconclusivo ou detetável (Tabela 8). Em caso de dúvidas em amostras inconclusivas, pode-se repetir a análise por *PCR* da amostra ou até mesmo realizar uma nova extração, se ainda houver material biológico suficiente.

Tabela 8 – Interpretação dos resultados possíveis de obter nos testes para a presença de SARS-CoV-2

Resultado	Amostra			Controlos Negativos			Controlos Positivos		
	RP	N1	N2	RP	N1	N2	RP	N1	N2
Detetado	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Não Detetado	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Inconclusivo	+	Um destes + e outro -		-	-	-	+	+	+
	-	-		-	-	-	+	+	+
		+ *							
		Um destes + e outro -							
	- ou +			Pelo menos um é +			+	+	+
-				Pelo menos um é -					

\* Poder-se-ia considerar, mediante o resultado obtido, positivo para a presença de SARS-CoV-2

Com o objetivo de ilustrar a interpretação das reações de RT-qPCR e a emissão de resultados da presença do SARS-CoV-2 (detetável, não detetável ou inconclusivo), são apresentados a título de exemplo, os resultados da análise de duas amostras, uma negativa e outra positiva, denominadas A e B respetivamente.

Iniciando pelo gene alvo RP, como representado na Figura 38, consegue-se observar que ocorreu amplificação do gene alvo na amostra A, na B e no controlo positivo. Já o controlo negativo não amplificou como era esperado. Assim dever-se-ia concluir que as amostras eram viáveis pois ocorreu amplificação do alvo humano, bem como a *mix* reacional para o RP estava em condições para que a reação ocorresse.

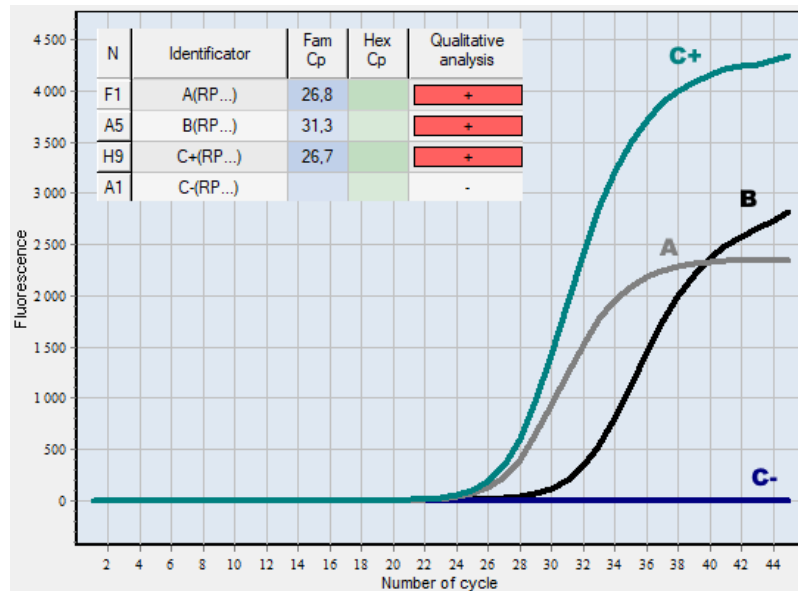


Figura 38 -Resultado da amplificação do produto alvo RP nas amostras A e B

No caso do gene alvo N1, como representado na Figura 39, consegue-se observar que ocorreu amplificação do gene alvo na amostra B e no controlo positivo. Já na amostra A não ocorreu qualquer amplificação, e como era esperado o mesmo aconteceu no controlo negativo. Assim pelo resultado dos controlos dever-se-ia concluir que a *mix* reacional para o N1 estava em condições para que a reação ocorresse.

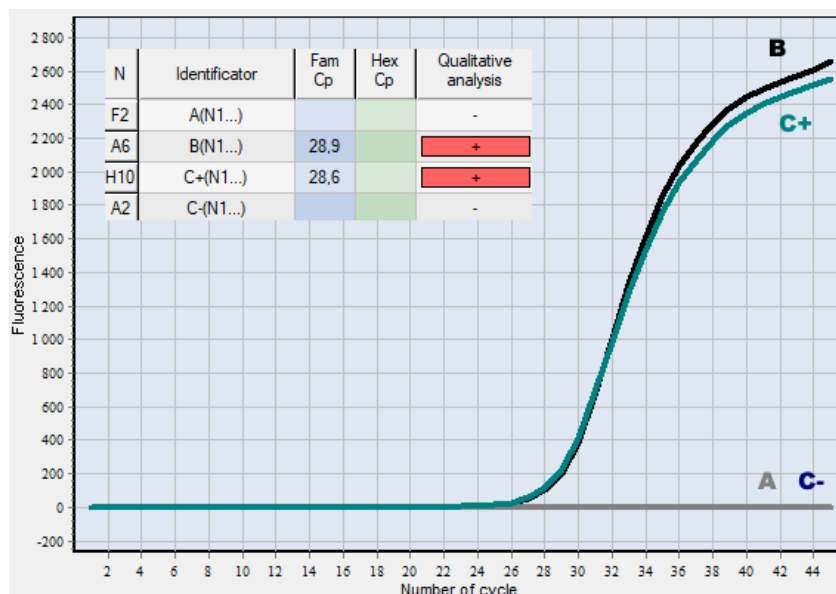


Figura 39 - Resultado da amplificação do produto alvo N1 nas amostras A e B

No caso do gene alvo N2, como representado na Figura 40, consegue-se observar que ocorreu amplificação do gene alvo na amostra B e no controlo positivo. Já na amostra A não ocorreu qualquer amplificação, e como era esperado o mesmo aconteceu no controlo negativo. Assim pelo resultado dos controlos dever-se-ia concluir que a *mix* reacional para o N2 estava em condições para que a reação ocorresse.

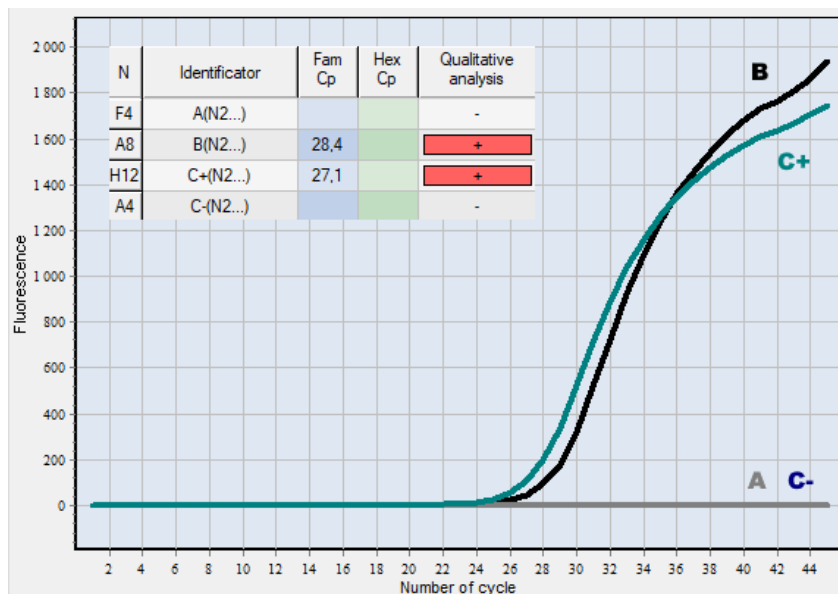


Figura 40 - Resultado da amplificação do produto alvo N2 nas amostras A e B

Observando-se os resultados obtidos para os genes alvo descritos anteriormente, consegue-se concluir que os controlos negativos e positivos em todas as reações tiveram o resultado esperado, podendo-se assim conferir que os resultados obtidos nas amostras seriam os previstos já que a *mix* reacional se encontra em condições. Em relação à amostra A, comprova-se que ocorreu amplificação no gene alvo RP e que nos genes alvo N1 e N2 não ocorreu amplificação, podendo assim concluir que na amostra A não é detetável presença de SARS-CoV-2 nesta amostra. Já na amostra B, ocorreu amplificação em todos os alvos genómicos RP, N1 e N2, que comprova que naquela amostra é detetável a presença de SARS-CoV-2. Resumidamente, e com base na Tabela 8, pode-se esquematizar que os resultados obtidos foram os seguintes:

Tabela 9 – Esquematização dos resultados das amostras A e B e dos respetivos controlos

Amostra	RP	N1	N2	Resultado
A	+	-	-	Não Detetável
B	+	+	+	Detetável
C+	+	+	+	Válido
C-	-	-	-	Válido

Legenda: c+ controlo positivo, c- controlo negativo

### 3.1.2. TROUBLESHOOTING

#### 3.1.2.1. Inconclusivos por amplificação anómala do Alvo N2

Nos primeiros dias de trabalho, começou-se a verificar que em algumas ocasiões, quando analisadas para o alvo genómico N2 amplificavam, algumas reações apresentavam curvas de amplificação diferentes das curvas de controlo positivo (controlo este que tem o genoma do SARS-CoV-2) e das amostras que deram resultados positivos. Também acontecia haver amplificação nos controlos negativos (onde não é adicionado qualquer tipo de amostra) o que não era uma situação normal e que invalidava todo o conjunto de resultados obtidos nessa placa de PCR. Para além do perfil das curvas de amplificação serem diferentes, em comparação com o alvo genómico N1, estas amostras não amplificavam, e para ser considerado que as amostras têm a presença deste vírus, têm que ocorrer amplificação dos dois alvos genómicos do vírus. Para se ilustrar estes eventos foram selecionadas 7 amostras, denominadas de C a I, cujo os resultados encontram-se esquematizado na Figura 41 A. As amostras I e H eram positivas, C e F negativas para a COVID-19. Observando estes resultados, considerou-se que os perfis de amplificação tardia e pouco intensa na reação para o alvo genómico N2, poderiam se devido a reações inespecíficas, ou seja, aleatoriamente existe um mau emparelhamento (inespecífico) que permita a amplificação de uma outra sequência de DNA que não seja o alvo desejado, sendo assim detetável essa amplificação. Apesar de pelas curvas conseguir-se ter perceção que estamos na presença de um falso positivo, pode haver situações em que não seja possível de distinguir de uma contaminação residual da *mix*, e por esse motivo era importante arranjar-se uma solução para que estas reações não ocorressem.

Apesar de não haver estudos até ao momento, falando especificamente das reações inespecíficas deste alvo genómico, soube-se que noutros locais o mesmo acontecia e que, o DNA de testículos de salmão reduzia estas reações. O uso deste DNA remonta a estudos de hibridação em *Southern blot*, como reagente que reduz a hibridação inespecífica, à semelhança de outros reagentes como o poli(dI-dC)<sup>69</sup>. Por esse motivo adicionou-se este DNA a 5 µg/mL *mix* reacional do alvo genómico N2, e utilizando as mesmas amostras referidas anteriormente, de modo a verificar se nesta situação também reduziria os eventos das reações com falsa amplificação. O resultado pode-se observar na Figura 41 B.

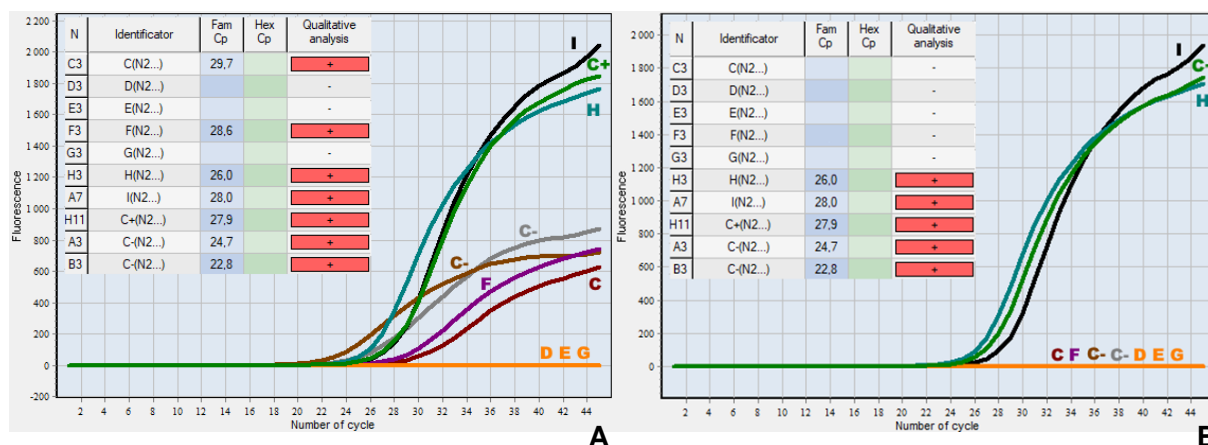


Figura 41 – A - Resultados das amostras C a I, onde as amostras I e H são amostras positivas e as amostras F e C, bem como os controlos negativos apresentam reações inespecíficas; B - Resultados das amostras C a I, onde as amostras I e H são amostras positivas e as amostras restantes negativas, onde já não há verificação de reações inespecíficas.

Como se consegue observar na Figura 41, as reações inespecíficas, que anteriormente aconteciam (painel A), deixaram de acontecer, conseguindo assim obter reações para o alvo genómico N2 mais fidedignas. Com este resultado bastante positivo, passou-se a utilizar em todas as *mix's* reacionais do gene alvo N2 o DNA de salmão, introduziu-se esta alteração na SOP PCR do IPS.

### 3.1.2.2. Inválidos por amplificação de controlo negativo RP

Ao começar a nossa atividade, deparamo-nos muitas vezes com amplificações nos controlos negativos do alvo RP. Amplificações com Cp a rondar os 35 Cp, que muitas vezes podiam invalidar a placa daquela reação porque apresentarem valores de 33, 34 que são considerados valores positivos.

Desde a implementação do Laboratório, já tínhamos dividido o processo da preparação da *mix* e colocação de amostras em duas câmaras distintas para diminuir ao máximo as contaminações. Assim, para reduzirmos ainda mais, tentando resolver o problema dos controlos negativos, implementamos mais três precauções:

- Utilização de Bata descartável por cima da bata do operador e a utilização de luvas compridas (até meio do antebraço) por cima da mesma, tentando assim reduzir a exposição da pele do operador, diminuindo assim o risco de contacto;
- Em vez de um controlo negativo para cada alvo, fazer-se dois, assim caso ocorra uma ínfima contaminação, é improvável que aconteça nos dois, podendo assim descartar problemas de contaminação na *mix* reacional no caso de uma reação dar negativo e a outra dar positivo, mas muito próximo do limite (35 ciclos);
- Colocar tampas no controlo negativo antes de a placa sair da câmara de mistura e ir para a câmara de amostras, diminuindo assim o risco da entrada de contaminantes no poço do mesmo.

Após a implementação extra destas medidas, deixaram de ocorrer amplificações nos controlos negativos, validando que a implementação de medidas extra ajudou na redução de

contaminações. De referir que estas medidas sozinhas poderiam não ter efeito e que a desinfecção do espaço é sempre importante para diminuir os riscos associados.

### 3.1.2.3. Limpeza do aparelho

Como todos os equipamentos, o PCR também tem de ter a sua manutenção. Neste caso a limpeza das cavidades do bloco térmico onde colocamos a placa de PCR. Verificou-se que ao fim de algumas corridas, ocorriam resultados com bons valores de  $C_p$ , mas com níveis de fluorescências mais baixas, e quando efetuada a limpeza, voltava-se a ter valores normais.

O fornecedor do equipamento, recomenda que ao fim de 20 corridas, se limpe com algodão humedecido (no nosso caso utilizaram zaragatoas) com etanol 96% ou álcool isopropílico 100%, mas em alguns casos e consoante a utilização do aparelho pode-se ter que realizar a limpeza mais cedo, devendo assim ter atenção aos resultados para evitar-se repetição de ensaios devido à falta de manutenção do equipamento, que leva ao gasto de reagentes desnecessário.

Todas estas medidas foram incorporadas na SOP PCR que foi criada (Anexo 1)

### 3.1.3. LIMITES DE DETEÇÃO E EFICIÊNCIA

Com o intuito de caracterizar a implementação do procedimento laboratorial, determinaram-se o limite de deteção e eficiência utilizando o método padrão. Foram realizados dois ensaios (em triplicado). Estes baseavam-se na diluição sucessiva do RNA viral do vírus SARS-CoV-2 (o RNA artificial usado nos controlos positivos) em água ou em suspensões de RNA extraído de indivíduos não infetados com SARS-CoV-2. Tentou-se com este último conjunto de amostras minimizar as condições de diagnóstico, nas quais existe sempre a “comparação” do RNA Viral com RNA proveniente do hospedeiro, que atua como controlo de qualidade com a deteção da sequência da RNase P humana. Realizaram-se no total 8 diluições 1/5 em água e 6 em RNA, determinando-se a quantidade de RNA presente em cada amostra. Em teoria, a quantidade de RNA presente na reação deveria diminuir com a diluição, obtendo-se um comportamento linear inverso do  $C_p$  em função do log da concentração, porque quanto maior for a quantidade de RNA presente, menor será o valor de  $C_p$  apresentado no final da reação<sup>63</sup>.

No método padrão de diluições sucessivas em água (Figura 42 B), observa-se e como esperado quanto mais diluído, menor a quantidade de RNA encontrado, menor serão o número de cópias realizadas. Observa-se linearidade entre o logaritmo da concentração de RNA na solução e o  $C_p$  nos alvos N1 (vermelho) e N2 (azul) até um fator de diluição de 15625 (Figura 37) o que equivale a deteção de 36 cópias na reação. Para o alvo RP (verde) observa-se linearidade apenas até a um fator de diluição 3125 de uma amostra típica preparada a partir de um exsudado naso-orofaríngeo. A partir deste limite, ainda é possível detetar amplificação dos alvos, mas não sempre, com valores de  $C_p$  acima do limite de referência (35 ciclos), mas não com linearidade de correlação com a concentração.

Estas condições não mimetizam a realidade do dia-a-dia do laboratório, pois todas as amostras que são analisadas são de origem biológica (exsudado naso-orofaríngeo). Por esta razão optou-se por efetuar o mesmo conjunto de experiências usando como solvente das diluições uma amostra de RNA obtida de um exsudado naso-orofaríngeo, descrita na Figura 42 como método padrão em RNA.

No método padrão de diluições sucessivas em RNA, observa-se que os Cp do alvo RP (verde) se mantém constantes ao longo dos ensaios, o que era esperado por ser o diluente das amostras como anteriormente referido. Em relação aos alvos N1 (vermelho) e N2 (azul), observa-se um comportamento similar ao método padrão de diluições sucessivas em água. Este método consegue detetar sem problemas até ao fator diluição de 15625 no caso do N2 e de 3125 no caso do N1 (Figura 42)

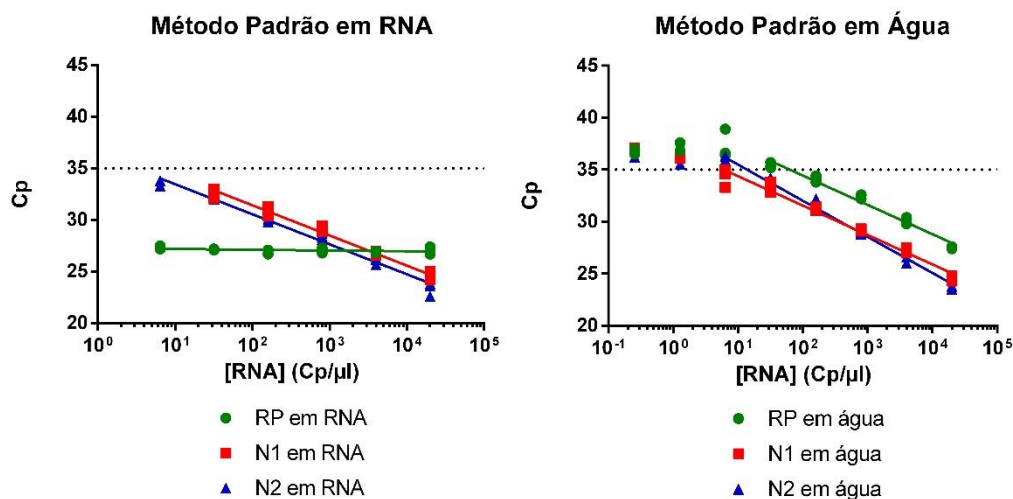


Figura 42 – Representação Gráfica da avaliação do Método Padrão em RNA vs Método padrão em água através de diluições sucessivas.

A eficácia para cada alvo, nos dois ensaios foi determinado usando a seguinte fórmula<sup>63; 67</sup>:

$$Eficiência = -1 + 10^{(-1/Declive)}$$

Depois de realizados os cálculos das eficiências para cada alvo, consegue-se observar valores superiores a 100% na maioria dos casos. Para ser considerado eficiência perfeita seria um valor de 100%, valores acima indicam que em algum momento os valores deixaram de ser lineares, ou quando existe presença de inibidores na reação e, valores abaixo, podem indicar falhas no emparelhamento ou excesso e exaustão de reagentes na reação.<sup>63</sup> Os valores das eficiências obtidas estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Compilação das eficiências e mínimos de detecção para os dois métodos

	Método Padrão em RNA			Método Padrão em água		
	RP	N1	N2	RP	N1	N2
Eficiência	-	120%±4%	121%±5%	126%±5%	126%±5%	94%±3%
Mínimo de Detecção Cp<35	-	Fator de diluição 3125 ≈ 32 Cp/μL	Fator de diluição 15625 ≈ 6,4 Cp/μL	Fator de diluição 3125	Fator de diluição 15625 ≈ 6,4 Cp/μL	Fator de diluição 15625 ≈ 6,4 Cp/μL

Legenda: Diluição feitas a partir de RNA extraído de amostras de exsudado de humanos. N° de cópias desconhecido.

#### 3.1.4. CERTIFICAÇÃO

Para que o laboratório obtivesse certificação pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), foi recebido um painel de 15 amostras desconhecidas. Este painel de amostras tinha como intuito validar que o resultado emitido pelo IPS COVID Lab seria igual ao do laboratório de referência. O resultado dessas amostras foi esquematizado na Tabela 11, em que das quais 7 foi possível detetar a presença do vírus SARS-CoV-2 em as restantes 8 não. Numa amostra positiva para SARS-CoV-2, não foi detetado o controlo de qualidade RP. Neste sentido, a interpretação da análise da amostra, seria inconclusivo, embora positivo para a presença do material genético viral.

Com estes resultados conseguiu-se obter a certificação do laboratório com sucesso.

Tabela 11 – Resultado das amostras enviadas para certificação do laboratório

Amostra	RP (cp)	N1 (cp)	N2 (cp)	Resultado
1	26,32	27,79	29,50	<b>Detetável</b>
2	34,22	26,13	29,78	<b>Detetável</b>
3	31,84	-	-	<b>Não Detetável</b>
4	29,77	-	-	<b>Não Detetável</b>
5	27,29	-	-	<b>Não Detetável</b>
6	28,74	-	-	<b>Não Detetável</b>
7	26,54	30,50	24,55	<b>Detetável</b>
8	25,09	21,94	20,27	<b>Detetável</b>
9	27,42	-	-	<b>Não Detetável</b>
10	27,15	33,05	26,92	<b>Detetável</b>
11	-	15,63	21,67	<b>Detetável</b>
12	-	19,24	20,40	<b>Detetável</b>
13	<b>32,63</b>	>35 (35,47)	-	<b>Não Detetável</b>
14	30,25	-	-	<b>Não Detetável</b>
15	31,99	>35 (36,81)	-	<b>Não Detetável</b>
C+ (1 a 10)	25,75	25,48	28,67	<b>Válido</b>
C- (1 a 10)	-	-	-	<b>Válido</b>
C+ (11 a 15)	26,65	27,40	26,43	<b>Válido</b>
C- (11 a 15)	-	-	-	<b>Válido</b>

Legenda: c+ controlo positivo, c- controlo negativo, - sem amplificação/Cp não determinado

### 3.2. AVALIAÇÃO PROTOCOLO MULTIPLEX PARA ALVOS GENÓMICOS RP, N1 E N2

Como no IPS COVID LAB foi estabelecido a utilização dos alvos genómicos RP, N1 e N2, resolveu-se avaliar a possibilidade da criação de um protocolo *multiplex* com estes alvos, usando o mesmo reagente da RT-PCR nomeadamente *One-step RT-qPCR Master Mix (2x)* da NZYTech.

Para isso foram adquiridos *primers* idênticos com a mesma sequência, mas com os fluoróforos *FAM* (para o alvo N1), *HEX* (para o alvo RP) e *ROX* (para o alvo N2). Definindo as sondas, foi elaborado um conjunto de soluções com alvos genómicos diferentes, para avaliar o comportamento dos mesmos sozinhos e em conjuntos de 2 alvos e 3 alvos. A solução triplex que contem os três alvos genéticos, três soluções duplex (N1+N2, RP+N1 e RP+N2) e três soluções simplex de cada um dos alvos genéticos.

#### 3.2.1. COMPARAÇÃO DOS LIMITES DE DETEÇÃO E EFICIÊNCIA

Inicialmente foi feita a comparação destes conjuntos primers e sondas, com os do método padrão. Para tal foi efetuado um conjunto de reações em condições idênticas às anteriores, para se determinar a eficiência e limite de deteção. Os resultados obtidos apresentados na Figura 43, estando a preto os resultados obtidos previamente com o método padrão e a cor os obtidos com as novas sondas. Como se pode observar na Figura 43, os 3 alvos apresentam resultados similares em comparação um com o outro, demonstrando que os fluoróforos diferentes não influenciam a capacidade de deteção. Este fato também é reforçado pelo resultado das eficiências para os alvos, que rondam os 100% (Tabela 12)

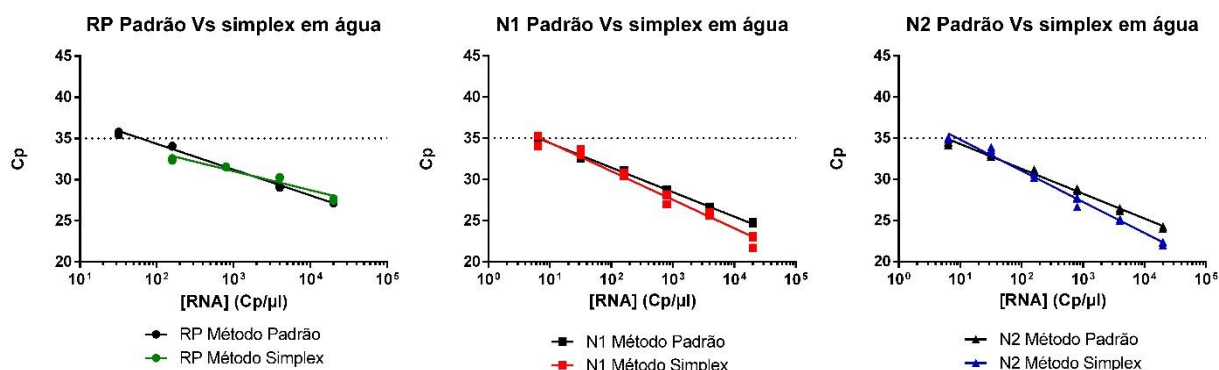


Figura 43 - Representação Gráfica da avaliação do Método Padrão em água vs Método simplex em água através de diluições sucessivas, para cada alvo genómico RP, N1 e N2.

Também é de referir, a única exceção é com o alvo RP para o qual não se conseguiu detetar além de um fator de diluição de 625 pois trata-se de uma amostra típica preparada a partir de um exsudado naso-orofaríngeo, da qual não sabemos o número de cópias presentes em cada amostra. O valor de eficiência determinado é de 173%, e desprezando o valor de maior fator de diluição de 3125. Estes resultados estão representados na Tabela 12.

Tabela 12 – Avaliação das Eficiências por cada alvo em água (sondas padrão vs sondas simplex)

Conc. [RNA] (Cp/μL)	RP		N1		N2	
	Padrão	Simplex	Padrão	Simplex	Padrão	Simplex
Eficiência	109%±2%	172%±14%	117%±3%	95%±4%	114%±3%	84%±2%
Mínimo de Deteção Cp<35	Fator de diluição 3125	Fator de diluição 625	Fator de diluição 15625 ≈ 6,4 Cp/μL	Fator de diluição 15625 ≈ 6,4 Cp/μL	Fator de diluição 15625 ≈ 6,4 Cp/μL	Fator de diluição 15625 ≈ 6,4 Cp/μL

Legenda: Alvo RP – utilização de RNA extraído de amostras de exsudado de humanos. Nº de cópias desconhecido.

### 3.2.2. AVALIAÇÃO DO LIMITE DE DETEÇÃO DE REAÇÕES EM MULTIPLEX

De seguida, foram efetuadas reações multiplex com diversas combinações dos três alvos – triplex e duplex RP+N1, RP+N2 e N1+N2. Observou-se não existir a mesma relação de linearidade entre o Cp e o logaritmo da concentração, o que está de acordo com a literatura e aponta para que existam efeitos de competição que levam a que as eficiências sejam muito diferentes do ideal.

Avaliando os resultados das soluções de diluições sucessivas onde temos mais que um alvo (em triplicado ou em duos), consegue-se observar na Tabela 13, em todos os ensaios consegue-se obter resultados de 100% até a conc. RNA de 160 Cp/μL, a exceção do alvo RP nas diluições em água (um resultado que já era esperado).

Observando os valores para a conc. RNA de 32 Cp/μL, tanto para as diluições em RNA como em água, que se deixa de ter resultados com o método triplicado mais expressivos do que com qualquer dos duos. Já se observássemos a conc. RNA de 6,4 Cp/μL percebe-se que o único duo capaz de ainda apresentar resultados é o conjunto N1+N2. Os efeitos da composição afetam a capacidade de deteção dos alvos menos abundantes. Ou seja, em condições em que o RNA viral é mais abundante que o RNA humano, a determinação simultânea do RP é afetada podendo invalidar o resultado. Pelo contrário, quando o RNA viral é muito baixo, a amplificação simultânea do alvo RP afetou a deteção do vírus, podendo gerar falsos negativos, o que poderia ter implicações perigosas para a sociedade.

Com estes resultados, para reproduzir um método multiplex para o laboratório, sugere-se a utilização do duo N1+N2 e o alvo RP ser realizado a parte.

Tabela 13 – Avaliação dos ensaios multiplex (triplicados ou em duos) em diluições de RNA e água

Conc. [RNA] (Cp/μL)	Ensaio diluições em RNA				Ensaio diluições em água			
	RP+N1+N2	N1+N2	RP+N1	RP+N2	RP+N1+N2	N1+N2	RP+N1	RP+N2
20 000	●	●	●	●	●	●	●	●
4 000	●	●	●	●	●	●	●	●
800	●	●	●	●	◐ ◑ ◒	●	◐ ◑	◐ ◒
160	●	●	●	●	◐ ◑ ◒	●	◐ ◑	◐ ◒
32	◐ ◑ ◒	◑ ◒	◐ ◑	◐ ◒	◐ ◑ ◒	●	◐ ◑	◐ ◒
6,4	◐ ◑ ◒	◑ ◒	◐ ◑	◐ ◒	◐ ◑ ◒	◐	○	◐ ◒

Legenda de cores: Preto todos os alvos presentes no ensaio, verde alvo RP, Vermelho alvo N1, Azul Alvo N2. ● 100%; ◐ 75%; ◑ 50%; ◒ 25%; ○ 0%

### 3.2.3. REPRODUTIBILIDADE EM REAÇÕES EM MULTIPLEX

Para comprovar a viabilidade dos métodos multiplex para o diagnóstico do SARS-CoV-2, analisaram-se amostras reais recolhidas e analisadas pelo método padrão no laboratório. As amostras foram agrupadas de acordo com os resultados de Cp pelas gamas 15-20; 20-25; 25-30; 30-35. São apresentados na Tabela 14 os resultados obtidos com o método triplex e o método duplex do duo N1+N2, que de acordo com os resultados anteriores apresentava o menor limite de deteção.

Observando o conjunto de amostras de 15-20 Cp, ambos os métodos foram capazes de amplificar todas as amostras, a exceção do alvo RP no método triplex. A partir destes resultados consegue-se concluir que quando a quantidade do vírus presente na amostra é elevada (reduzido valor de Cp), a reação para o alvo RP tende a ser inibida, já que para as mesmas amostras no método padrão o alvo RP amplificou com valores normais.

No conjunto de amostras de 20-25 Cp, ambos os métodos foram capazes de amplificar todas as amostras, exceto uma amostras onde novamente não houve amplificação o alvo RP. Aqui como a quantidade de RNA viral presente da amostra diminuiu (aumento do valor de Cp), já foi possível obter resultados nos três alvos genómicos.

Já no conjunto de amostras de 25-30 Cp, observa-se algumas diferenças em relação aos anteriores. Aqui pelo método triplex já se começa a verificar que 3 das 10 amostras analisadas não amplificaram, enquanto que, com o método duplex amplificaram todas, o que comprova

que quando estão os três alvos juntos, que existe alguma competição por recursos e que as reações deixam de ocorrer com a mesma frequência.

Por fim, no conjunto de amostras de 30-35 Cp, pelo método triplex não foi amplificada nenhuma amostra, e pelo método duplex, aproximadamente, metade amplificou sendo possível detetar a presença do vírus. Neste conjunto já se chegou a uma etapa onde a quantidade presente de RNA nas amostras é reduzida e estamos num ponto próximo do limite de deteção que é o Cp de 35, e como a quantidade de RNase P é maior, sobrepõem sobre a quantidade mínima de RNA viral presente e não ocorre a amplificação no método triplex. O método duplex por outro lado, consegue ser mais eficiente nesse aspeto por não sofrer a influência de magnitudes muito distintas dos alvos.

Tabela 14 – Quantificação de resultados de amostras reanalisadas pelo método multiplex.

Parâmetros (valores de cp)	Nº de Amostras	Amostras quantificadas		Amostras não quantificadas	
		Método triplex	Método duplex	Método triplex	Método duplex
15 - 20	11	11 <i>Nota:</i> 7 destas não amplificaram RP	11	0	0
20 - 25	8	8 <i>Nota:</i> 1 destas não amplificou RP	8	0	0
25 - 30	13	10 <i>Nota:</i> 1 destas só amplificou RP e N1	13 <i>Nota:</i> 1 destas só amplificou N1	3	0
30 - 35	11	0	5 <i>Nota:</i> 3 destas só amplificou N1	11	6

Estes resultados estão em concordância com os limites de deteção determinados para o método padrão e o duplex, uma vez que com o último limite de deteção era 5 vezes maior.

O método duplex pode ser suficientemente fiável para o diagnóstico em situações de sintomatologia evidente (nas quais os níveis de SARS-CoV-2) são muito elevados. Em ações de rastreio, pode não ter capacidade de detetar níveis muito baixos de infeção.

## 4. CONCLUSÃO

Este trabalho permitiu implementar a atividade do Laboratório IPS COVID Lab enquanto Laboratório para o Diagnóstico Laboratorial da COVID-19, integrando a Rede de Laboratórios Científicos para Situações de Emergência e Riscos de Saúde Pública, e contribuiu ainda com o estudo e desenvolvimento de alternativas metodológicas passíveis de aumentar a capacidade de resposta do laboratório.

Para a implementação do Laboratório, este trabalho contribuiu com a elaboração do Procedimento Operacional Padrão e Avaliação de Risco para a sala de PCR (SOP PCR), que serviu para a sistematização e reprodutibilidade das análises efetuadas, tendo sido utilizado por todos os operadores que trabalharam no Laboratório, bem como para a formação em contexto de trabalho (estágio curricular) de 12 estudantes de diversos ciclos de estudo (CTeSP - Tecnologias de Laboratório Químico e Biológico; Licenciaturas – Bioinformática, Biotecnologia, Tecnologia Biomédica) que estiveram no Laboratório entre fevereiro de 2021 a outubro de 2022. A adaptação da metodologia padrão usada no Instituto de Medicina Molecular (IMM) às condições laboratoriais do IPS COVID Lab foi efetuada, identificando-se e ultrapassando obstáculos, como a redução das reações inespecíficas no alvo N2, a redução de amplificação dos controlos negativos do alvo RP causada por eventuais contaminações dos operadores, que foi solucionado com utilização de luvas de manga comprida e serem tapados os poços respetivos antes de serem transportados para a câmara de amostras. Efetuou-se ainda o estudo da sensibilidade do método, comprovando que se conseguem detetar amostras que contenham concentração do RNA do vírus, no mínimo 6,4 Cp/μL (valores bastante pequenos). Todos estes passos conduziram à certificação do laboratório pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, (INSA) que permitiu o registo na Entidade Reguladora de Saúde, na plataforma SINAVE Lab em 2022, na Administração Regional de Saúde.

Em relação às alternativas metodológicas, foram avaliados vários procedimentos *in-house* de RT-qPCR em *multiplex*, em *duplex* e *triplex*, conseguindo-se identificar um método que analisa em simultâneo o duo de sondas virais N1+N2 com uma sensibilidade equivalente ao método padrão, ou seja com um limite mínimo de deteção idêntico. Assim, com esta opção, seria possível analisar uma amostra utilizando apenas dois poços da placa de PCR em vez dos atuais três do método padrão, o que permitiria aumentar a capacidade de resposta do laboratório. Este método não chegou a ser utilizado, pela adoção dos Testes Rápidos de Antígeno como método de rastreio preferencial e, já em 2022, como método de diagnóstico, sem necessidade de confirmação por RT-qPCR.

Concluindo, é de referir que a implementação do IPS COVID Lab, foi muito importante para toda a comunidade IPS para o controlo da pandemia dentro do espaço escolar. A maioria dos casos positivos foram detetados numa fase inicial da doença o que permitiu que as cadeias de contágio fossem controladas, evitando assim potenciais surtos dentro das escolas.

A receção de estagiários no laboratório é uma dinâmica que tem contribuído para que estes futuros profissionais possam desenvolver, dinamizar, praticar e sedimentar não só aprendizagens adquiridas em âmbito académico como também novas competências com esta experiência. Não só as competências técnicas são evidenciadas e desenvolvidas, mas também as competências interpessoais são relevadas através do contacto com a comunidade. Também como elemento responsável pela receção destes estagiários, permitiu desenvolver novas capacidades tais como a liderança, comunicação, partilha de conhecimento e organização e gestão de pessoas.

## 4. CONCLUSIONS

This work allowed the implementation of the activity of the IPS COVID Lab as Laboratory for the Diagnosis of COVID-19, integrating the Network of Scientific Laboratories for Emergency Situations and Public Health Risks, and also contributed with the study and development of methodological alternatives to increase the response capacity of the laboratory.

For the implementation of the Laboratory, this work contributed with the elaboration of the Standard Operating Procedure and Risk Assessment for the PCR room (SOP PCR), which served for the systematization and reproducibility of the analyses performed. This document was used by all operators who worked in the Laboratory, as well as for the on-the-job training (curricular internship) of 11 students from different study cycles (CTeSP - Chemical and Biological Laboratory Technologies; bachelor's degree - Bioinformatics, Biotechnology, Biomedical Technology) who were in the Laboratory between February 2021 and October 2022. The adaptation of the standard methodology used at the Instituto de Medicina Molecular (IMM) to the laboratory conditions of the IPS COVID Lab was carried out, identifying and overcoming obstacles such as the reduction of nonspecific reactions in the N2 target, the reduction of amplification of the negative controls of the RP target caused by possible contamination of the operators, which was solved by using long sleeve gloves and covering the respective wells before being transported to the sample chamber. The sensitivity of the method was also studied, proving that it can detect samples containing a virus RNA concentration of at least 6.4 Cp/ $\mu$ L (very small values). All these steps led to the certification of the laboratory by the Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, (INSA) which allowed the registration with the Health Regulatory Authority, the SINAVE Lab platform and in 2022, the Regional Health Administration.

Regarding the methodological alternatives, several in-house multiplex (duplex and triplex) RT-qPCR procedures were evaluated, and a method that simultaneously analyzes the N1+N2 viral probe duo with a sensitivity equivalent to the standard method, *i.e.*, with an identical minimum detection limit, was identified. Thus, with this option, it would be possible to analyze a sample using only two wells of the PCR plate instead of the current three in the standard method, which would increase the response capacity of the laboratory. This method has not been used, due to the adoption of Rapid Antigen Tests as the preferred screening method and, by 2022, as a diagnostic method, without the need for confirmation by RT-qPCR.

In conclusion, it should be noted that the implementation of the IPS COVID Lab was very important for the entire IPS community for the control of the pandemic within the Institution. Most positive cases were detected at an early stage of the disease, which allowed the chains of contagion to be controlled, thus avoiding potential outbreaks within the *campi*.

The reception of trainees in the laboratory is a dynamic that has contributed to these future professionals being able to develop, dynamize, practice, and sediment not only learning acquired in the academic field but also new skills with this experience. Not only the hard skills

are evident but also the soft skills are enhanced by the contact with the community. Also, in being a person responsible for receiving these trainees, allowed developing new skills such as leadership, communication, knowledge sharing and organization and people management.

## 5. BIBLIOGRAFIA

1. GORBALENYA, Alexander E. *et al.* - The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**. ISSN 2058-5276. 5:4 (2020) 536–544. doi: 10.1038/s41564-020-0695-z.
2. TROPICAL, Instituto De Higiene E Medicina - **Dossier: Origem e dispersão pandémica do coronavírus SARS-CoV-2, causador da COVID-19** [Consult. 23 dez. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://www.ihmt.unl.pt/origem-e-dispersao-pandemica-do-coronavirus-sars-cov-2-causador-da-covid-19/>.
3. REFERENCE, COVID - **The COVID Textbook** [Consult. 23 dez. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://covidreference.com/virology\_pt>.
4. IMMUNOBITES - **The 2019 Novel Coronavirus: An Emerging Outbreak** [Consult. 23 dez. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://immunobites.com/2020/02/07/the-2019-novel-coronavirus-an-emerging-outbreak/>.
5. ZHU, Na *et al.* - A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**. ISSN 0028-4793. 382:8 (2020) 727–733. doi: 10.1056/NEJMoa2001017.
6. SNS24 - **COVID 19** [Consult. 10 ago. 2021]. Disponível em WWW:<URL:https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-infecciosas/covid-19/#sec-0>.
7. DIREÇÃO GERAL DE SAÚDE - **Coronavirus** [Consult. 26 dez. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://www.dgs.pt/paginas-de-sistema/saude-de-a-a-z/coronavirus.aspx,>.
8. WHO - **Painel do OMS Coronavírus (COVID-19)**, atual. 2021. [Consult. 26 dez. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://covid19.who.int/>.
9. WANG, Huihui *et al.* - The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. ISSN 0934-9723. 39:9 (2020) 1629–1635. doi: 10.1007/s10096-020-03899-4.
10. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - **Public Health Image Library (PHIL)** [Consult. 27 dez. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=15523>.
11. JIN, Yuefei *et al.* - Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. **Viruses**. ISSN 1999-4915. 12:4 (2020) 372. doi: 10.3390/v12040372.
12. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - **Human Coronavirus Types** [Consult. 27 dez. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://www.cdc.gov/coronavirus/types.html>.

13. SUPPORT, Brain - **Mecanismos de Neuroinvasão de SARS-CoV-2** [Consult. 27 dez. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://www.brainlatam.com/blog/mecanismos-de-neuroinvasao-de-sars-cov-2-1699>.
14. EURONEWS - **Veja quais são as variantes de preocupação segundo a OMS** [Consult. 10 ago. 2021]. Disponível em WWW:<URL:https://pt.euronews.com/2021/09/03/quais-sao-as-variantes-de-covid-19-que-mais-preocupam#>.
15. CONTROL, European Centre For Disease Prevention And - **SARS-CoV-2 variants of concern as of 14 October 2021** Disponível em WWW:<URL:https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern>.
16. RTP - **Dinamarca abate 15 milhões de martas devido a SARS-CoV-2 mais resistente** [Consult. 10 ago. 2021]. Disponível em WWW:<URL:https://www.rtp.pt/noticias/mundo/dinamarca-abate-15-milhoes-de-martas-devido-a-sars-cov-2-mais-resistente\_n1272753>.
17. COSTA, Inês Pinto Da - **Milhares de martas infectadas com covid-19 estão a ser abatidas em Espanha e nos Países Baixos** [Consult. 10 ago. 2021]. Disponível em WWW:<URL:https://www.publico.pt/2020/07/17/p3/noticia/milhares-martas-infectadas-covid19-estao-abatidas-espanha-paises-baixos-1924840>.
18. LUSA - **Covid-19: Dinamarca vai abater milhões de visons após mutação do coronavírus** [Consult. 10 ago. 2021]. Disponível em WWW:<URL:https://www.publico.pt/2020/11/04/p3/noticia/covid19-dinamarca-vai-abater-milhoes-martas-apos-mutacao-coronavirus-1937941>.
19. MUNDO, BBC News - **O sacrifício de quase 100 mil visons infectados por coronavírus na Espanha** [Consult. 10 ago. 2021]. Disponível em WWW:<URL:https://www.bbc.com/portuguese/internacional-53458454>.
20. EUROPA, Bom Dia - **Holanda abate milhares de martas com covid-19** [Consult. 10 ago. 2021]. Disponível em WWW:<URL:https://bomdia.eu/holanda-abate-milhares-de-martas-com-covid-19/>.
21. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - **Public Health Image Library (PHIL)** [Consult. 27 dez. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=23313>.
22. BIORENDER - **Imagens** [Consult. 29 dez. 2021]. Disponível em WWW:<URL:https://app.biorender.com/>.
23. NAKAGAWA, So; MIYAZAWA, Takayuki - Genome evolution of SARS-CoV-2 and its virological characteristics. **Inflammation and Regeneration**. ISSN 1880-8190. 40:1 (2020) 17. doi: 10.1186/s41232-020-00126-7.
24. ALANAGREH, Lo'Ai; ALZOUGHLOO, Foad; ATOUM, Manar - The Human Coronavirus Disease COVID-19: Its Origin, Characteristics, and Insights into Potential Drugs and Its Mechanisms. **Pathogens**. ISSN 2076-0817. 9:5 (2020) 331. doi: 10.3390/pathogens9050331.
25. ROMANO, Maria *et al.* - A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping. **Cells**. ISSN 2073-4409. 9:5 (2020) 1267. doi: 10.3390/cells9051267.

26. GORDON, David E. *et al.* - A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. **Nature**. ISSN 0028-0836. 583:7816 (2020) 459–468. doi: 10.1038/s41586-020-2286-9.
27. MICHEL, Christian Jean *et al.* - Characterization of accessory genes in coronavirus genomes. **Virology Journal**. ISSN 1743-422X. 17:1 (2020) 131. doi: 10.1186/s12985-020-01402-1.
28. KIM, Dongwan *et al.* - The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. **Cell**. ISSN 00928674. 181:4 (2020) 914-921.e10. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.011.
29. BAI, Chongzhi; ZHONG, Qiming; GAO, George Fu - Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. **Science China Life Sciences**. ISSN 1674-7305. 65:2 (2022) 280–294. doi: 10.1007/s11427-021-1964-4.
30. NEXTSTRAIN - **Covid-19** [Consult. 28 dez. 2021]. Disponível em WWW:<URL:https://nextstrain.org/groups/neherlab/ncov/20A.EU1>.
31. JORGE, Instituto Doutor Ricardo - Diversidade genética do novo coronavírus SARS-CoV-2 ( COVID-19 ) em Portugal Diversidade genética do novo coronavírus SARS-CoV-2. 2:2021) 4–7. doi: 10.1093/cid/ciaa1275/5897019.
32. NEXTSTRAIN - **Nextstrain - COVID- em portugal** Disponível em WWW:<URL:Nextstrain / grupos / neherlab / ncov / portugal>.
33. **SARS-CoV-2 phylogeny** - [Consult. 10 ago. 2021]. Disponível em WWW:<URL:https://nextstrain.org/groups/neherlab/ncov/portugal?c=clade\_membership&p=grid&r=division>.
34. MICROREACT - **Diversidade genética do novo coronavirus** [Consult. 28 dez. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://microreact.org/project/9QQJgXVZ4qcBUFwpstKB8j/954d4279>.
35. MICROREACT - **Sars-CoV-2** Disponível em WWW:<URL:https://beta.microreact.org/project/rPYVxZ8ZGitrhA3M3gdgYp-global-sars-cov-2-2019-12-242021-07-25?dfc=lineage&dfo>equals&dfv=B.1.1.7&cbc=lineage>.
36. **SARS-CoV-2 variants of concern as of 15 July 2022** - Disponível em WWW:<URL:https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern>.
37. BETHÂNIA NUNES (METROPOLES) - **Ômicron provoca sintomas “muito suaves” em vacinados, diz cientista** Disponível em WWW:<URL:https://www.metropoles.com/saude/omicron-provoca-sintomas-muito-suaves-em-vacinados-diz-cientista>.
38. SINGH, Jalen *et al.* - Evolutionary trajectory of SARS-CoV-2 and emerging variants. **Virology Journal**. ISSN 1743-422X. 18:1 (2021) 166. doi: 10.1186/s12985-021-01633-w.
39. DGS - **Direção Geral de Saúde** [Consult. 28 dez. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://covid19.min-saude.pt/>.

40. RTP - **Coronavírus. O que é e como começou?** [Consult. 28 dez. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://www.rtp.pt/noticias/mundo/coronavirus-o-que-e-e-como-comecou\_i1203294>.
41. CUF - **Coronavírus: tempo em superfícies e objetos** [Consult. 28 dez. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://www.cuf.pt/mais-saude/por-quanto-tempo-permanece-o-coronavirus-em-superficies-e-objetos>.
42. SNS24 - **Quais as medidas que se mantêm obrigatórias?** [Consult. 14 out. 2022]. Disponível em WWW:<URL:https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-infecciosas/covid-19/medidas-de-saude-publica-covid-19/#sec-0>.
43. DGS - **Imagens** [Consult. 28 dez. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://covid19.min-saude.pt/imagens/>.
44. SNS, DGS, INFARMED, INSA - Circular Informativa Conjunta SNS, DGS, Infarmed, INSA - N003/CD/100.20.200. **República Portuguesa**. 2020) 1–10.
45. IYER, Mahalaxmi *et al.* - COVID-19: an update on diagnostic and therapeutic approaches. **BMB Reports**. ISSN 1976-670X. 53:4 (2020) 191–205. doi: 10.5483/BMBRep.2020.53.4.080.
46. PÚBLICO - **Testes Moleculares** [Consult. 29 dez. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://www.publico.pt/2020/05/11/infografia/variados-testes-coronavirus-505>.
47. DIREÇÃO GERAL DE SAÚDE - Norma 019/2020 - Estratégia Nacional de Testes para SARS-CoV-2. **Serviço Nacional de Saúde**. September 2020 (2021) 1-15. (Consultado em 2021 março 16). Disponível em.
48. NATIONAL CENTRE FOR INFECTIOUS DISEASES SINGAPORE - Period of Infectivity to Inform Strategies for De-isolation for COVID-19 Patients. **National Centre for Infectious Diseases and the Chapter of Infectious Disease Physicians**. May 23 (2020) 1–5.
49. TOM JEFFERSON, CARL HENEGHAN, ELIZABETH SPENCER, Jon Brassey - **Are you infectious if you have a positive PCR test result for COVID-19?** [Consult. 10 ago. 2021]. Disponível em WWW:<URL:https://www.cebm.net/covid-19/infectious-positive-pcr-test-result-covid-19/>.
50. ACADEMY, Khan - **Polymerase chain reaction (PCR)** [Consult. 29 dez. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr>.
51. KREBS, Jocelyn E.; KILPATRICK, Stephen T.; GOLDSTEIN, Elliott S. - **Lewin'S Genes Xi**. ISBN 978-1-4496-5985-1.
52. ADAMS, Grace - A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. **The Biochemist**. ISSN 0954-982X. 42:3 (2020) 48–53. doi: 10.1042/BIO20200034.
53. BUSTIN, Stephen A. *et al.* - The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**. ISSN 0009-9147. 55:4 (2009) 611–622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.

54. WILLIAMS, P. Micley; TUCKER, Ayla L. - Real-time quantitative PCR. Em **PCR Applications** [Em linha]. [S.l.] : Elsevier, 1999 Disponível em WWW:<URL:https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123721853500249>.v. 33. p. 365–375.
55. PFAFFL, Michael W. - **A-Z of quantitative PCR**
56. OLIVEIRA, Tânia Maria Dos Santos - **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. [S.l.] : Universidade de Aveiro, 2010 Disponível em WWW:<URL:http://hdl.handle.net/10773/7230>.
57. FLEURY - **PCR quantitativo em tempo real (real-time PCR)** [Consult. 30 dez. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://www.fleury.com.br/medico/manuais-diagnosticos/hematologia-manual/pcr>.
58. SAMBROOK, J. F.; RUSSELL, D. W.; ED. - **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring ed. ISBN 978-0-87969-577-4.
59. LARIONOV, Alexey; KRAUSE, Andreas; MILLER, William - A standard curve based method for relative real time PCR data processing. **BMC Bioinformatics**. ISSN 1471-2105. 6:1 (2005) 62. doi: 10.1186/1471-2105-6-62.
60. LIFE TECHNOLOGIES - Real-time PCR handbook. 2012) 70.
61. HIROTSU, Yosuke; MOCHIZUKI, Hitoshi; OMATA, Masao - Double-quencher probes improve detection sensitivity toward Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in a reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. **Journal of Virological Methods**. ISSN 01660934. 284:2020) 113926. doi: 10.1016/j.jviromet.2020.113926.
62. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - **Research Use Only 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time RT-PCR Primers and Probes** [Consult. 30 dez. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>.
63. MORGANTE, C. V.; BLAWID, R. - **Análise da expressão gênica pela técnica de PCR quantitativa em tempo real: princípios e fundamentos**. Petrolina: ed. CAROLINA VIANNA MORGANTE, CPATSA; ROSANA BLAWID, Universidade de Brasília, Brasília, DF. : Embrapa, 2016
64. SERRADO, Álvaro Roberto Gonçalves - **As Técnicas de Genética Molecular na Investigação e Diagnóstico em Bioquímica Clínica**. [S.l.] : Universidade Fernando Pessoa, 2017
65. SCHWIESOW, Leah - **RNA Extraction Without A Kit** [Consult. 29 dez. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://blog.addgene.org/rna-extraction-without-a-kit>.
66. PRUDÊNCIO, MIGUEL; LUÍS, Vanessa; Costa Judite - iMM Covid19 Diagnostic - Standard Operating Procedure and Risk Assessment. [s.d.].
67. VOGELS, Chantal B. F. *et al.* - Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. **Nature Microbiology**. ISSN 2058-5276. 5:10 (2020) 1299–1305. doi: 10.1038/s41564-020-0761-6.

68. PARK, Myungsun *et al.* - Optimization of primer sets and detection protocols for SARS-CoV-2 of coronavirus disease 2019 (COVID-19) using PCR and real-time PCR. **Experimental & Molecular Medicine**. ISSN 1226-3613. 52:6 (2020) 963–977. doi: 10.1038/s12276-020-0452-7.
69. MANIATTIS, T., FRITSCH, F. E SAMBROOK, J. - **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**.

# IPS COVID LAB

## Procedimento Operacional Padrão e Avaliação de Risco

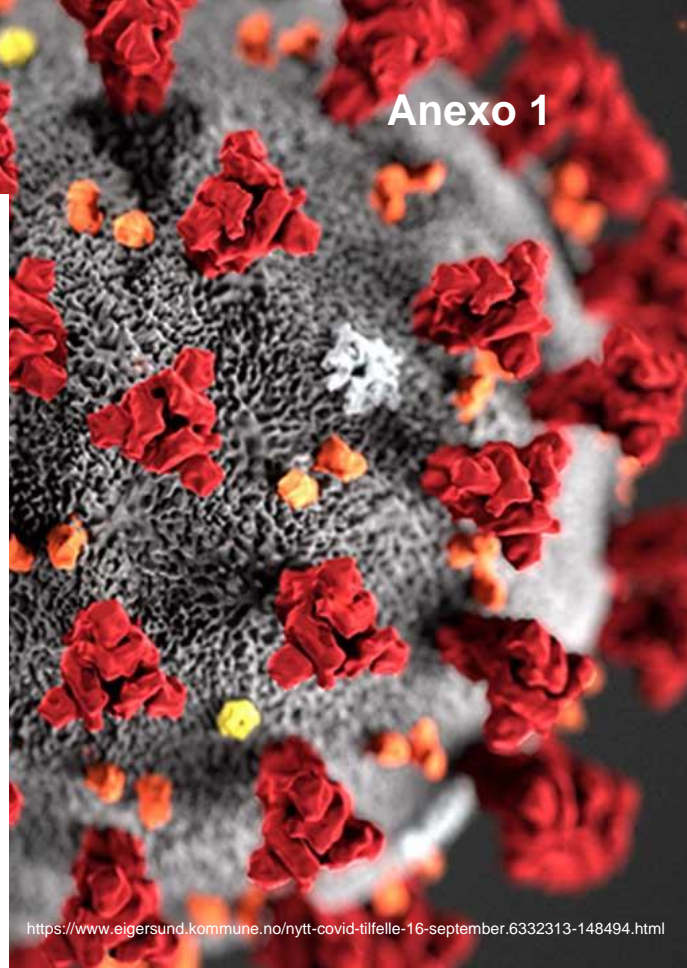
Preparação de amostras para análise  
por PCR em tempo real

---

**4 NOVEMBRO 2020**

---

Realizado por Fernanda Miguel  
Baseado no Standard Operating Procedure and  
Risk Assessment do IMM Covid 19 Diagnostic



<https://www.eigersund.kommune.no/nytt-covid-tilfelle-16-september.6332313-148494.html>



IPS Instituto  
Politécnico de Setúbal  
Escola Superior de  
Tecnologia do Barreiro

# Índice

1.	Descrição geral .....	1
2.	Abreviaturas e notas importantes .....	2
3.	Fluxo de trabalho .....	4
3.1.	Sala de RT-qPCR .....	6
3.1.1.	Uso de Equipamento de proteção Individual .....	8
4.	Medidas de avaliação e controle de riscos .....	9
4.1.	Informação Transversal .....	10
4.2.	Riscos Associados .....	11
4.3.	Notas Importantes .....	12
5.	Equipamentos, Reagentes e Consumíveis .....	14
6.	Condições reacionais .....	19
6.1.	<i>Primers</i> e Sondas .....	20
7.	Preparação de Soluções e organização de trabalho.....	21
7.1.	Preparação das soluções de <i>primers</i> e sondas .....	21
7.2.	Preparação de soluções de DNA de Salmão .....	22
7.3.	Preparação alíquotas de controlos positivos .....	22
7.4.	Organização de reagentes e soluções no congelador da sala de PCR .....	23
7.5.	Organização da Master Mix de reação e configuração da placa .....	25
8.	Procedimento experimental .....	27
8.1.	Desinfecção do local de trabalho .....	30
8.2.	Programação do aparelho RealLine .....	31
8.2.1.	Limpeza do Equipamento .....	38
8.2.2.	Criação de novo Operador.....	38
8.2.3.	Conectar equipamento a um novo computador.....	38
8.2.4.	Calibração do equipamento .....	39
8.2.5.	Criação de Testes.....	41
8.2.6.	Criação de programa de amplificação .....	42
8.2.7.	Deteção Multiplex.....	44
8.2.8.	Opções para tratamento de resultados .....	45
9.	Anexos .....	47
9.1.	Anexo 1 – Informações dos Operadores e Supervisores .....	47
9.2.	Anexo 2 – Informações das checklists – Operador/Supervisor .....	48

<b>9.3.</b>	<b>Anexo 3 – Checklists sala de RT-qPCR – Câmara de Mistura.....</b>	<b>49</b>
<b>9.4.</b>	<b>Anexo 4 – Checklists sala de RT-qPCR – Câmara de Amostra.....</b>	<b>50</b>
<b>9.5.</b>	<b>Anexo 5 – Tabela para preparação das mixes consoante nº de amostras.....</b>	<b>51</b>
<b>10.</b>	<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>52</b>

# 1. Descrição geral

Este documento foi redigido tendo como base o “Standard Operating Procedure and Risk Assessment” [1] do IMM Covid 19 Diagnostic.

Foi realizado com base no conhecimento sobre a doença COVID 19, nomeadamente nos testes por RT-qPCR que são usados para a deteção da mesma, para implementar um centro de diagnósticos nos laboratórios da Escola Superior de Tecnologia do Barreiro do Instituto Politécnico de Setúbal (ESTBarreiro/IPS), o qual foi denominado IPS COVID LAB.

Neste documento encontram-se esquematizados os fluxos de trabalho dentro do laboratório, descritos como todos os operadores devem estar equipados e os protocolos de higiene e segurança que devem cumprir, bem como todo o procedimento e reagentes necessários para a realização dos testes por RT-qPCR nas amostras nasofaríngeas e orofaríngeas. É o manual do laboratório que descreve também como manusear o equipamento de PCR em tempo real, os procedimentos para desinfetar o local de trabalho, as medidas de segurança e os riscos associados ao manuseamento de reagentes e amostras. Em anexo encontram-se a documentação das “checklists” de trabalho corrente, que devem ser utilizadas para assegurar as boas práticas.

## 2. Abreviaturas e notas importantes

**Câmara de Amostra** – Câmara de PCR ou câmara de UV para manuseio limpo de ácidos nucleicos, destinada ao manuseamento de amostras e controlos positivos

**Câmara de Mistura** – Câmara de PCR ou câmara de UV para manuseio limpo de ácidos nucleicos, destinada a realização das misturas reacionais, comumente designadas por MIXes, onde não há entrada de qualquer RNA que possa contaminar a mesma

**CDC** – Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA

**COVID-19** – Doença que é provocada pelo vírus SARS-CoV-2

**Detetado** – Resultado do teste de RT-qPCR quando é observada a amplificação de sequências alvo, o RNA em análise (viral ou humano).

**EPI** – Equipamentos de Proteção Individual

**FAM** – Amidita de fluoresceína, (*fluorescein amidite*). Fluoróforo das sondas de Real time PCR

**Inconclusivo** – Resultado do teste de RT-qPCR quando não é possível determinar com confiança a presença/ausência do material genético do SARS-CoV-2.

**IMM** – Instituto de Medicina Molecular

**N1** – Região genómica do SARS-CoV-2, alvo de deteção nas reações de RT-qPCR

**N2** – Região genómica do SARS-CoV-2, alvo de deteção nas reações de RT-qPCR

**Não detetado** – Resultado do teste de RT-qPCR quando não é observada a amplificação de sequências alvo, o RNA em análise (viral ou humano).

**RNA** – Ácido ribonucleico

**RT-qPCR** – Reação em cadeia da DNA polimerase, quantitativa em tempo real e precedida de transcrição reversa

**RP** – gene da *Rnase P* Humana. Alvo de deteção usado como controlo de qualidade da extração de RNA.

**SARS-CoV-2** – vírus que provoca síndrome respiratória aguda grave de coronavírus 2

**UV** – radiação ultravioleta

### 3. Fluxo de trabalho

Todas as amostras que chegam à ESTBarreiro/IPS são encaminhadas para o laboratório do primeiro piso, para a sala de extração. Chegam dentro de uma caixa térmica (esferovite) com condições de temperatura aconselhadas para o transporte. São deixadas na portaria da escola, onde depois um dos operadores da sala de extração, recolhe-a, levando para a sala devida. Depois de colocar todos os EPI's necessários referidos no capítulo 4, poderá abrir a caixa.

O tubo que contém a amostra deve ser limpo com lixívia 15%, antes de entrar na Câmara de biossegurança, onde depois a amostra é transferida para tubos de rosca para proceder a uma segunda inativação por calor, para conferir maior fiabilidade na inativação.

Todas as amostras são recolhidas usando os kits de colheita preparados no laboratório, que incluem (Figura 1):

- 1 zaragatoa nasal
- 1 zaragatoa oral
- 1 tubo de colheita contendo 2 mL de meio de transporte inativante (Marca Bioer).

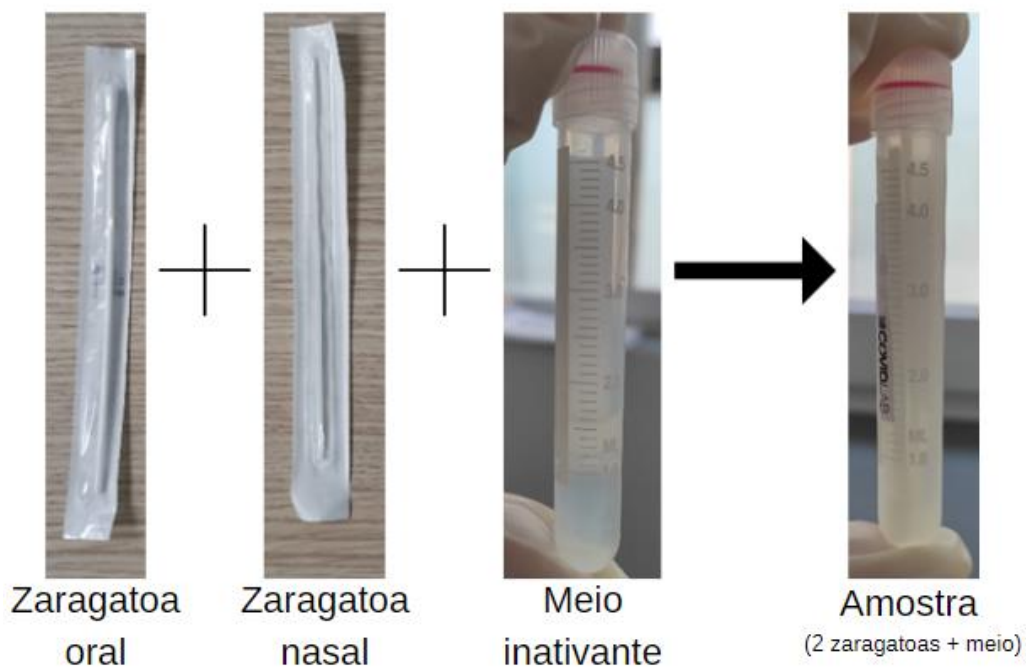


Figura 1 - Ilustração de uma amostra recolhida e o conteúdo da mesma

## Procedimento Operacional Padrão e Avaliação de Risco do IPS COVID LAB

Depois da segunda inativação por calor, é realizado o procedimento de extração de RNA<sup>1</sup>. Quando se obtém RNA da amostra, este é colocado num tubo etiquetado, que é transportado para a sala de RT-qPCR, onde é armazenado até se proceder à análise do mesmo. Este fluxo de trabalho referido, encontra-se, simplificando, na figura seguinte:

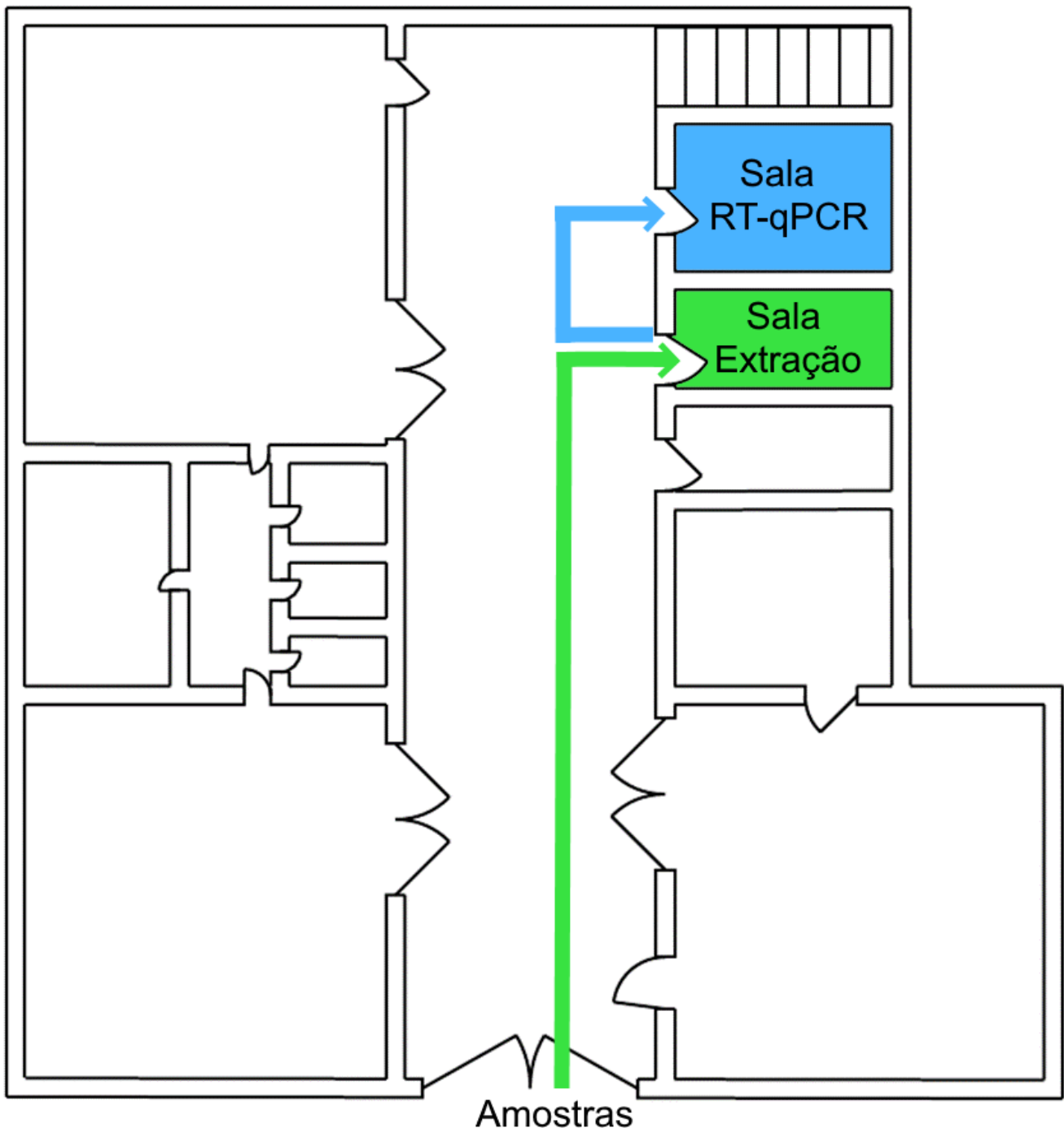


Figura 2 – Planta do laboratório do piso 1, com o fluxo de trabalho do IPS COVID LAB (não se encontra à escala)

<sup>1</sup> A sala de extração de RNA tem um Procedimento Operacional Padrão e Avaliação de risco, onde encontram descritos todos os procedimentos.

### 3.1. Sala de RT-qPCR

A sala de PCR é uma sala fisicamente separada da sala de extração de RNA (para evitar o risco de contaminações). O esquema da sala encontra-se na figura seguinte:

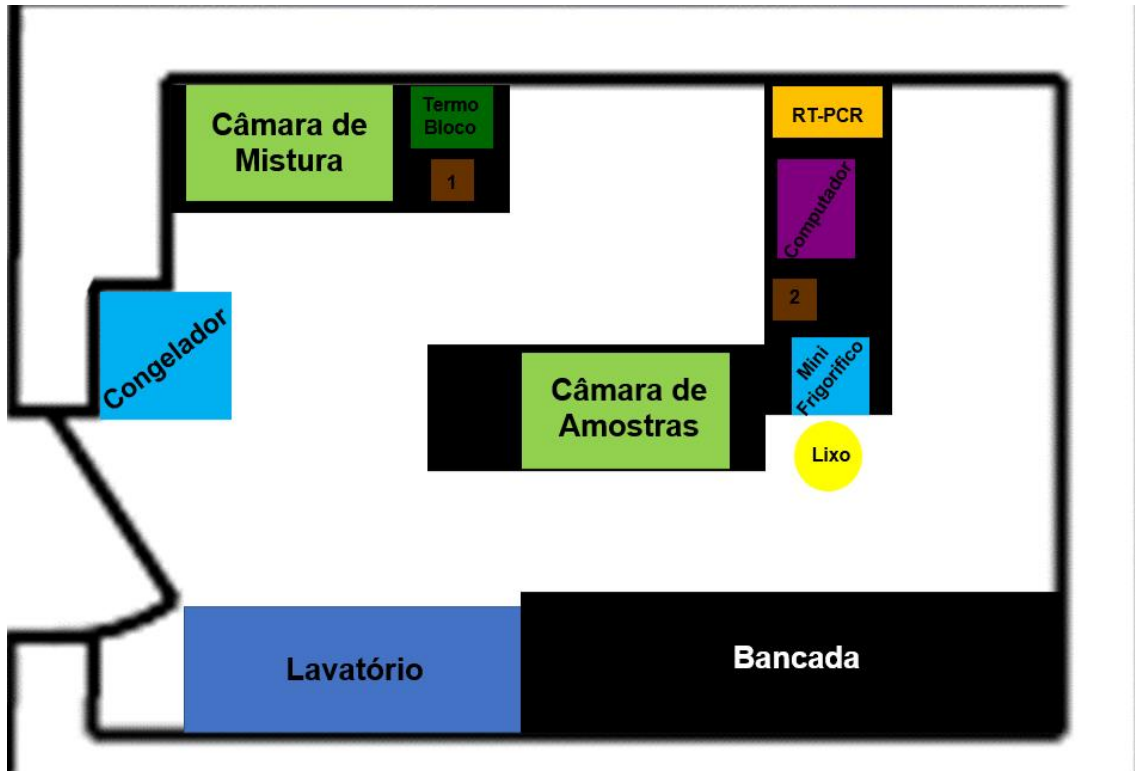


Figura 3 – Representação da sala de RT-qPCR

Falando especificamente da sala de PCR, encontra-se nesta sala:

- Duas Câmaras de UV destinadas à preparação das reações de PCR:
  - uma destinada a preparação das mixes reacionais (onde não entra qualquer amostra de DNA ou RNA) denominada **Câmara de mistura**
  - outra destinada a manuseamento de amostras e controlos positivos denominada **Câmara de amostras**;
- Aparelho de PCR em tempo real (RT-qPCR) e um computador que comanda o equipamento e são tratados os resultados do procedimento reacional;
- Um congelador onde são guardados amostras e reagentes, e um mini frigorifico para a necessidade de armazenar amostras e reagentes em ambiente refrigerado, por um curto espaço de tempo;
- Duas centrífugas representadas por 1 e 2 na figura. Uma para tubos e placas de PCR e outra para tubos *ependorf*;
- A preto encontram-se representadas as bancadas e mesas existentes na sala.

## Procedimento Operacional Padrão e Avaliação de Risco do IPS COVID LAB

A equipa de trabalho nesta sala inclui **1 supervisor** e **1 a 2 operadores**. O **primeiro operador** será a pessoa que prepara a placa com as mixes reacionais na câmara de mistura. O **segundo operador** trabalha na câmara de amostras e aplica as amostras na placa de PCR, seguindo as indicações do **supervisor**. Este último supervisionará o trabalho de pé e fará registos de todos os passos realizados. É o **supervisor** que determina a organização da placa de PCR, programa a reação no computador, e indica aos operadores o esquema de trabalho, que faz o registo das amostras avaliadas e das pessoas dentro da sala.

De forma que o trabalho dentro das câmaras fosse objetivo, e que o número de erros cometidos dentro destas fossem reduzidos, foram implementadas algumas medidas:

- Colocação de procedimentos (reduzidos, com a informação mais essencial), na parte de fora do vidro das câmaras, como representado nas imagens seguintes:



Figura 4 – Câmara de mistura (esquerda) e câmara de amostra (direita), como os devidos protocolos auxiliares

- Introdução de código de cores correspondente a cada um dos alvos, para a identificação de tubos durante os procedimentos:

RP	
N1	
N2	

Alvo RP – Verde (nas alíquotas *primers* e sondas uma bola da cor, e dentro da câmara para a realização da *mix*, escreve-se na tampa do tubo RP a verde;

## Procedimento Operacional Padrão e Avaliação de Risco do IPS COVID LAB

Alvo N1 – Vermelho (nas alíquotas *primers* e sondas uma bola da cor, e dentro da camara para a realização da *mix*, escreve-se na tampa do tubo N1 a vermelho;

Alvo N2 – Azul (nas alíquotas *primers* e sondas uma bola da cor, e dentro da camara para a realização da *mix*, escreve-se na tampa do tubo N2 a azul;

- Introdução de siglas para alguns reagentes

Controlos Positivos Virais (alvo N1 e N2) – Escrever C+ na alíquota a cor vermelha;

Controlos Positivos alvo RP – Escrever C+ na alíquota a cor verde;

### 3.1.1. Uso de Equipamento de proteção Individual

Para as duas câmaras, foram adotadas as seguintes medidas de utilização de EPI's, para além das medidas gerais de higienização laboratório (referidas posteriormente no capítulo 4), de forma evitar o mínimo de contaminações dentro das mesmas:

- Utilização de Bata descartável, por cima da bata pessoal de cada operador;
- Utilização de luvas compridas por cima da bata descartável, desinfetar com o spray RNase cleaner (trocar sempre que houver suspeita de contaminação);
- Utilização de máscara.

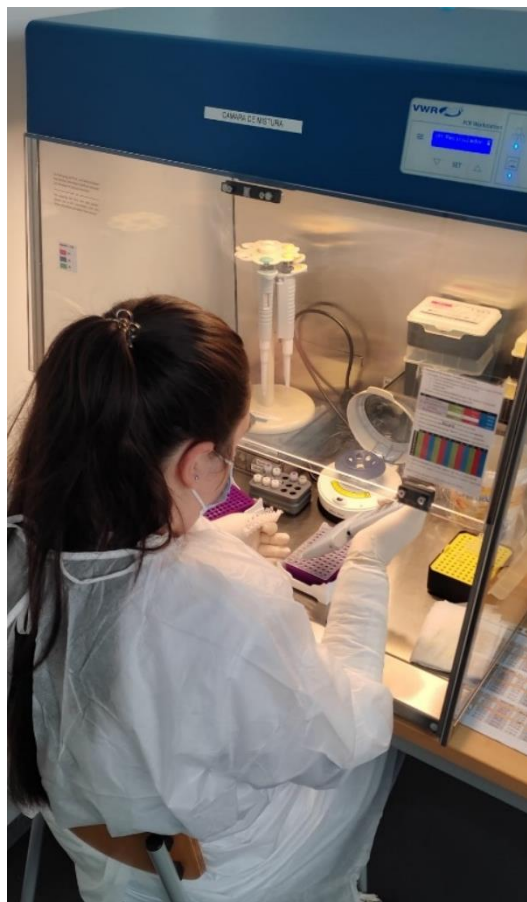


Figura 5 – Utilização de EPI's por parte do operador

## 4. Medidas de avaliação e controle de riscos

Começando com as medidas de controlo individual, todos os membros da equipa quando chegam a ESTBarreiro/IPS são obrigados a colocar máscara. Antes de irem para o laboratório, devem deixar todos os pertences pessoais numa sala, que terá um lugar destinado a cada pessoa e onde se devem equipar com a bata de laboratório individual e apanhar o cabelo. Dentro do laboratório, só deve entrar a bata pessoal, elásticos ou fitas para o cabelo e telemóvel. Não será permitido sapatos abertos, uso de roupa que exponha alguma parte do corpo, uso de barbas longas, relógios e joias (nas mãos, pulsos e antebraços).

Quando estiver no laboratório, em todos os procedimentos deverá sempre cumprir com as regras de prevenção da COVID-19 divulgadas pela organização mundial de saúde, tais como:

- Distanciamento social (pelo menos mais de 1 metro de distância);
- Uso de máscara;
- Higiene respiratória;
- Lavar as mãos com frequência ou desinfeção das mesmas;
- Não tocar nos olhos, nariz e boca com as mãos sujas.

Nota importante sobre **Colocação e uso de máscara cirúrgica [2]:**

- 1) Higienize as mãos, com água e sabão ou com uma solução à base de álcool, antes de colocar a máscara;
- 2) Verifique qual o lado a colocar voltado para a cara (branco lado interno, de cor lado externo)
- 3) Prenda-a à cabeça com os atilhos, dando um laço em cada um, ou com os elásticos, sem os cruzar;
- 4) Ajuste a banda flexível na cana do nariz, garantindo que a boca, nariz e queixo estão cobertos;
- 5) Certifique-se que a máscara está bem ajustada à face;
- 6) Evite tocar na máscara enquanto a tiver colocada. Se tocar, higienize as mãos;
- 7) **Não deve retirar a máscara para falar, tossir ou espirrar;**
- 8) **Substitua a máscara por uma nova, se esta estiver húmida**, higienizando as mãos entre as duas tarefas. Idealmente **não deve usar a máscara durante mais de 4 horas seguidas;**
- 9) Retire a máscara, segurando nos atilhos ou elásticos, a partir da parte de trás (não toque na frente da máscara);
- 10) Descarte-a de imediato num caixote do lixo;

Higienize as mãos, após retirar a máscara.

### 4.1. Informação Transversal

Ao entrar na sala deve-se:

- Lavar as mãos;
- Calçar 1 par de luvas longas e desinfetar com o spray RNase cleaner;
- Vestir batas descartáveis (por cima da bata pessoal);

Antes de iniciar o trabalho do dia:

- Ligar os UV's nas câmaras (mistura e de amostras) (30 minutos);
- Ligar equipamentos a utilizar: Termobloco, Computador, Equipamento de PCR em tempo real;
- Verificar e registar a temperatura do congelador (-22°C);
- Verificar se não existe falta de material necessário dentro da câmara (ex: tubos *ependorf*, tiras de 8 tubos PCR, etc).

Dentro da câmara, depois dos UV's deve-se:

- Passar com Álcool 70 % e Spray RNase cleaner à superfície bem como todo o equipamento dentro da mesma;
- Colocar um toalhete/papel embebido em álcool 70% para limpeza quando necessária;

Tendo todos os passos realizados pode-se começar a trabalhar. Entre procedimentos deve-se realizar nova limpeza.

Nota: A entrada de material extra dentro das câmaras, deve ser feita limpando a sua superfície exterior e base.

No final do dia deve-se:

- Repor todo o material necessário para o dia seguinte;
- Limpar com Álcool 70 % e spray RNase cleaner todo o equipamento dentro das câmaras;
- Retirar os lixos que estão dentro do recipiente para o lixo que se encontram dentro das câmaras;

- Ligar os UV's das Câmaras;
- Desinfetar/limpar todas as bancadas da sala;
- Verificar e registar a temperatura do congelador (-22°C).

### 4.2. Riscos Associados

A sala de *RT-qPCR* é uma sala fisicamente separada da sala de Extração de RNA. As amostras que chegam à sala de *RT-qPCR*, vindas da sala de Extração de RNA, não representam perigo biológico para os operadores porque nelas só estão presentes os ácidos nucleicos extraídos.

Tendo em conta que são cumpridas todas as normas de prevenção da COVID 19, os possíveis riscos existentes não associados a doença na sala de *RT-qPCR*, estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 – Descrição e medidas a tomar tendo em conta os riscos existentes na sala de *RT-qPCR*

Descrição do risco	Medida de prevenção de risco
<b>Risco químico/biológico (baixo risco)</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Todos os trabalhos devem ser realizados numa câmara de UV. A mesma deve ser válida;</li><li>• Ter boas práticas ao trabalhar dentro da câmara (movimentos lentos, dentro da mesma ter somente o material necessário para ter uma área de trabalho desocupada);</li><li>• Uso de todos os EPI's (bata, luvas);</li><li>• Lavar as mãos no final do procedimento.</li></ul>
<b>Geração de aerossóis e gotículas</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• A produção de aerossóis deve ser evitada;</li><li>• Todas as práticas que podem produzir aerossóis devem ser realizadas dentro da câmara de biossegurança (ex. <i>vortex</i>)</li><li>• É proibido o uso de sprays, apenas <i>RNase Cleaner</i> (NZYtech);</li></ul>

## Procedimento Operacional Padrão e Avaliação de Risco do IPS COVID LAB

Caso aconteça uma emergência na sala, encontra-se na Tabela 2, como deve proceder a mesma.

Tabela 2 – Procedimentos em caso de emergência

Descrição do risco	Medida de prevenção de risco
<b>Derrame biológico</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Se ocorrer o derramamento dentro da câmara deve:<ul style="list-style-type: none"><li>○ Cobrir a zona com papel ou toalhetes que contenham <i>RNase cleaner</i> ou etanol 70%;</li><li>○ Remover o papel ou toalhetes e colocar no lixo existente dentro da câmara;</li><li>○ Descarte as luvas contaminadas e coloque novas;</li><li>○ Descontamine com papel ou toalhete a área de trabalho e os materiais dentro da câmara;</li><li>○ Descarte novamente as luvas e coloque novas;</li><li>○ Coloque dentro da câmara novo papel ou toalhete humedecido em <i>RNase cleaner</i> ou Etanol 70% de prevenção e continue a trabalhar.</li></ul></li></ul>
<b>Material Biológico/ químico inativado em contacto com a pele, olhos, boca ou nariz</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Limpe a área afetada abundantemente com água e sabão;</li><li>• Siga as instruções indicadas na folha de segurança do material que entrou em contacto.</li></ul>

### 4.3. Notas Importantes

É necessário que todos cumpram com a utilização dos seus Equipamentos de proteção individual (EPI), para evitar o risco de contaminações de amostras e reagentes com material genético do operador (visto que o alvo usado como controlo de qualidade é humano). Para além disso, a pele humana é rica em RNAses, enzimas que degradam o RNA. O não uso ou uso inadequado dos EPIs pode levar à degradação das amostras em análise.

As técnicas de PCR são muito sensíveis, o que pode levar a que pequenas contaminações acidentais possam criar produtos amplificados, podendo pôr em causa o resultado de uma amostra ou de todo o conjunto.

Manter separado a área de trabalho para realização de *MIX* e para o manuseamento de ácidos nucleos extraídos de cada amostra e de controlos positivos. O mesmo acontece com os materiais usados, como por exemplo, pipetas, pontas da mesma, etc. O cruzamento entre materiais com e sem ácidos nucleicos levam a um risco elevado de contaminações.

Não substitua, nem misture, reagentes de diferentes lotes de kits ou de outros fornecedores.

## Procedimento Operacional Padrão e Avaliação de Risco do IPS COVID LAB

---

Mudar as pontas das pipetas com filtro de cada vez que mude o reagente ou amostra, quando entrou em contacto com outro (reagente ou amostras) e de cada vez que suspeita que pode ter ocorrido contaminação

Durante todo o processo é essencial o cumprimento de boas técnicas de laboratório para minimizar os riscos de contaminação cruzada entre amostras e a introdução inadvertida de nucleases nas amostras durante e após o processo de extração.

Mantenha os reagentes e tubos de reação, em caixas, devidamente etiquetados e tapados.

*Primers*, sondas e *one-step RT-qPCR Master Mix (X2)* devem ser descongelados e mantidos em bloco frio durante todo o tempo de preparação. O mesmo acontece com o RNA para garantir estabilidade.

As superfícies de trabalho, pipetas e centrifugas devem ser limpas e descontaminadas com produtos de limpeza como etanol 70 % ou *RNase Cleaner* para minimizar o risco de contaminação por ácidos nucleicos.

## 5. Equipamentos, Reagentes e Consumíveis

Neste capítulo encontram-se descritos os equipamentos, suportes e caixas armazenamento, reagentes e consumíveis usados na Sala de PCR. Começando pelos equipamentos, pode-se observar na tabela seguinte, quais foram usados:

Tabela 3 – Equipamentos utilizados na sala de PCR

Nome	Marca	Descrição
<b>Câmara de UV- PCR (UVC)</b>	Frilabo	Câmara de UV- DNA/RNA (UVC-T-M-AR)
<b>Câmara de UV- PCR (VWR)</b>	VWR	Estação de trabalho para PCR da VWR®
<b>Centrifuga de Placas PCR</b>	VWR	-
<b>Centrífuga de spin-down</b>	VWR	Microcentrífuga, MiniStar com rotores e adaptadores
<b>Computador</b>	HP	Fornecido pelo IPS
<b>Congelador</b>	Frilabo	Congelador F 410 LH L1 6W, 312 litros
<b>Micropipeta P10</b>	Frilabo	Micropipeta Nichipet EX II 0,5 a 10µl
<b>Micropipeta P1000</b>	Frilabo	Micropipeta Nichipet EX II 100 a 1000µl
<b>Micropipeta P2</b>	Frilabo	Micropipeta Nichipet EX II 0,1 a 2µl
<b>Micropipeta P20</b>	Frilabo	Micropipeta Nichipet EX II 2 a 20µl
<b>Micropipeta P200</b>	Frilabo	Micropipeta Nichipet EX II 20 a 200µl
<b>Mini Frigorífico</b>	-	4°C
<b>Multicanal (12 canais) P300</b>	Frilabo	Micropipeta Nichipet EX II Multi 30 a 300µl
<b>Multicanal (8 canais) P10</b>	Frilabo	Micropipeta Nichipet EX II Multi 0,5 a 10µl
<b>Multicanal (8 canais) P100</b>	Frilabo	Micropipeta Nichipet EX II Multi 5 a 100µl
<b>Multicanal (8 canais) P300</b>	Frilabo	Micropipeta Nichipet EX II Multi 30 a 300µl
<b>Real Time PCR</b>	Frilabo	RealLine Cycler 96-5 (Hex, Fam, Rox, Cy5, Cy5.5)
<b>Termobloco</b>	Frilabo	Termobloco (4-100°C) com agitação

Depois dos equipamentos, falamos dos reagentes. Os reagentes utilizados na sala de PCR são armazenados no congelador a uma temperatura de -22°C à exceção da água de biologia molecular que se encontra à temperatura ambiente (Tabela 4).

## Procedimento Operacional Padrão e Avaliação de Risco do IPS COVID LAB

**Tabela 4 – Reagentes utilizados na sala de PCR**

Nome	Marca	Descrição	Características técnicas
Água, grau Biologia Molecular	NZYtech	Water for Molecular Biology	reagente para RT-PCR e outras soluções
DNA de salmão	Sigma	Deoxyribonucleic acid sodium salt from salmon testes - 1G	Reagente com especificações exatas.
NZYSpeedy One-step RT-qPCR Probe Master Mix (2x)	NZYTech	NZYSpeedy One-step RT-qPCR Probe Master Mix (2x)	kit de reagentes RT-qPCR especificamente indicado no procedimento registado no INSA
Primers e Probes (kit N1, N2 e RP, FAM)	Frilabo	2019-nCoV Probe & Primer for SARS-CoV-2 (1000rxns) (CDC-Qualified)	conjunto de <i>primers</i> e probe (marcada com FAM+BHQ1) indicados pelo CDC para análise molecular de SARS-COV-2 (gene viral N1, gene viral N2 e gene humano RP).
RNA SARS-CoV-2	Sigma	EURM-019 single stranded RNA (ssRNA) fragments of SARS-CoV-2 (100 uL)	controlo positivo (EURM-019) para análise molecular de SARS-COV-2 (fragmentos de ssRNA do SARS-CoV-2), certificado pela EU .

Por fim, também são apresentados os consumíveis usados na Tabela 5

**Tabela 5 - Consumíveis utilizados na sala de PCR**

Nome	Marca	Descrição	Características técnicas
Batas descartáveis	VWR	VISITOR COAT PP WATERPROOF WHITE L 1 * 50 unid.	batas descartáveis em material impermeável. Tamanho único.
Batas descartáveis	enerre PHARMA	Caixa com 50 batas	
Caixa para tubo PCR (tampa normal)	VWR	PCR RACK WITH CLEAR LID GREEN	-
Caixa para tubo PCR (tampa reversível)	VWR	LOW TEMP PCR® RACK 96	-
Caixas para <i>ependorfs</i> (coloridas)	Frilabo	Caixa crio mix, 81 tubos de 2,2ml (pk5)	-
Canetas de acetato	Artline 854	Azul, verde e vermelha	-

## Procedimento Operacional Padrão e Avaliação de Risco do IPS COVID LAB

<b>Luvas longas - L</b>	VWR	[EN]GLOVE NITRILE N- STER AMBID.40C M L 1 * 1.000 unid.	Luvas de nitrilo, ambidestras com punho longo. Aprox. 400 mm de comprimento. Adequadas para uso em salas limpas de Classe 10 / ISO 4. Tamanho L
<b>Luvas longas - M</b>	VWR	[EN]GLOVE NITRILE N- STER AMBID.40C M M 1 * 1.000 unid.	Luvas de nitrilo, ambidestras com punho longo. Aprox. 400 mm de comprimento. Adequadas para uso em salas limpas de Classe 10 / ISO 4. Tamanho M
<b>Luvas longas - S</b>	VWR	[EN]GLOVE NITRILE N- STER AMBID.40C M S 1 * 1.000 unid.	Luvas de nitrilo, ambidestras com punho longo. Aprox. 400 mm de comprimento. Adequadas para uso em salas limpas de Classe 10 / ISO 4. Tamanho S
<b>Luvas normais L</b>	enerre PHARMA	Caixas 100 unidades	-
<b>Luvas normais M</b>	KRAPE S.A.	Caixas 100 unidades	-
<b>Luvas normais S</b>	PARACÉLSIA	Caixas 100 unidades	-
<b>Luvas normais XS</b>	enerre PHARMA	Caixas 100 unidades	-
<b>Máscaras</b>	Lotus NL B.V.	Caixas 50 unidades	-
<b>Pinças</b>	-	Metal	-
<b>Placas PCR</b>	Frilabo	Placas de 96x0,2ml (LP) transparente (25und)	placas de 96x0,2mL para Real-Time PCR. LP e transparente. Compatível com o equipamento Realine 96x5.
<b>Pontas 10 µL</b>	Frilabo	Caixa (10x96un) pontas LRTF estéreis filtro 10µl	Pontas com filtro 10µl, estéreis e Rnase e Dnase free. Em caixas individuais ou fornecidas com mínimo 5 caixas compatíveis se for modelo de "refill". Compatível com Micropipeta Nichipet EX II e Micropipeta Nichipet EX II Multi
<b>Pontas 100 µL</b>	Frilabo	Caixa (10x96) pontas estéreis com filtro 100uL	Pontas com filtro 100µl, estéreis e Rnase e Dnase free. Em caixas individuais ou fornecidas com mínimo 5 caixas compatíveis se for modelo de "refill". Compatível com Micropipeta Nichipet EX II e Micropipeta Nichipet EX II Multi

## Procedimento Operacional Padrão e Avaliação de Risco do IPS COVID LAB

<b>Pontas 1000 µL</b>	Frilabo	Caixa de pontas com filtro de 1000ul (8x72und)	Pontas com filtro 1000µl, estéreis e Rnase e Dnase free. Em caixas individuais ou fornecidas com mínimo 5 caixas compatíveis se for modelo de "refill". Compatível com Micropipeta Nichipet EX II.
<b>Pontas 20 µL</b>	Frilabo	Caixa (10x96un) pontas estéreis com filtro 20µl	Pontas com filtro 20µl, estéreis e Rnase e Dnase free. Em caixas individuais ou fornecidas com mínimo 5 caixas compatíveis se for modelo de "refill". Compatível com Micropipeta Nichipet EX II
<b>Pontas 200 µL</b>	Frilabo	Caixa (10x96un) pontas estéreis com filtro 200µl	Pontas com filtro 200µl, estéreis e Rnase e Dnase free. Em caixas individuais ou fornecidas com mínimo 5 caixas compatíveis se for modelo de "refill". Compatível com Micropipeta Nichipet EX II e Micropipeta Nichipet EX II Multi
<b>Recipiente para descarte de lixo</b>	-	Colocar um saco de autoclave pequeno	
<b>Rolo de selar placas PCR</b>	NZYtech	Roller for adhesive seals	-
<b>Sacos de autoclave</b>	Frilabo	Saco (500un) autoclave 134°C, 300x500mm, 15litros	-
<b>Selante de placa PCR</b>	Frilabo	Folhas adesivas óticas (100 folhas)	Folhas adesivas óticas, adequadas para vedar placas de PCR para Real-Time PCR
<b>Spray Rnase cleaner</b>	NZYTech	RNase Cleaner	Produto de limpeza/descontaminação especialmente adequado para o trabalho com RNA. Em spray. Deve eliminar contaminação com RNase de vidro, plástico e superfícies inox.
<b>Suporte micropipeta</b>	Frilabo	Suporte para 6 Micropipetas	-
<b>Suporte refrigerante - 15 eppendorfs</b>	VWR	COOLRACK M15 GRAY	-
<b>Suporte refrigerante - 30 eppendorfs</b>	VWR	COOLRACK M30 GRAY	-

## Procedimento Operacional Padrão e Avaliação de Risco do IPS COVID LAB

<b>Suporte refrigerante - tubos/placas PCR</b>	VWR	Mino cooler, PCR, tampa transparente 1 * 2 unid.	-
<b>Tapetes adesivos</b>	VWR	Tapete adesivo, 60L, 61x76 cm, azul 1 * 4 unid.	tapete adesivo e desinfetante. Dimensões aproximadas 60 x 75 cm. 60 camadas (ou dobro das unidades se 30 camadas).
<b>Tesoura</b>	-	Metal	
<b>Tiras de tampas (PCR)</b>	Frilabo	Tiras de 8 tampas (120und)	Tiras de 8 tampas, adequadas para tubos de PCR; Dnase e Rnase free.
<b>Tiras de tubos de PCR</b>	Frilabo	Tiras de 8x0,2ml (RP) com tampas (120und)	Tiras ou strips de 8 tubos de 0,2ml com tampas; Dnase e Rnase free.
<b>Tubos com tampa de rosca</b>	Frilabo	Tubos 1.5ml, c/base, oring, st (500und)	microtubos 1,5 mL com tampa de rosca com o-ring; estéreis e Rnase e Dnase free
<b>Tubos Falcon 15mL</b>	VWR	TUBO CENTRIFUG A 15ML ESTÉRIL - EMB.: 50/RACK. 1 * 500 unid.	Tubos cónicos de centrífuga, tipo falcon, de 50 mL, estéreis e em rack/suportes
<b>Tubos Falcon 50mL</b>	VWR	TUBO CENTRIFUG A 50ML ESTÉRIL EMB.: 25/RACK. 1 * 500 unid.	Tubos cónicos de centrífuga, tipo falcon, de 15 mL, estéreis e em rack/suportes

## 6. Condições reacionais

Para se realizar uma reação de PCR, tem de se ter em consideração todas as condições reacionais, para que a reação ocorra sem problemas. O primeiro passo é verificar as quantidades e concentrações a usar de cada reagente na reação e o volume final da mesma, neste caso, tem um volume final de 20 µL e é composta por:

Tabela 6 – Composição da reação que é colocada no RT-qPCR

Reagente		Volume por Reação (1X)		Concentração Final	Observações
		RP e N1	N2		
Água sem nucleasse		4 µL	3 µL		Mix Reacional e controlo negativo preparado na Câmara de Mistura
One-step RT-qPCR Master Mix (2x)		10 µL			
DNA Salmão		0 µL	1 µL	0,1 ng/mL	
Mix de Primers e sondas [3]		1 µL		Sondas: 100 nM Primers: 400 nM	
Amostra ou Controlo	Negativo *	5 µL		-	Amostras ou controlos positivos adicionados na Câmara de amostra
	Positivo ou amostra				
<b>Total</b>		<b>20 µL</b>			

\*o controlo negativo tem água sem nucleasse em vez de amostra

O Segundo passo, é verificar as temperaturas e as etapas da reação PCR, para que os intervenientes da reação (enzimas, *primers*, sondas, etc) estejam nas condições de temperatura a eles favorável. Estas condições de reação no equipamento de RT-PCR são:

Tabela 7 – Programa de PCR

Ciclos	Temperatura	Tempo	Notas
1	50 °C	10 min	RT
1	95 °C	5 min	
45	95 °C	5 seg	PCR
	55 °C*	30 seg	

\*Etapa em que é detetada fluorescência.

## 6.1. Primers e Sondas

Os *primers* e sondas utilizados neste procedimento são os indicados pelo CDC [4]. Estes incluem dois pares *primers* mais sondas, para amplificar e detetar duas regiões genéticas do vírus, os alvos N1 e N2. Também inclui um par de *primers* e sonda para uma região do gene humano, RNase P (RP). Todas as sondas devem ser lidas no canal de fluorescência FAM e cada deteção do alvo (N1, N2 e RP) requiere uma reação de PCR individual (reações de PCR simplex). As sequências de cada *primer* e sonda usado encontra-se na tabela seguinte.

Tabela 8 – Primers e sondas utilizados [5]

Nome	Descrição	Sequência de oligonucleotídeos	Fluoróforo e quencher
2019-nCov_N1-F	Primer Forward 2019-nCov_N1	5'-GAC CCC AAA ATC AGC GAA AT- 3'	Nenhum
2019-nCov_N1-R	Primer Reverse 2019-nCov_N1	5'-TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG -3'	Nenhum
2019-nCov_N1-P	Sonda 2019-nCov_N1	5'-FAM-ACC CCG CAT TAC GTT TGG TGG ACC- BHQ1-3'	FAM, BHQ-1
2019-nCov_N2-F	Primer Forward 2019-nCov_N2	5'-TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA - 3'	Nenhum
2019-nCov_N2-R	Primer Reverse 2019-nCov_N2	5'-GCG CGA CAT TCC GAA GAA -3'	Nenhum
2019-nCov_N2-P	Sonda 2019-nCov_N2	5'-FAM-ACA ATT TGC CCC CAG CGC TTC AG- BHQ1 -3'	FAM, BHQ-1
2019-nCov_RP-F	Primer Forward RNase P	5'-AGA TTT GGA CCT GCG AGC G -3'	Nenhum
2019-nCov_RP-R	Primer Reverse RNase P	5'-GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT - 3'	Nenhum
2019-nCov_RP-P	Sonda RNase P	5'-FAM- TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG- BHQ1 -3'	FAM, BHQ-1

## 7. Preparação de Soluções e organização de trabalho

### 7.1. Preparação das soluções de *primers* e sondas

O kit de *primers* e sondas 2019-nCoV CDC *Probe and Primer Kit* for SARS-Cov-2 fornece cada conjunto de 2 *primers* + sonda num único tubo e liofilizados. Cada tubo contém o equivalente a 1000 reações com 500  $\mu$ M de cada *primer* e 100  $\mu$ M de sonda num volume final de 20  $\mu$ L

Quando os *primers* chegam, devem ser levados para a câmara de UV de mistura, na sala de RT-qPCR. É importante que estes nunca contactem com locais onde se trabalha com ácidos nucleicos, para evitar a sua potencial contaminação.

Os *primers* e sondas devem ser resuspenso em água livre de RNase (água de biologia molecular ultrapura NZYtech), num volume de 1250  $\mu$ L, de modo que seja adicionado 1  $\mu$ L da mistura de *primers* e sonda à mix reacional, e que fiquem à concentração indicada na tabela 1

Nestes tubos é colocado a identificação “PP N1”, “PP N2” ou “PP RP”, usando o código de cores indicado em 3.1 Depois de resuspenso, são realizadas alíquotas de 36,8  $\mu$ L<sup>2</sup> em tiras de 8 tubos PCR identificados segundo o código de cores e são guardados no congelador a -20°C, em caixas devidamente identificadas.



Figura 6 - Caixas identificadoras dos *primers* e sondas de cada alvo. “PPN1” - Roxa, “PPN2” - Azul, “PPRP” – Verde

<sup>2</sup> Estas alíquotas estão preparadas para realizar 32 reações (uma placa de PCR completa)

### 7.2. Preparação de soluções de DNA de Salmão

Para a estabilização das reações do alvo viral N2, é necessário inserir DNA de testículos de Salmão. Este ajuda a que não ocorram ligações inespecíficas entre *primers* que pode levar à amplificação de produtos que não são os corretos. Esta amplificação inespecífica leva a fenômenos de incorreta identificação de reações positivas, ou seja, a falsos positivos, resulta na reação do controlo negativo da placa dos inconclusivos ou mesmo invalidar todo um conjunto de análises de amostras.

Assim sendo, cada reação do alvo N2 é suplementada com 100 ng de DNA de salmão, preparando-se uma solução de trabalho a 0,1 mg/mL, para que se adicione em cada reação 1 µL da solução de DNA. A solução de DNA de salmão é preparada do seguinte modo:

#### Solução stock 100 X:

- 1) Pesar-se 10 mg de DNA de testículos de salmão (SIGMA) num tubo de rosca 1,5 mL;
- 2) Adicionar 1000 µL de água de biologia molecular (água ultrapura), dentro da câmara de mistura;
- 3) Incubar a 4 °C com agitação a 250 rpm durante toda a noite, num termobloco com agitação;
- 4) Identificar e armazenar a solução no congelador.

#### Solução de trabalho de DNA de salmão 0,1 mg/mL (1 X):

- 1) Num tubo de rosca de 1,5 mL, adicione 990µL de água de biologia molecular (ultrapura);
- 2) Retire 10 µL da solução 100 X, e adicione ao tubo de rosca anterior.
- 3) Alíquotar (100 µL), identificar e armazenar a solução no congelador.

### 7.3. Preparação alíquotas de controlos positivos

#### Preparação Controlo positivo viral:

Através do reagente EURM-019 single stranded RNA (ssRNA) fragments of SARS-CoV-2, fazer uma diluição 1/1000.

1. Num tubo de rosca de 1,5 mL, adicione 999µL de água de biologia molecular (ultrapura);
2. Retirar 1 µL do reagente EURM-19, e adicionar ao tubo de rosca anterior;
3. Homogeneizar a amostra pipetando para cima e para baixo;
4. Em Tiras de tubos de PCR, identificar com C+ (vermelho), e em cada tubo de PCR adicionar 13 µL da solução de controlo positivo;

5. Armazenar no congelador.

### Preparação Controlo positivo alvo RP:

Através de amostras que obtiveram resultados de PCR negativos, e em que o resultado para o alvo RP fosse positivo, são amostras que podem ser usadas como controlo positivo do alvo RP.

1. Num tubo de rosca de 1,5 mL, adicione todo o líquido presente em várias amostras negativas até perfazer o volume do tubo;
2. Homogeneizar a amostra pipetando para cima e para baixo;
3. Em Tiras de tubos de PCR, identificar com C+ (verde), e em cada tubo de PCR adicionar 8 µL da solução referida no ponto 1.;
4. Armazenar no congelador.

### **7.4. Organização de reagentes e soluções no congelador da sala de PCR**

Para organização e para evitar risco de contaminações entre as duas câmaras, o congelador está dividido em 4 seções (Figura 7):

- Primeira prateleira está reservada apenas a material que entra dentro da câmara de mistura;
- Segunda prateleira está reservada apenas a material que entra dentro da câmara de amostras;
- Terceira prateleira está reservada para amostras já analisadas (armazenamento de amostras)
- Quarta prateleira está reservada para o Projeto DIzCOVer@Setúbal e armazenamento de reagentes como o kit de Primers e sondas

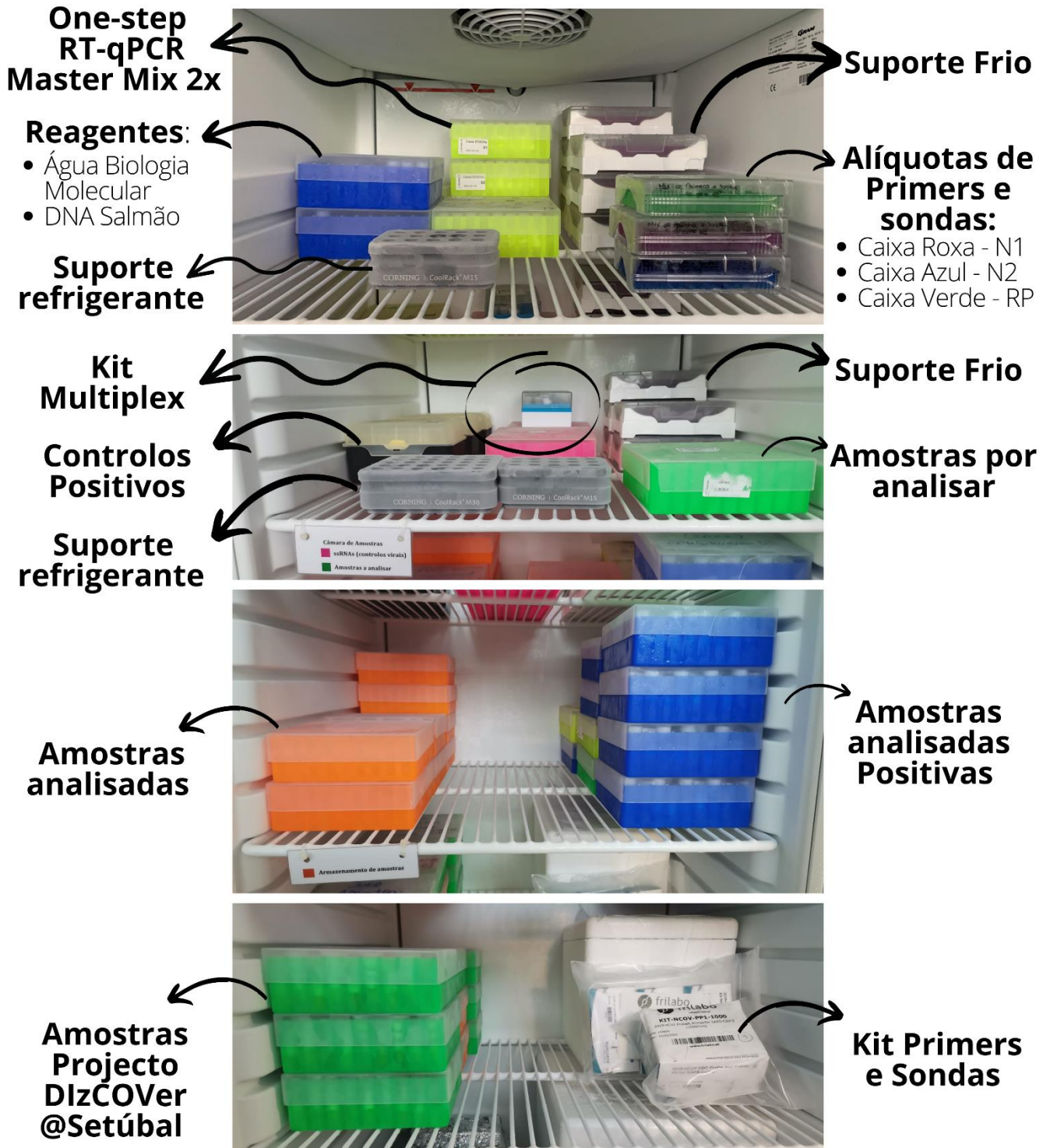


Figura 7 - Organização de reagentes e soluções no congelador da sala de PCR

## 7.5. Organização da Master Mix de reação e configuração da placa

A preparação destas *Mixes* envolve dois membros da equipa, o **operador** e o **supervisor**. O operador realiza todo o trabalho dentro da câmara, enquanto o supervisor regista todas as amostras e passos e ajuda o operador quando necessário.

Antes de iniciar o trabalho o operador terá de fazer a **limpeza** da câmara e de todo o material dentro desta, primeiro com etanol 70% e depois com RNase. Deve ainda desinfetar as bancadas e superfícies do mesmo método.

Como contém 96 poços, consegue-se fazer no máximo, em cada placa, a análise de 29 amostras, mais dois controlos negativos e um positivo, dando assim um total de 32 reações por cada alvo. Deste modo, o *layouts* para esta opção é o seguinte:

Tabela 9 - Disposição das Amostras e controlos na placa de PCR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C-	C-	C-	G	G	G	O	O	O	W	W	W
B	C-	C-	C-	H	H	H	P	P	P	X	X	X
C	A	A	A	I	I	I	Q	Q	Q	Y	Y	Y
D	B	B	B	J	J	J	R	R	R	Z	Z	Z
E	C	C	C	K	K	K	S	S	S	AA	AA	AA
F	D	D	D	L	L	L	T	T	T	AB	AB	AB
G	E	E	E	M	M	M	U	U	U	AC	AC	AC
H	F	F	F	N	N	N	V	V	V	C+	C+	C+

**Legenda:** C-, Controlo Negativo; C+, Controlo Positivo; De A a AC 29 amostras; Cor verde, Master Mix do gene RP; Cor vermelha, Master Mix do gene N1 e Cor azul, Master Mix do gene N2

Quando há menos amostras, podem ser feitos outros *layouts*, ficando os controlos negativos e positivos em posições relativas equivalentes.

Para a *Mix* calcula-se a quantidade de cada reagente a ser colocado em cada poço, juntando mais 15% de excesso para contabilizar perdas durante a pipetagem. Para cada *Master Mix* é adicionado:

## Procedimento Operacional Padrão e Avaliação de Risco do IPS COVID LAB

Tabela 10 - Composição da Master Mix para o gene RP e N1

Reagente	Volume por Reação (1X)	Volume por Reação (32X) +15% excesso
Água sem nucleasse	4 µL	128 µL + 15% = 147,2 µL
One-step RT-qPCR Master Mix (2x)	10 µL	320 µL+15% = 368 µL
Mix de <i>Primers</i> e sondas	1 µL	32 µL + 15% = 36,8 µL
<b>Total</b>		552 µL

Tabela 11 - Composição da Master Mix para o gene N2

Reagente	Volume por Reação (1X)	Volume por Reação (32X) +15% excesso
Água sem nucleasse	3 µL	128 µL + 15% = 110,4 µL
One-step RT-qPCR Master Mix (2x)	10 µL	320 µL+15% = 368 µL
DNA Salmão	1 µL	32 µL + 15% = 36,8 µL
Mix de <i>Primers</i> e sondas	1 µL	32 µL + 15% = 36,8 µL
<b>Total</b>		552 µL

Em anexo nº 5 encontram-se as tabelas para a preparação das *mixes* para n<sup>os</sup> inferiores de amostra.

## 8. Procedimento experimental

- 1) Descongelar as alíquotas que contêm os *primers* e sondas dos genes de interesse, as alíquotas de One-step RT-qPCR Master *Mix* 2x e as alíquotas de água sem nucleasse;
- 2) Na Câmara de mistura, coloque todas as alíquotas num bloco frio, onde devem estar durante todo o processo;
- 3) Aquecer o DNA de Salmão a 96 °C durante 5 minutos;
- 4) Identifique o tubo com N1, N2 ou RP consoante a *mix* que for realizar (utilize o código de cores referenciado no subcapítulo 3.1);



Figura 8 - Representação das mix reacionais

- 5) Adicione, os reagentes no tubo de *Mix*, conforme descrito na Tabela 10 ou Tabela 11. Deverá adicionar os reagentes pela ordem que aparecem na mesma. No fim misture pipetando para cima e para baixo;



Figura 9 - Reagentes utilizados na mix reacional. Da direita para a esquerda encontra-se a *taq* 2X, depois o DNA de Salmão diluído e por fim as alíquotas de primers e sondas de cada alvo genómico

- 6) Repetir do passo 1 ao 4, três vezes, para preparar as *master Mix* para os 3 alvos;
- 7) Depois das 3 *Mix* preparadas, numa tira de 8 tubos de PCR colocar 137,8 µL de cada *mix* pela seguinte ordem:

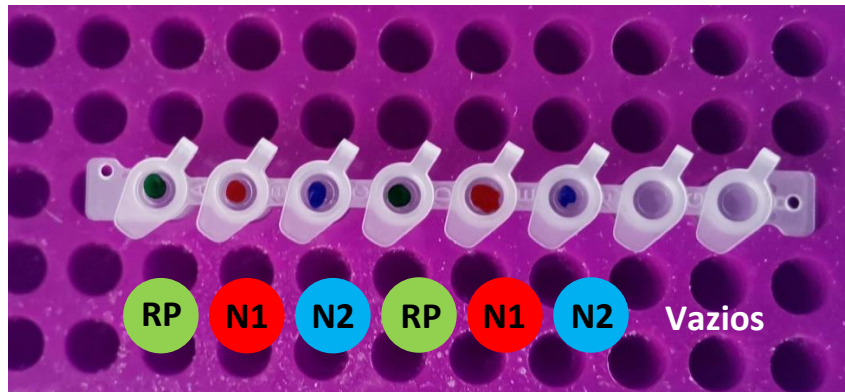


Figura 10 - Representação distribuição da Mix

- 8) Repetir o passo anterior duas vezes;
- 9) Colocar a placa de 96 poços num suporte frio;
- 10) Com a ajuda da multicanal, distribuir 15  $\mu$ L das *Mix's* na placa de 96 poços através dos tubos anteriores. A distribuição pela placa está representada na Tabela 9;

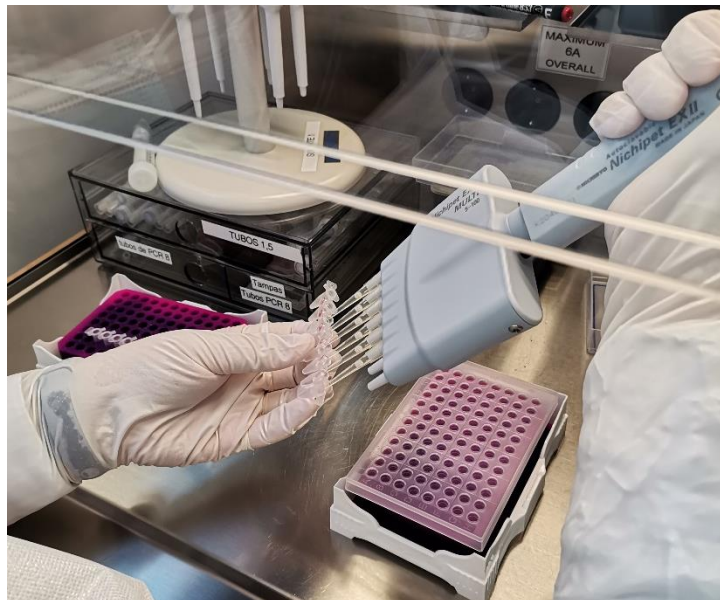


Figura 11 – Representação da distribuição da Mix reacional pela placa de PCR

- 11) Nos poços onde estão representados por C- (controlos negativos), colocar 5  $\mu$ L de água sem nucleases;
- 12) Fechar os poços C- com uma tampa;
- 13) Cobrir a placa e transferi-la para a câmara de amostras;
- 14) Coloque na câmara de amostras, as amostras a analisar num suporte frio. Se estiverem congeladas, descongele e quando descongelar com auxílio da pipeta, pipete e liberte a amostra dentro do tubo para homogeneizar;
- 15) Transfira 18  $\mu$ L de cada amostra e coloque numa tira de 8 tubos PCR. Identifique todos os tubos com a letra da respetiva amostra de acordo com a ordem de trabalho – confirmar com o supervisor a etiquetagem e o número de amostra;

- 16) Com a ajuda da multicanal, a partir das tiras com amostras, pipete, cuidadosamente, 5  $\mu$ L de amostra e coloque nos respetivos poços da placa;



*Figura 12 – Representação da distribuição de amostras na placa de PCR, onde é possível observar os controlos negativos tapados com tampas de proteção.*

- 17) No final de todas as amostras colocadas, descongele os controlos positivos (C+) humano e viral. Depois destes descongelados pipete, cuidadosamente, 5  $\mu$ L e coloque nos devidos poços;
- 18) Depois de todos os poços preenchidos, remova, cuidadosamente as tampas dos C- (controlos negativos), e coloque um selo ótico;
- 19) Centrifugue a placa por 30 segundos;
- 20) Colocar a placa no aparelho de RealTime PCR, e correr o programa.<sup>3</sup>
- 21) Desinfecção do local de trabalho (subcapítulo 8.1)

---

<sup>3</sup> Informações detalhadas no subcapítulo 8.2

### 8.1. Desinfecção do local de trabalho

Depois de iniciar a análise no RT-qPCR, deve-se preparar as câmaras e o restante espaço para realizar outro ciclo de amostras. Para isso deve:

- 1) O operador deve manter regras de higiene e descartar luvas usadas na preparação de amostras anterior;
- 2) Verificar se todos os reagentes foram armazenados no local definido;
- 3) Todo o material usado dentro das Câmara é descartado (tubos de roscas, *ependorfs*, etc);
- 4) Limpar as Câmara e todo o material dentro desta, com *RNase cleaner* seguido de Etanol 70%;
- 5) Fechar a Câmara e coloque os UV's por 30 minutos;
- 6) Todas as bancadas devem ser desinfetadas com *RNase cleaner* e Etanol 70%.

#### 8.1.1.1. Preparação de Etanol 70% (preparação para 1 L)

- 1) Adicionar num recipiente 300 mL de água destilada;
- 2) Adicionar 700 mL de Etanol a 99,5 %

### 8.2. Programação do aparelho RealLine

O software de controlo do aparelho de Realtime PCR utilizado é o RealTime PCR, versão 7.9, de 12 de março de 2020. O equipamento utilizado é o RealLine 96-5 da Bioron Diagnostics GmbH. Para executar o programa da reação de RT-qPCR, deve seguir-se os seguintes passos:

- 1) Selecionado o operador que estiver a utilizar, e carregar em **“Device Operation”** (Figura 13);

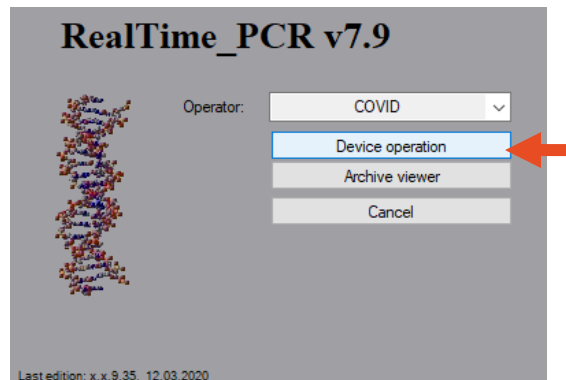


Figura 13 – Selecionar “Device operation” para iniciar o programa

- 2) Depois de selecionado o operador, verificar no fundo do programa o equipamento se encontra conectado (**Device is ON**). Caso não se encontre verificar no capítulo 8.2.3
- 3) Inicia-se o procedimento adicionando os testes a serem analisados e a quantidade de amostras a analisar selecionando-se em **“Add Teste”** (Figura 14). Caso não tenha testes criados verificar capítulo 8.2.5;

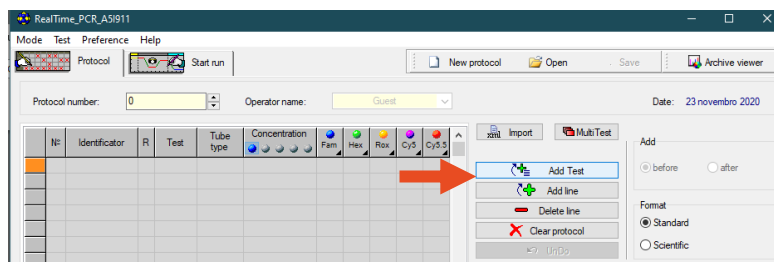
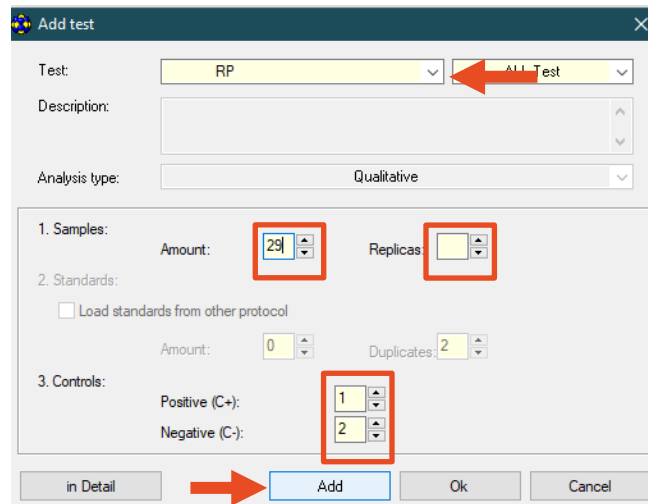


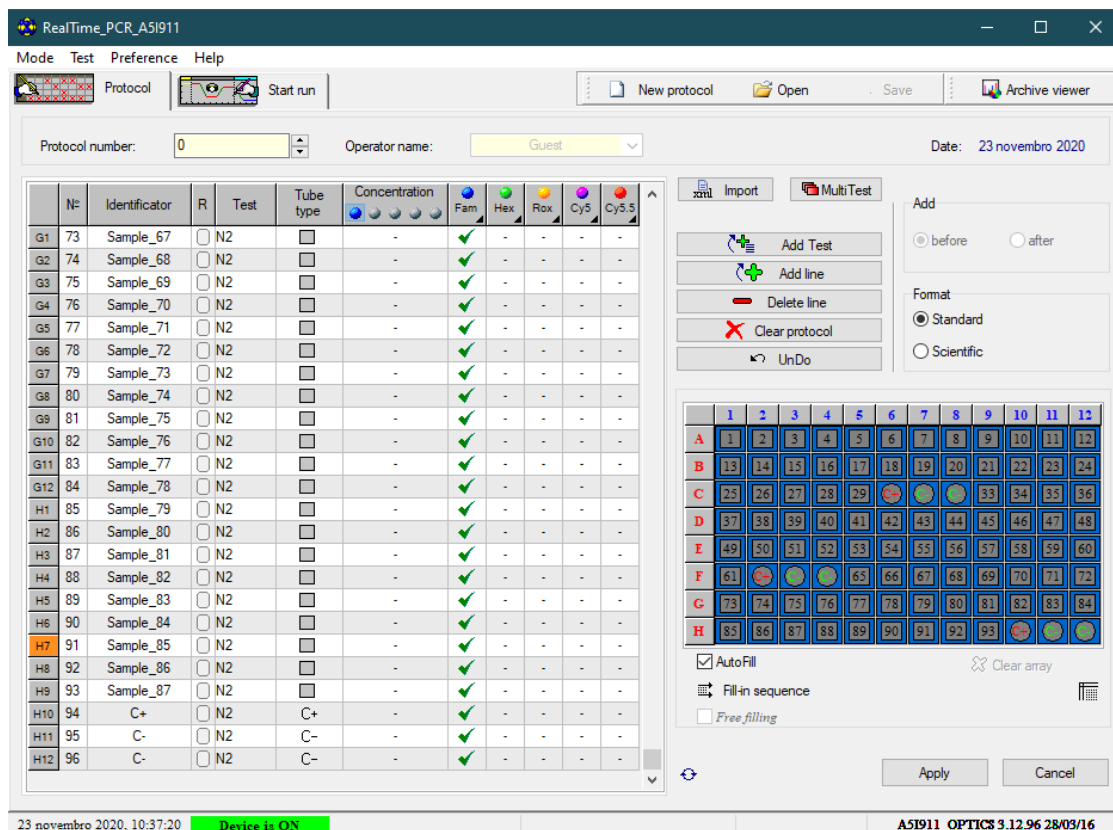
Figura 14 – Adicionar testes para iniciar corrida do programa

- 4) Surgirá uma janela, onde seleciona-se o teste que se pretende, a quantidade de amostras a analisar, as suas replicas e os controlos (negativo e positivo) representados na Figura 15;



**Figura 15 – Adicionar teste, definindo número de amostras, replicas e controlos**

- 5) Para cada teste que se pretende adicionar, carregar em **“Add”**. Quando adicionar todos os testes pretendidos seleccionar **“Ok”**;
- 6) Quando seleccionar **“Ok”** o programa automaticamente executa um rearranjo das amostras pelos poços da placa de RT-qPCR e dá um nome a cada amostra (Figura 16);



**Figura 16 – Representação das amostras dos testes adicionados**

## Procedimento Operacional Padrão e Avaliação de Risco do IPS COVID LAB

- 7) Para alterar o nome das amostras, basta carregar por cima do nome pré-definido, e escrever o nome desejado. Para alterar o rearranjo desselecionar **“AutoFill”**, selecionar **“Clear array”** e seguidamente de **“Free filling”**. Depois de selecionado, coloca-se a amostra no poço pretendido, como exemplificado na Figura 17;

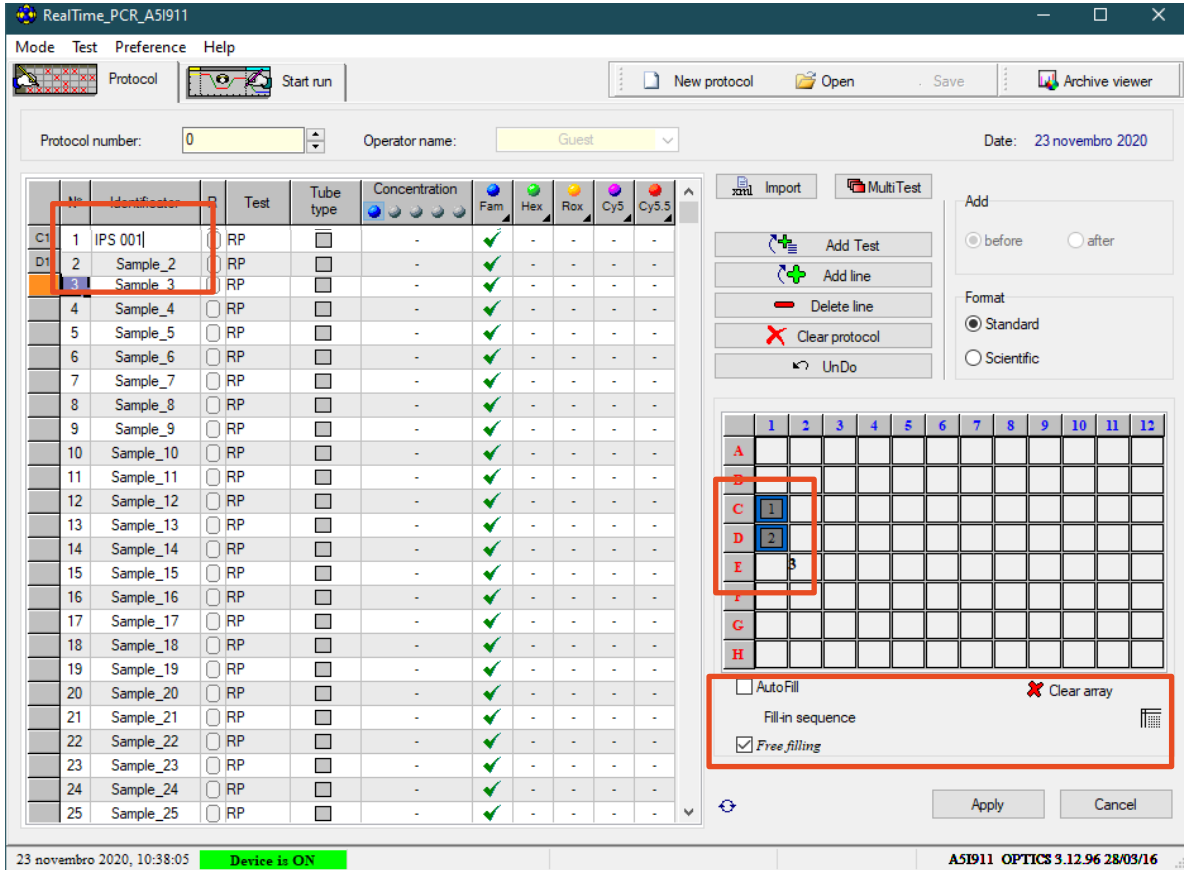


Figura 17 – Organização das amostras de cada teste adicionadas e renomeação de amostras

- 8) Quando tudo estiver preparado para a corrida, carregue em **“Apply”** (Figura 18);

## Procedimento Operacional Padrão e Avaliação de Risco do IPS COVID LAB

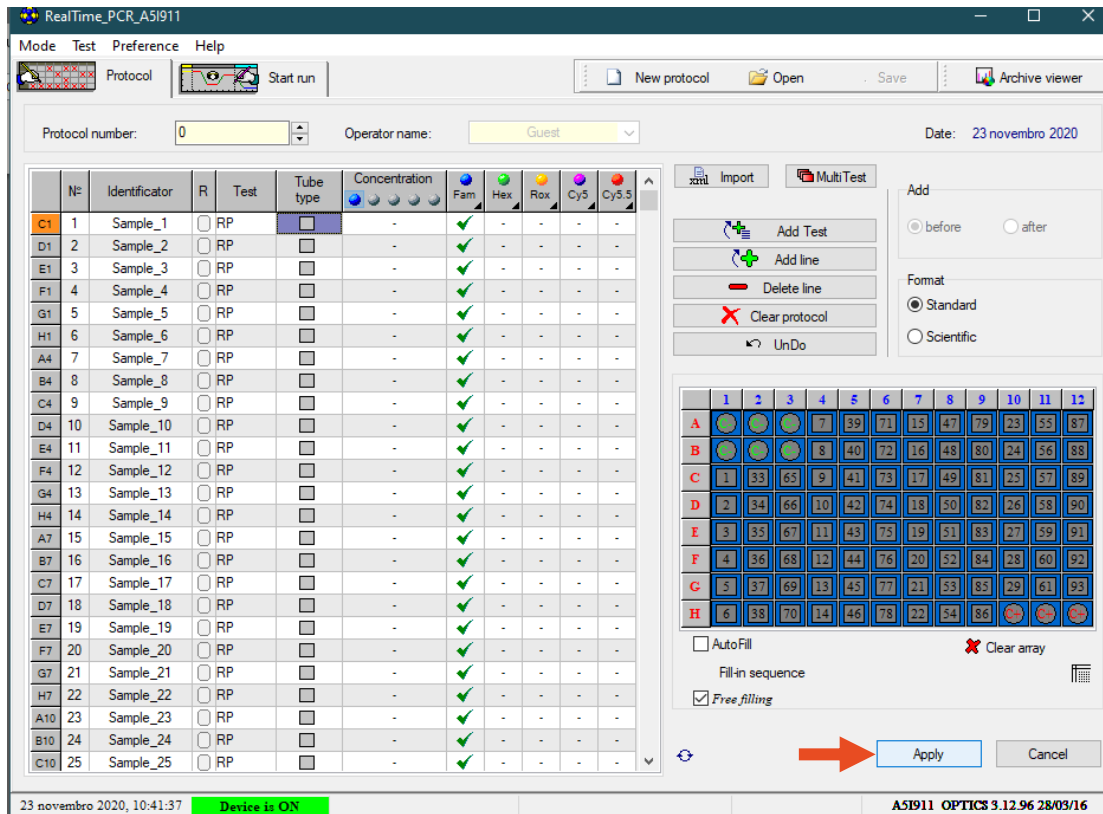


Figura 18 – Finalização da distribuição das amostras

- 9) Seguidamente no separador “Start run”, verificar se todos os valores inseridos estão corretos e seleccione na opção “Start run” para decorrer o programa (Figura 19);

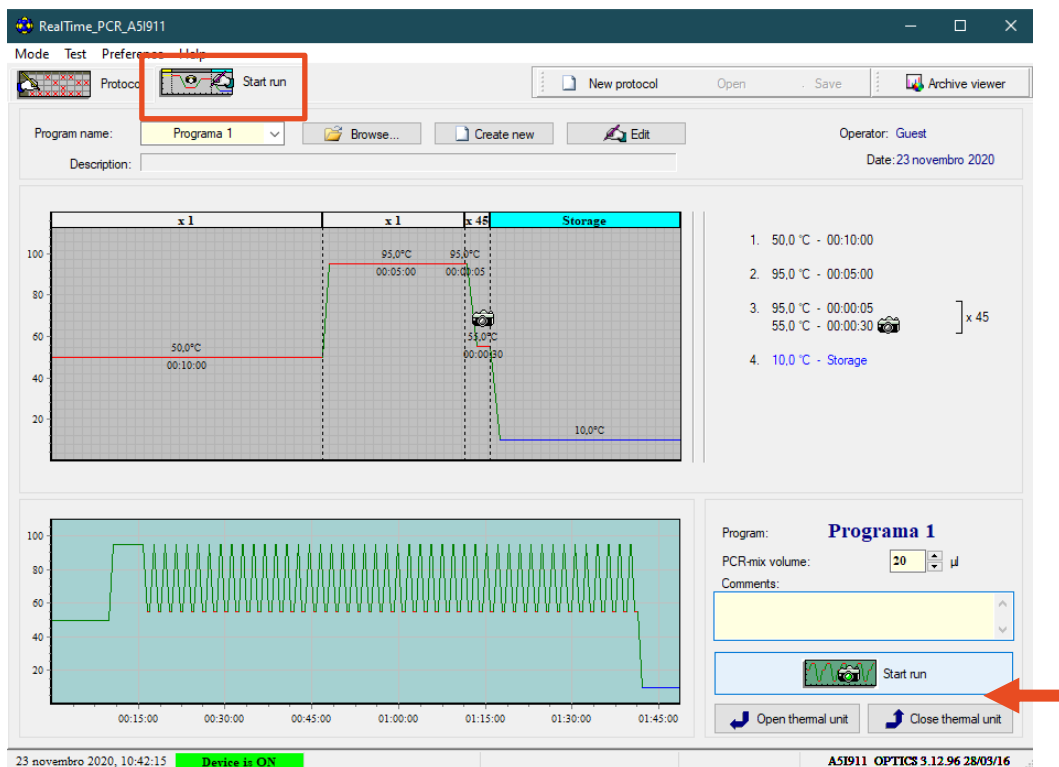


Figura 19 – Confirmação de critérios e iniciar a corrida

## Procedimento Operacional Padrão e Avaliação de Risco do IPS COVID LAB

10) A corrida, com o programa inserido, ocorre durante aproximadamente 1H30, e durante a mesma, observa-se o crescimento das curvas (Figura 20);

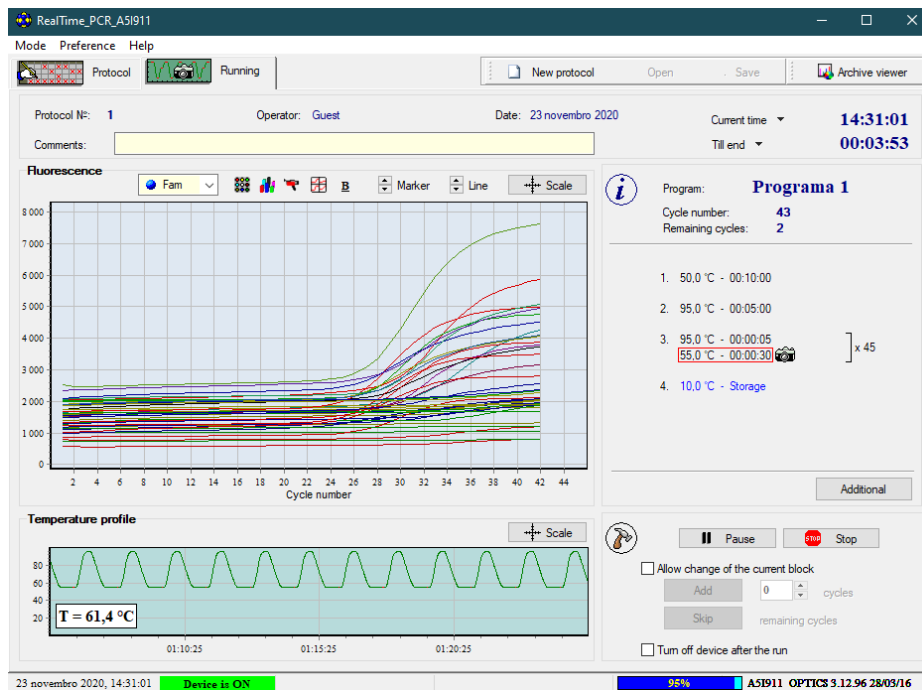


Figura 20 – Representação da corrida, antes desta terminar

11) No final da corrida, o programa emite o resultado de cada amostra da seguinte forma (Figura 21):

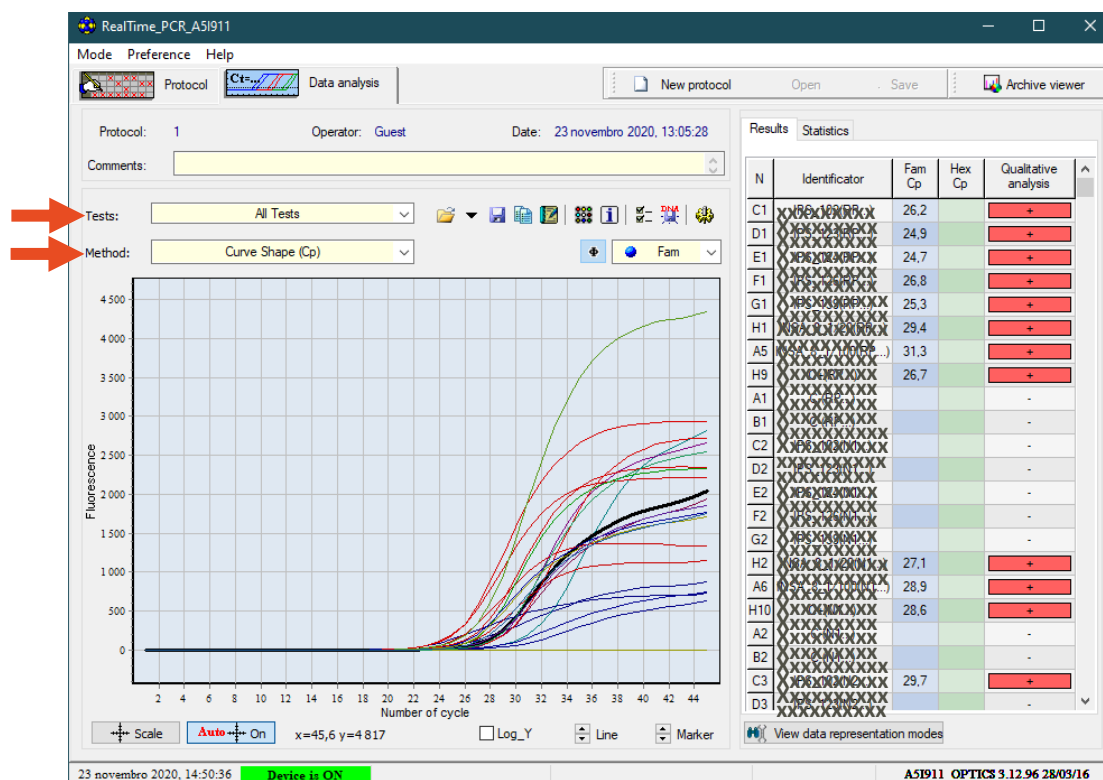

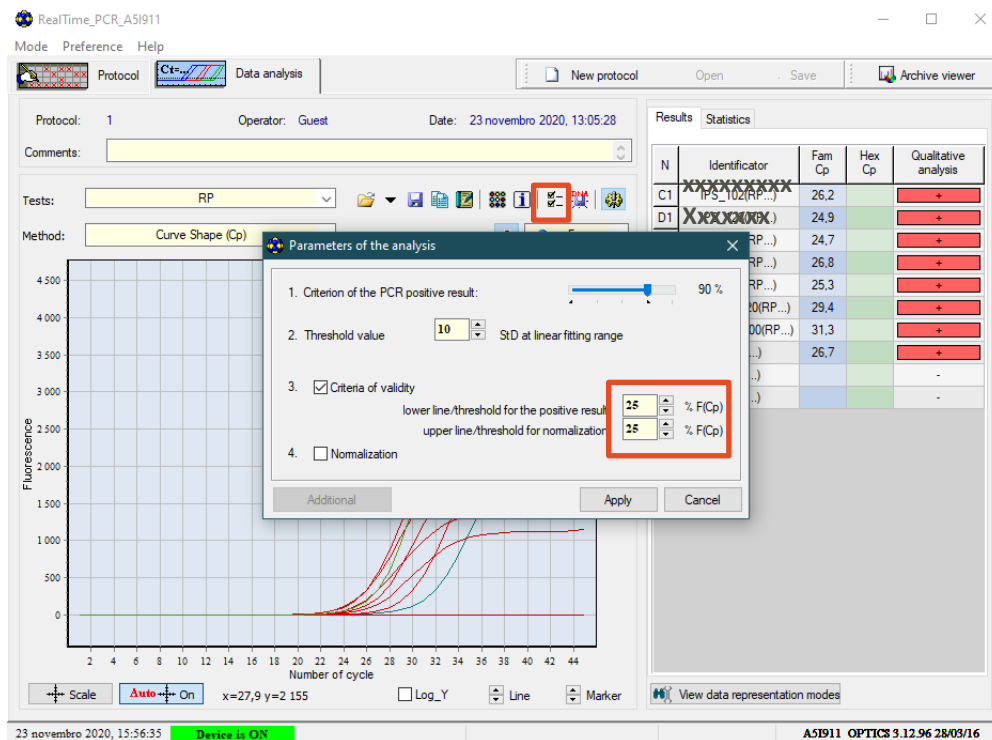
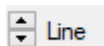
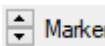





Figura 21 – Representação dos resultados da corrida

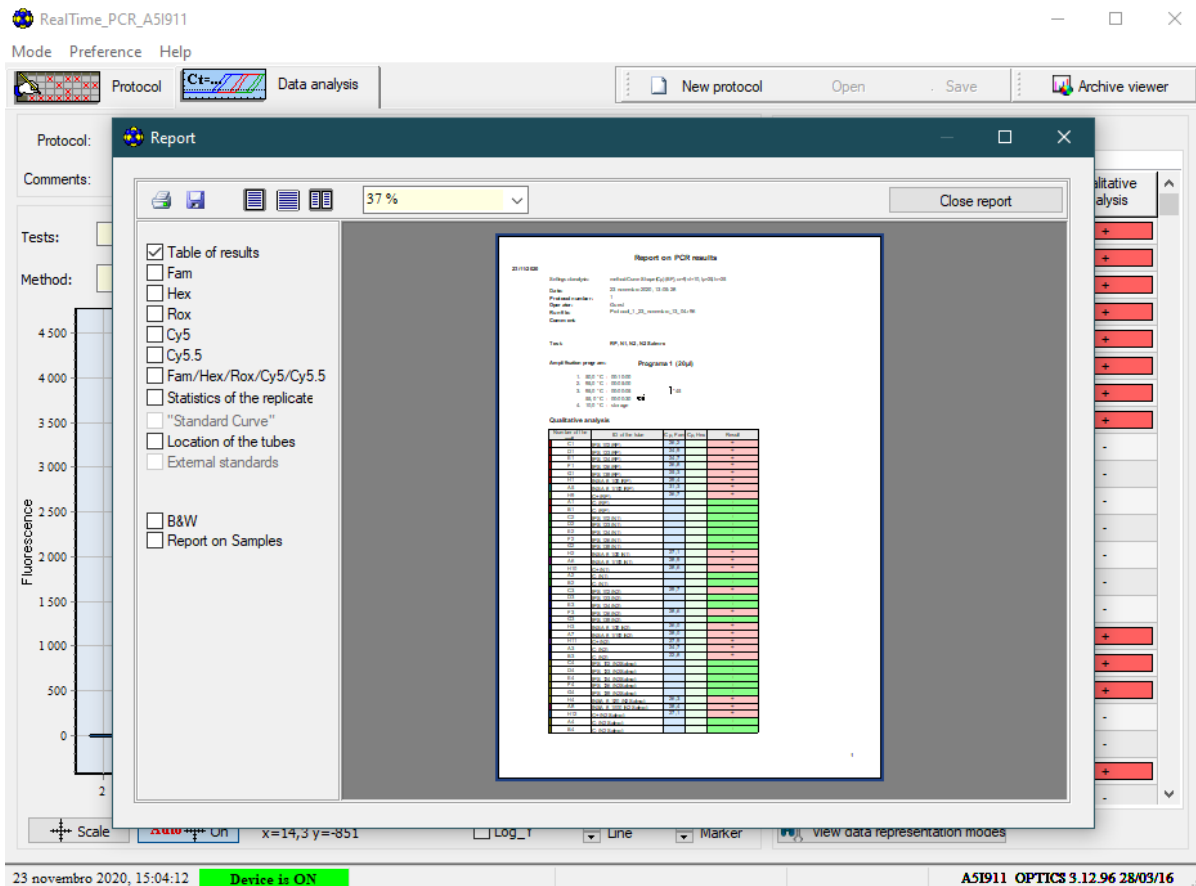
- 12) Para tratar estes resultados, o operador pode selecionar **“Tests”** e escolher se analisar-se os resultados todos juntos, ou um teste de cada vez. Também é possível em **“Method”** selecionar o método de curvas que pretende observar (Figura 21);
- 13) Selecionando , consegue-se alterar os parâmetros de análise, e definir valores onde é considerado detetável uma amostra positiva. Neste caso considera-se um intervalo ente 15 a 25 % F(Cp) no *lower* e *upper line* (Figura 22);



**Figura 22 – criação de critérios de validação de amostras**

- 14) Para melhor visualização dos  resultados através das curvas apresentadas, pode-se aumentar a  grossura da linha em e se preferir que as linhas apresentem um  marcador, selecionem em 
- 15) No final, para exportar os resultados da corrida, seleciona-se  para obter um documento .pdf ou .docx (Figura 23);

## Procedimento Operacional Padrão e Avaliação de Risco do IPS COVID LAB



**Figura 23 – Representação do ficheiro exportado do programa com os resultados das amostras**

- 16) Os resultados quando exportados devem ser colocados na pasta “resultados”, com o nome **AAAA\_MM\_DD\_PCR0X\_YYHZZ**, (onde AAAA é o ano, MM o mês, DD o dia, X o número do PCR realizado no dia, YY a hora e ZZ os minutos a que essa reação aconteceu)
- 17) Depois de avaliados os resultados as amostras são classificadas como (Tabela 12):

**Tabela 12 – Análise dos resultados obtidos e respetivos resultados**

Resultado	Amostra			Controlos Negativos			Controlos Positivos		
	RP	N1	N2	RP	N1	N2	RP	N1	N2
<b>Detetado</b>	+	+	+	-	-	-	+	+	+
<b>Não Detetado</b>	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<b>Inconclusivo</b>	+	Um destes + e outro -		-	-	-	+	+	+
	-	-		-	-	-	+	+	+
		+	*						
		Um destes + e outro -		-	-	-	+	+	+
	- ou +			Pelo menos um é +			+	+	+
				-	-	-	Pelo menos um é -		

\* Poderia-se considerar, mediante o resultado obtido, positivo para a presença de SARS-CoV-2

### 8.2.1. Limpeza do Equipamento

Todos os equipamentos necessitam de manutenção, e o real time não é exceção. O fornecedor recomenda que ao fim de 20 corridas, seja realizada uma limpeza das cavidades do bloco térmico onde é colocada a placa de PCR. Esta é feita utilizando algodão humedecido (utilizou-se zaragatoas) com etanol a 96% ou álcool isopropílico 100%.

Apesar de o fornecedor recomendar depois de 20 corridas, deve-se ter um sentido crítico nos resultados apresentados, pois podem indicar que o aparelho necessite de uma limpeza antes das 20 corridas.

### 8.2.2. Criação de novo Operador

Para criação de um novo operador basta selecionar **“Add operator”** e definir o novo nome. (Figura 24);

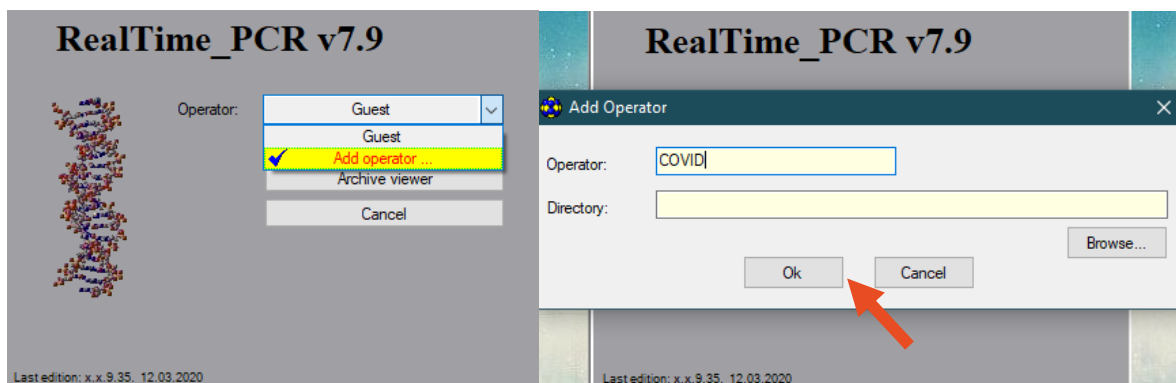


Figura 24 - Selecionar operador e /ou criar um novo.

Quando cria um novo operador, cria um operador em branco, onde não terá memória de testes criados, tendo que os criar novamente (capítulo 8.2.5)

### 8.2.3. Conectar equipamento a um novo computador

Quando ligar-se a máquina a um novo computador, irá aparecer a lista de dispositivos disponíveis a conectar. Deverá selecionar o A51911 como demonstrado na Figura 25;

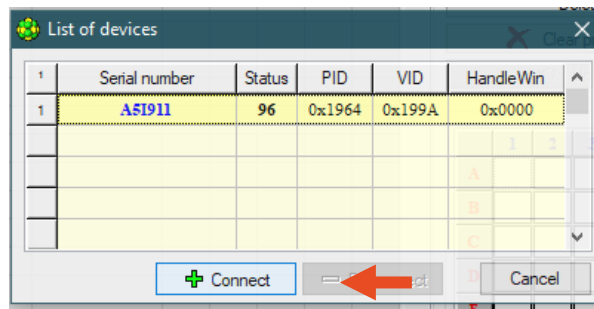


Figura 25 – Conectar o RT-PCR ao computador

Depois de conectado, aparecerá no inferior do ecrã dizendo **Device is ON**

### 8.2.4. Calibração do equipamento

Quando um equipamento muda de computador ou muda o tipo de placas ou tubos de PCR inseridos no mesmo, deve-se calibrar o equipamento. Desse modo deve primeiramente inserir-se no aparelho a placa ou tubos de PCR e calibrar a altura do tubo, selecionando **“Preference”**, seguido de **“Device Diagnostic”** e **“Measure height of the tube”** (Figura 26).

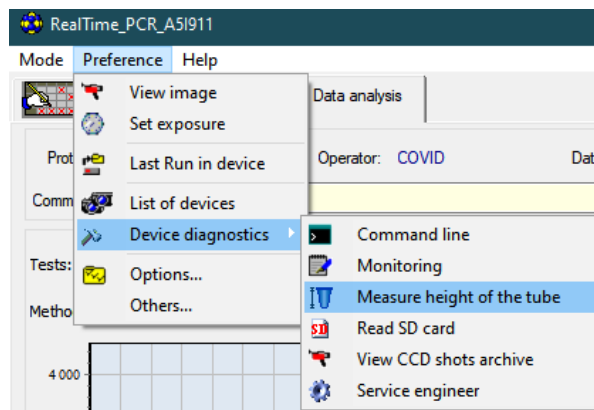
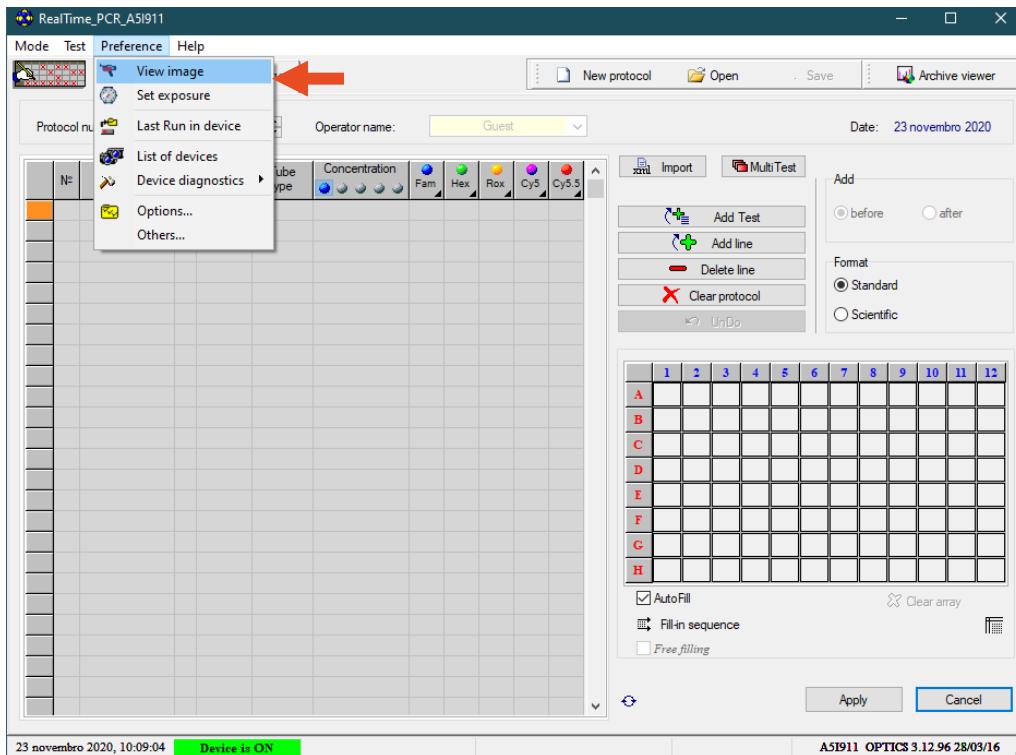


Figura 26 – Medição da altura dos tubos

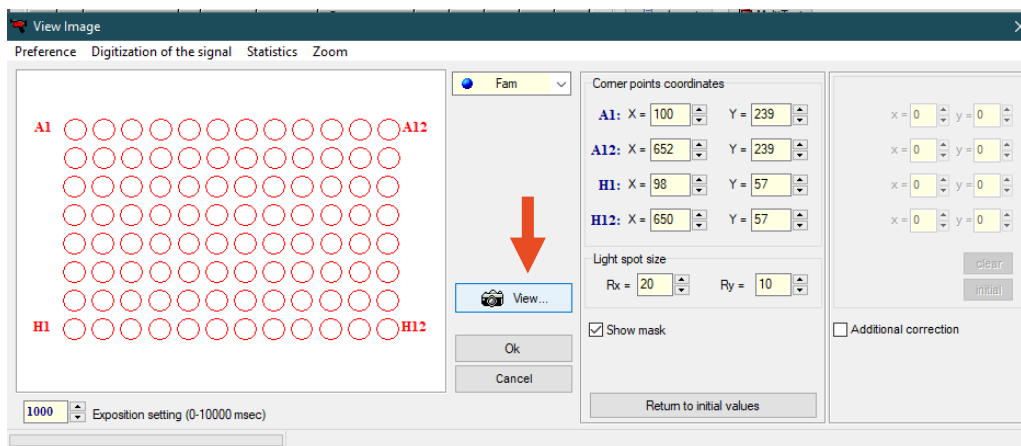
Este processo pode demorar alguns minutos.

Depois de calibrar, verifica-se o campo de visão do equipamento selecionando **“Preferences”** carregar **“View image”** (Figura 27).



**Figura 27 – Comando para calibração do aparelho a placa de PCR utilizada**

Ao abrir a janela representada na figura 8, carregar no botão **“View”** na Figura 28, para verificar se o esquema a vermelho, representa realmente onde estão os orifícios da placa de PCR.



**Figura 28 – Modelo de calibração dos poços no RT-PCR**

Ao selecionar, verifica-se, como representado na Figura 29, se o esquema representa através das sombras, a placa ou os tubos inseridos na máquina. Caso não represente, altere as coordenadas no **“Corner points coordinates”**.

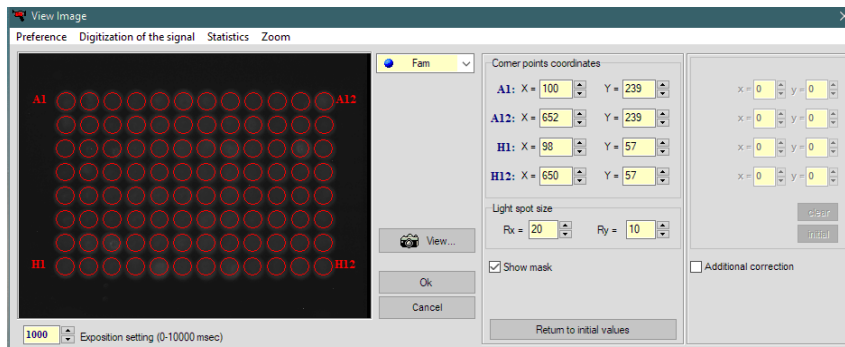


Figura 29 – visualização da compatibilidade dos poços da placa, com os círculos vermelhos do programa

## 8.2.5. Criação de Testes

Para criarem-se testes novos, seleciona-se em “**Create/Edit Teste**” (Figura 30);

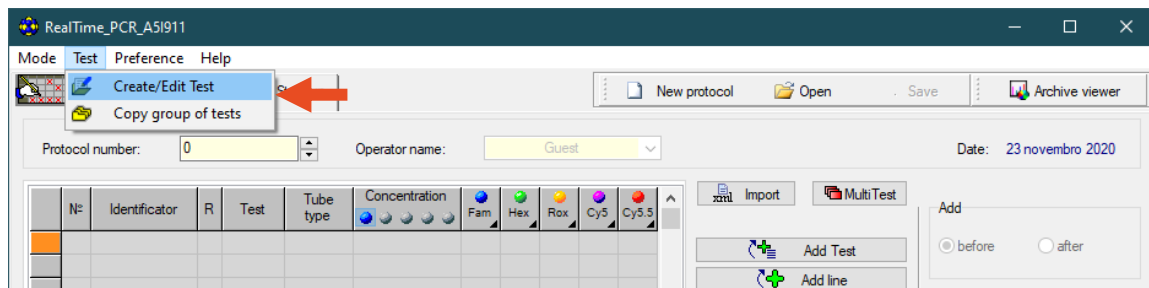


Figura 30 – Comando para criar ou editar testes

Ao abrir a janela, carregar em “**Create a new teste**”, e inserir o nome que queremos dar ao teste, e definir se é um “**multiteste**” ou não. No fim carregar “**Ok**” para concluir (Figura 31);

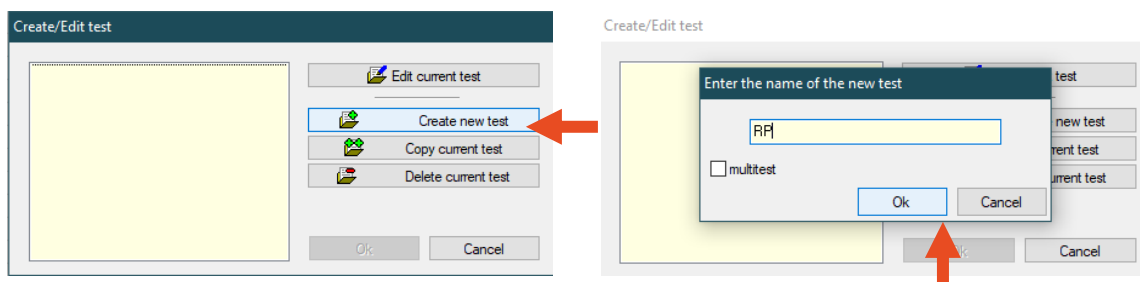


Figura 31 – Tipo de teste a criar

Ao carregar em “**Ok**” abrir-se-á uma nova janela, onde se define as características do teste (Figura 32);

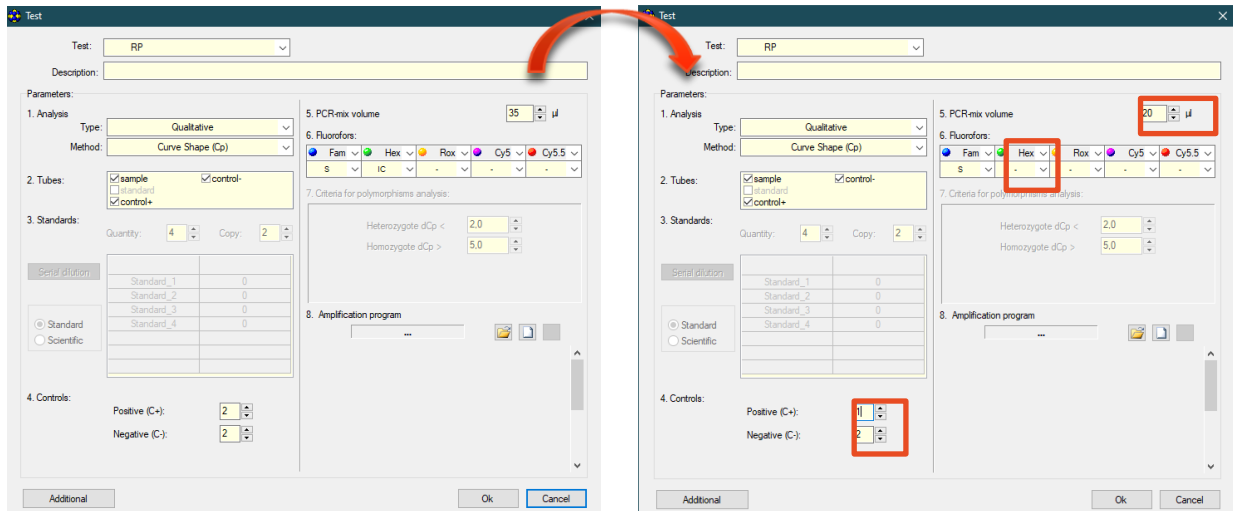


Figura 32 – Características do teste criado

Define-se todas as características que se pretende até ao ponto 7 e no ponto 8 “**Amplification program**” seleciona-se o ícone pasta, podendo selecionar um programa já criado anteriormente. Caso não tenha programa criado, verifique o capítulo seguinte.

## 8.2.6. Criação de programa de amplificação

Para criação de um novo programa, seleciona-se no ícone da folha branca, representado na Figura 32 criando um programa. Na criação deste, irá abrir-se uma janela onde é definido o template a usar, e as especificações. Neste caso, selecionou-se em “**Standby mode**” para quando a corrida acabar, manter as amostras armazenadas a uma temperatura estável (Figura 33);

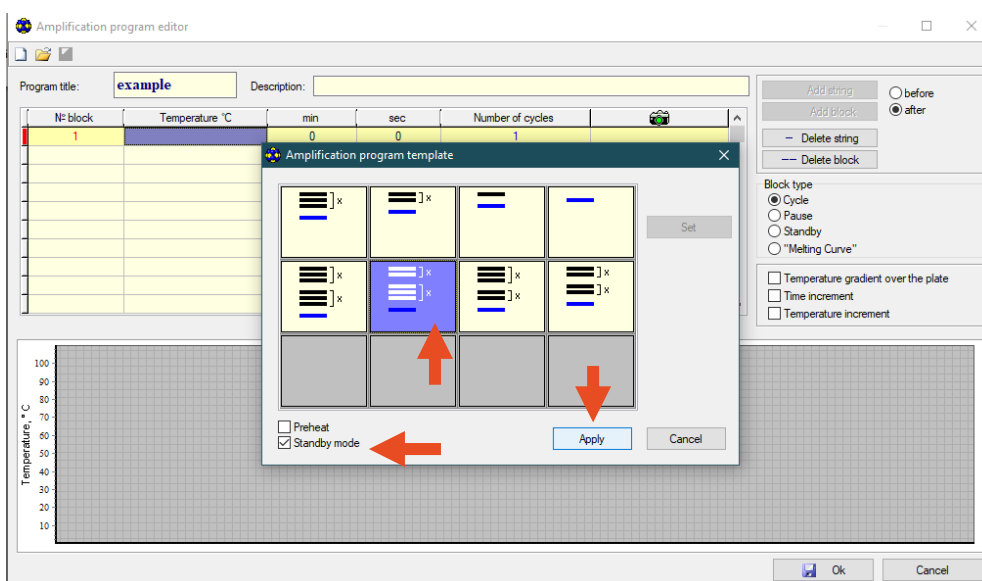


Figura 33 – Criação do programa de amplificação do RT-PCR

## Procedimento Operacional Padrão e Avaliação de Risco do IPS COVID LAB

Selecione em **“Apply”** abrirá uma nova janela onde podemos adicionar ao template as temperaturas específicas e o tempo da reação referidos em 6, adicionar mais ciclos em **“++Add block”**, selecionar em quais dos ciclos queremos observar a fluorescência na coluna da Câmara fotográfica, etc. Quando todas as alterações forem feitas, carregar em **“Ok”** (Figura 34);

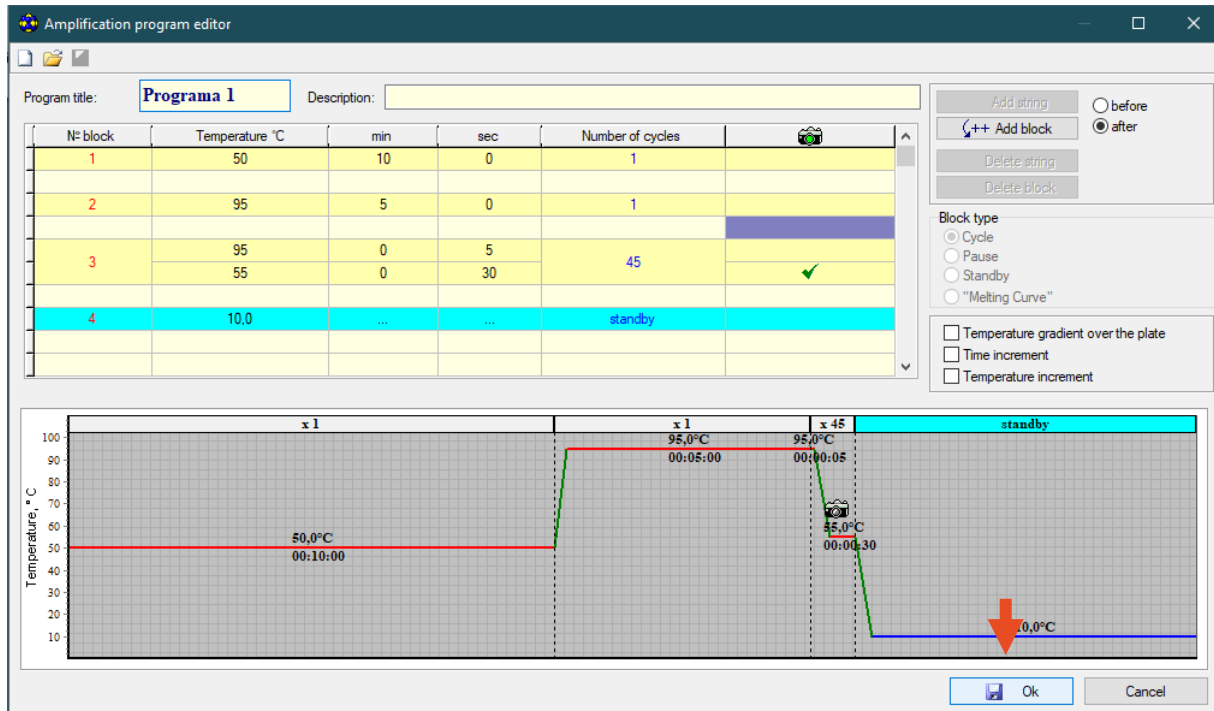


Figura 34 – Programação dos números de ciclos e as suas respectivas temperaturas

Guardado o programa de amplificação, pode-se salvar o teste criado, carregando no **“Ok”** (Figura 35);

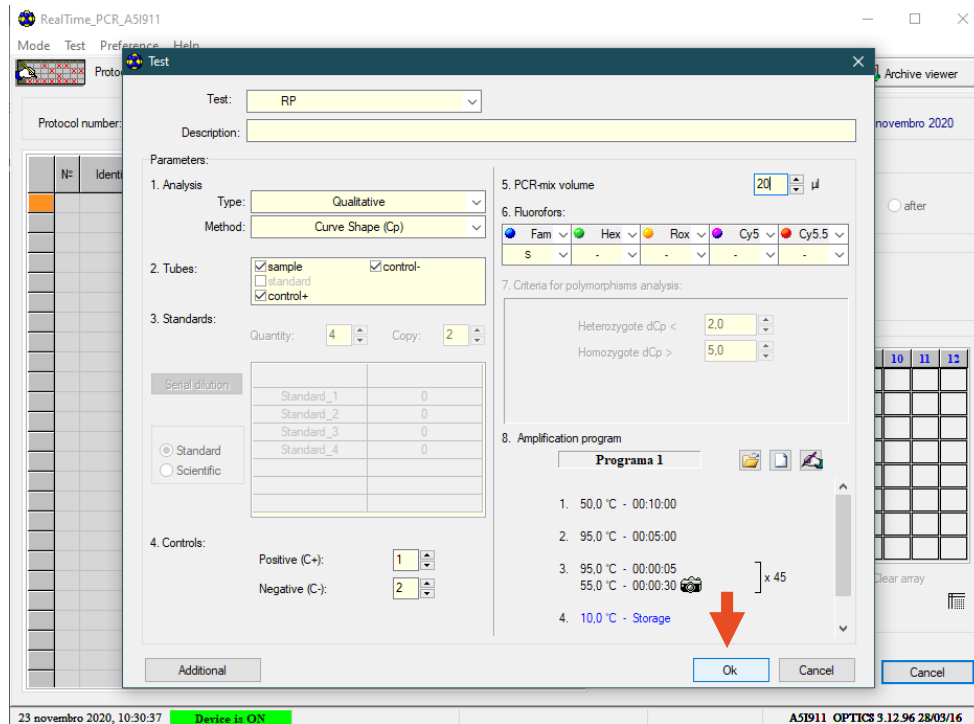




Figura 35 – Conclusão da criação do teste

Podem ser criados o número de testes que forem necessários.

## 8.2.7. Deteção Multiplex

Em casos em que se utilize uma deteção multiplex, para visualizar os resultados, é necessário primeiramente dizer ao programa que se pretende observar resultados multiplex. Para isso basta seleccionar , seguido de  e carregar em Multiplex detection (Figura 36).

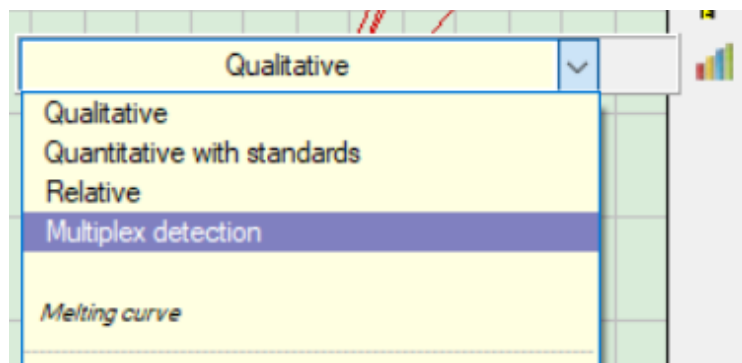





Figura 36 - Selecionar modo de deteção Multiplex

Desta forma, os resultados apresentam todos os canais de fluorescência com o respetivo cp, de forma mais clara, como representado na Figura 37.

Results						
Multiplex detection						
N	Identificator	Fam Cp	Hex Cp	Rox Cp	Cy5 Cp	Cy5.5 Cp
C1	Sample_1		29,0			
D1	Sample_2		29,5			
E1	Sample_3		28,6			
F1	Sample_4		29,1			
G1	C+		28,8			
A1	C-		37,2			
B1	C-					

Figura 37 - Representação dos resultados emitidos quando selecionado detecção multiplex

### 8.2.8. Opções para tratamento de resultados

Para se tratarem os resultados, pode-se utilizar várias características que o programa usufrui. Uma delas é conseguir-se selecionar o teste e as amostras que se pretende observar, mesmo que existam outras na reação. Para isso Seleciona-se , seguido de  e de , selecionado o que se pretende observar (Figura 38), facilitando assim a sua visualização.

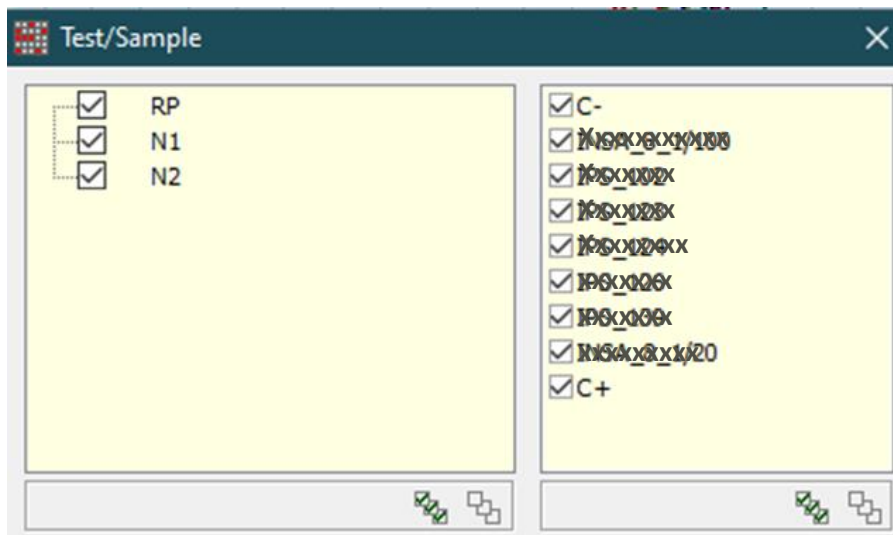



Figura 38 – Escolha de resultados a visualizar

Outra das opções de visualização, é a alteração de cores correspondentes as amostras, facilitando visualmente a sua observação. Para isto basta selecionar o poço e a cor correspondente no comando  (Figura 39).

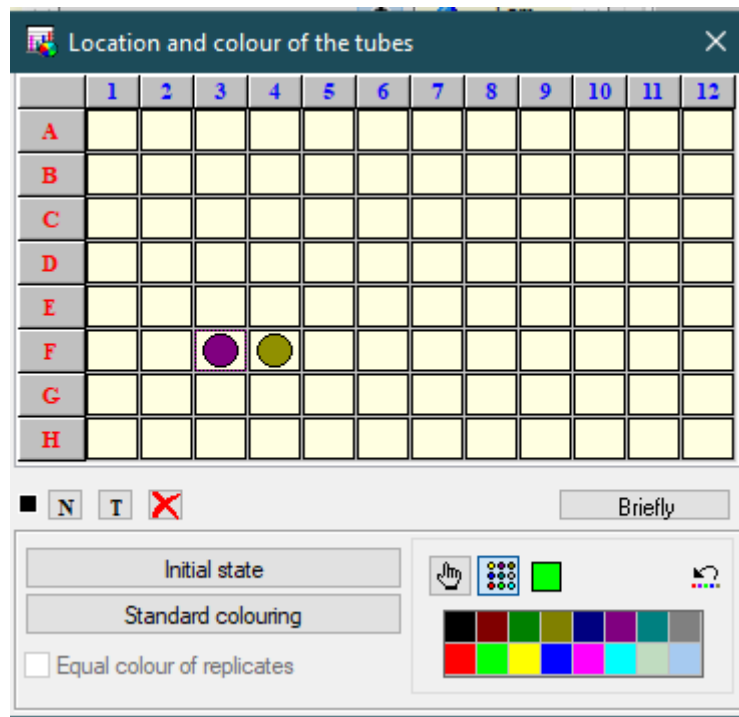


Figura 39 – Alteração da cor da amostra presente em cada poço da placa de PCR

Também é possível observar os resultados obtidos em cada poço, demonstrando verde ou vermelho para cada tipo de resultado (negativo ou positivo). Para isto basta selecionar , seguido de e de . (Figura 40)

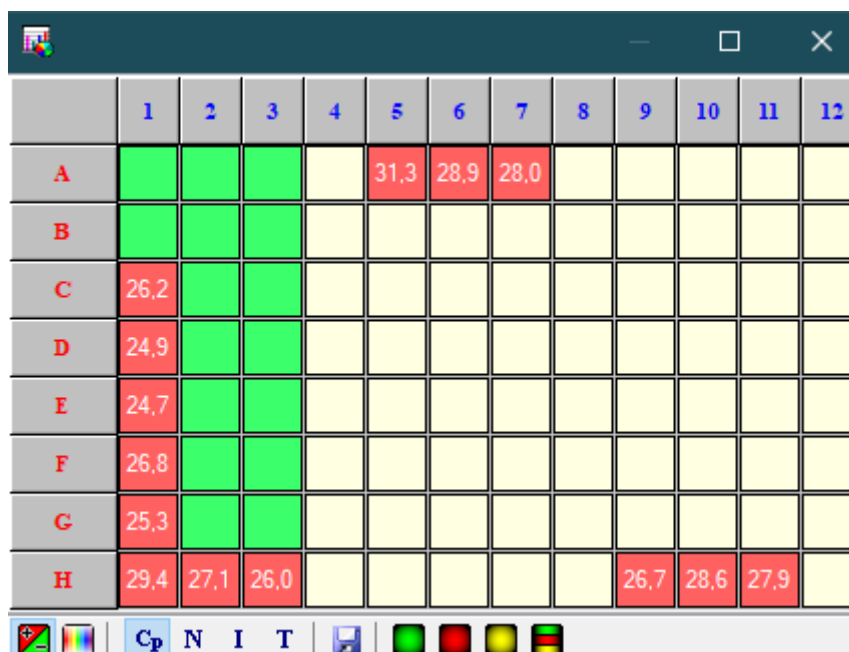


Figura 40 – Tradução de resultados no formato da placa de PCR

Existem outras ferramentas que podem ser utilizadas, mas até ao momento no decorrer de emissão de análises no IPS COVID LAB não foram necessárias utilizar.

## 9. Anexos

### 9.1. Anexo 1 – Informações dos Operadores e Supervisores



IPS COVID LAB

### Sala RT-qPCR

#### Checklist do Operador/Supervisor

##### Primeira Tarefa do Dia

- Preparar as checklist necessárias para cada sala;
- Ligar os UV's da Sala de PCR 30 minutos;
- Ligar os equipamentos necessários.

##### Última Tarefa do Dia

- Repor o material necessário para o dia seguinte;
- Remover para um saco de autoclave o material descartado na caixa do lixo;
- Remover o lixo não necessário;
- Remover todos os buffers e soluções;
- Limpar a câmara de Biossegurança de Processamento de Amostras, com Etanol a 70% e RNase no papel;
- Fechar a câmara e ligar os UV (30 min.);
- Desligar centrífuga;
- Desligar placa de aquecimento.

9.2. Anexo 2 – Informações das checklists – Operador/Supervisor



IPS COVID LAB

SALA RT-qPCR

Informações de supervisão com Checklists

Data	Hora	Tarefa	Operador	Supervisor
		Câmara Mistura		
		Câmara Amostra		
		Câmara Mistura		
		Câmara Amostra		
		Câmara Mistura		
		Câmara Amostra		
		Câmara Mistura		
		Câmara Amostra		
		Câmara Mistura		
		Câmara Amostra		
		Câmara Mistura		
		Câmara Amostra		
		Câmara Mistura		
		Câmara Amostra		
		Câmara Mistura		
		Câmara Amostra		
		Câmara Mistura		
		Câmara Amostra		
		Câmara Mistura		
		Câmara Amostra		
		Câmara Mistura		
		Câmara Amostra		
		Câmara Mistura		
		Câmara Amostra		
		Câmara Mistura		
		Câmara Amostra		
		Câmara Mistura		
		Câmara Amostra		

9.3. Anexo 3 – Checklists sala de RT-qPCR – Câmara de Mistura



IPS COVID LAB

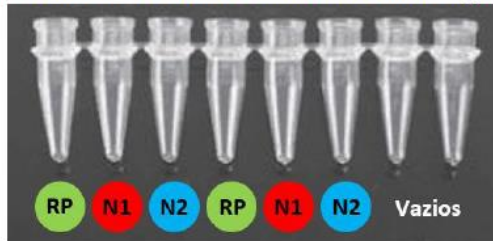
Sala de RT-qPCR

Câmara de Mistura – PCR

- 1)  Descongelar as alíquotas que contêm os primers e sondas dos genes de interesse, as alíquotas de One-step RT-qPCR Master Mix 2x e as alíquotas de água sem nucleasse. **Manter no bloco frio durante a preparação e no seu uso;**
- 2)  Rotular um *ependorf* de 1,5 mL para cada conjunto de primers / sondas;
- 3) Adicionar a cada tubo os seguintes reagentes pela ordem descrita:

Reagentes		RP		N1		N2
Água sem nucleases	<input type="checkbox"/>	147,2 µL	<input type="checkbox"/>	147,2 µL	<input type="checkbox"/>	110,4 µL
One step RT-qPCR Master Mix 2X	<input type="checkbox"/>	368 µL	<input type="checkbox"/>	368 µL	<input type="checkbox"/>	368 µL
DNA Salmão		0 µL			<input type="checkbox"/>	36,8 µL
Mix de Primers e Sondas	<input type="checkbox"/>	36,8 µL	<input type="checkbox"/>	36,8 µL	<input type="checkbox"/>	36,8 µL

- 4)  Depois de feitas todas as mix, agitar para cima e para baixo
- 5)  Colocar 276 µL de cada mix numa linha de 8 tubos PCR da seguinte maneira:



- 6)  Instalar uma placa de PCR num suporte de 96 poços;
- 7)  Distribuir 15 µL de cada mistura principal nos poços como representado seguidamente:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
B	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
C	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
D	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
E	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
F	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
G	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
H	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

- 8) Adicionar 5 µL de água sem nucleasse nos poços (cobrir os mesmos com tampas):  
 A1  A2  A3  B1  B2  B3
- 9)  Cobrir toda a placa de reação e transferi-la para a câmara de amostras.

Data

IPS COVID LAB

Responsável

9.4. Anexo 4 – Checklists sala de RT-qPCR – Câmara de Amostra



IPS COVID LAB

**Câmara de Amostra – PCR**

- 1)  Coloque na câmara de amostras, as amostras a analisar num suporte frio. Se estiverem congeladas, descongele e quando descongelar com auxílio da pipeta, pipete e liberte a amostra dentro do tubo para homogeneizar;
- 2)  Transferir **18 µl** de amostras de **RNA** para tiras de **8 tubos de PCR** ;
- 3)  Colocar a placa de PCR num suporte frio
- 4)  Com a ajuda da multicanal, a partir das tiras com amostras [2]), pipete, cuidadosamente, 5 µL de amostra e coloque nos respetivamente:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-			G <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	O <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	W <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
B	-			H <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	P <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	X <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
C	A <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	I <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Q <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Y <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
D	B <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	J <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	R <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Z <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
E	C <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	AA <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
F	D <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	L <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	T <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	AB <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
G	E <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	M <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	U <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	AC <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
H	F <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	N <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	V <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	C+ <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

- 5)  Descongele os controlos positivos (C+) humano e viral. Depois destes descongelados pipete, cuidadosamente, 5 µL e coloque nos devidos poços;
- 6)  Remova, cuidadosamente as tampas dos C- (controlos negativos)
- 7)  Coloque um selo ótico na placa de PCR
- 8)  Centrifugue a placa por 30 segundos;
- 9)  Coloque a placa no PCR.

Data

IPS COVID LAB

Responsável

9.5. Anexo 5 – Tabela para preparação das mixes consoante nº de amostras

	1X	4X + 15%	5X + 15%	6X + 15%	7X + 15%	8X + 15%	9X + 15%	10X + 15%	11X + 15%	12X + 15%	
		<b>RP e N1</b>									
H <sub>2</sub> O	4 µL	18,4 µL	23 µL	27,6 µL	32,2 µL	36,8 µL	41,4 µL	46 µL	50,6 µL	55,2 µL	
Taq 2X	10 µL	46 µL	57,5 µL	69 µL	80,5 µL	92 µL	103,5 µL	115 µL	126,5 µL	138 µL	
PP	1 µL	4,6 µL	5,75 µL	6,9 µL	8,05 µL	9,2 µL	10,35 µL	11,5 µL	12,65 µL	13,8 µL	
		<b>N2</b>									
H <sub>2</sub> O	3 µL	13,8 µL	17,25 µL	20,7 µL	24,15 µL	27,6 µL	31,05 µL	34,5 µL	37,95 µL	41,4 µL	
Taq 2X	10 µL	46 µL	57,5 µL	69 µL	80,5 µL	92 µL	103,5 µL	115 µL	126,5 µL	138 µL	
DNA Salmão	1 µL	4,6 µL	5,75 µL	6,9 µL	8,05 µL	9,2 µL	10,35 µL	11,5 µL	12,65 µL	13,8 µL	
PP	1 µL	4,6 µL	5,75 µL	6,9 µL	8,05 µL	9,2 µL	10,35 µL	11,5 µL	12,65 µL	13,8 µL	

	13X + 15%	14X + 15%	15X + 15%	16X + 15%	17X + 15%	18X + 15%	19X + 15%	20X + 15%	21X + 15%	22X + 15%	
		<b>RP e N1</b>									
H <sub>2</sub> O	59,8 µL	64,4 µL	69 µL	73,6 µL	78,2 µL	82,8 µL	87,4 µL	92 µL	96,6 µL	101,2 µL	
Taq 2X	149,5 µL	161 µL	172,5 µL	184 µL	195,5 µL	207 µL	218,5 µL	230 µL	241,5 µL	253 µL	
PP	14,95 µL	16,1 µL	17,25 µL	18,4 µL	19,55 µL	20,7 µL	21,85 µL	23 µL	24,15 µL	25,3 µL	
		<b>N2</b>									
H <sub>2</sub> O	44,85 µL	48,3 µL	51,75 µL	55,2 µL	58,65 µL	62,1 µL	65,55 µL	69 µL	72,45 µL	75,9 µL	
Taq 2X	149,5 µL	161 µL	172,5 µL	184 µL	195,5 µL	207 µL	218,5 µL	230 µL	241,5 µL	253 µL	
DNA Salmão	14,95 µL	16,1 µL	17,25 µL	18,4 µL	19,55 µL	20,7 µL	21,85 µL	23 µL	24,15 µL	25,3 µL	
PP	14,95 µL	16,1 µL	17,25 µL	18,4 µL	19,55 µL	20,7 µL	21,85 µL	23 µL	24,15 µL	25,3 µL	

	23X + 15%	24X + 15%	25X + 15%	26X + 15%	27X + 15%	28X + 15%	29X + 15%	30X + 15%	31X + 15%	32X + 15%	
		<b>RP e N1</b>									
H <sub>2</sub> O	105,8 µL	110,4 µL	115 µL	119,6 µL	124,2 µL	128,8 µL	133,4 µL	138 µL	142,6 µL	147,2 µL	
Taq 2X	264,5 µL	276 µL	287,5 µL	299 µL	310,5 µL	322 µL	333,5 µL	345 µL	356,5 µL	368 µL	
PP	26,45 µL	27,6 µL	28,75 µL	29,9 µL	31,05 µL	32,2 µL	33,35 µL	34,5 µL	35,65 µL	36,8 µL	
		<b>N2</b>									
H <sub>2</sub> O	79,35 µL	82,8 µL	86,25 µL	89,7 µL	93,15 µL	96,6 µL	100,05 µL	103,5 µL	106,95 µL	110,4 µL	
Taq 2X	264,5 µL	276 µL	287,5 µL	299 µL	310,5 µL	322 µL	333,5 µL	345 µL	356,5 µL	368 µL	
DNA Salmão	26,45 µL	27,6 µL	28,75 µL	29,9 µL	31,05 µL	32,2 µL	33,35 µL	34,5 µL	35,65 µL	36,8 µL	
PP	26,45 µL	27,6 µL	28,75 µL	29,9 µL	31,05 µL	32,2 µL	33,35 µL	34,5 µL	35,65 µL	36,8 µL	

## 10. Referências bibliográficas

- [1] - <https://imm.medicina.ulisboa.pt/pt-pt/novo-coronavirus-sars-cov-2-perguntas-frequentes/#testes-de-diagnostico> (versão 7 de Abril de 2020)
- [2] - <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-infecciosas/covid-19/prevencao/medidas-preventivas/equipamentos-de-protecao/#sec-10>
- [3] - <https://www.nzytech.com/products-services/molecular-biology/real-time-pcr/one-step-rt-qpcr-master-mixes/mb405/>
- [4] - <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>
- [5] - 2019-nCoV CDC-qualified Probe and Primer Kits for SARS-CoV-2 | LGC Biosearch Technologies