

Trabalho laboratorial de análise por RT-qPCR

Deteção de organismo específico em amostras

A técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR) representa uma evolução significativa em relação à PCR convencional, permitindo não apenas a amplificação de ácidos nucleicos, mas também a sua quantificação em tempo real. Esta abordagem utiliza sondas fluorescentes ou corantes intercalantes para monitorizar a reação ciclo a ciclo, fornecendo dados precisos sobre a quantidade inicial de material genético. Quando aplicada a RNA, é precedida por uma etapa de transcrição reversa, convertendo RNA em cDNA, o que possibilita estudar expressão génica ou detetar agentes virais.

As vantagens da RT-qPCR incluem elevada sensibilidade, especificidade e rapidez, tornando-a indispensável em diagnóstico molecular, investigação biomédica e controlo de qualidade em biotecnologia. Além disso, a técnica permite confirmar a presença ou ausência de um organismo específico em amostras biológicas, o que é crítico para análises clínicas e ambientais. A fiabilidade dos resultados depende do cumprimento rigoroso das boas práticas laboratoriais e da utilização de controlos internos e externos, incluindo controlos positivos e negativos, que asseguram a validade da reação e a ausência de contaminação.

I. Objetivo

Executar um protocolo completo de RT-qPCR para confirmar a presença ou ausência de sequências específicas de RNA, garantindo controlo rigoroso de qualidade através de controlos positivos e negativos.

Será aplicado o protocolo de análise da presença do vírus da COVID-19, que pode ser adaptado a outros alvos, ao utilizar primers adequados e, se necessário, procedimentos de extração de DNA em vez de RNA.

A deteção da presença do vírus SARS-CoV-2 era feita com a amplificação de duas sequências alvo específicas desse vírus (designadas N1 e N2).

Como controlo de qualidade das amostras de RNA extraído, era amplificado um alvo humano – do gene da RNase P, designado por RP. Este alvo servia de controlo interno de qualidade/integridade do RNA na amostra.

II. Reagentes, materiais e equipamentos

Amostras e Kits:

- Amostras biológicas previamente inativadas.
- Kit de extração de RNA viral (ex.: NZY Viral RNA Isolation Kit).
- Kit de RT-qPCR (ex.: NZYSpeedy One-step RT-qPCR Probe Master Mix).

A. Meios e Soluções:

- - Etanol 70% (v/v),
- RNase Cleaner (spray)
- Lixívia 15% (v/v)
- DNA de salmão para estabilização em reações N2.
- Água livre de nucleases.
- Primers e sondas específicos (N1, N2, RP)

B. Equipamentos

- Câmara de biossegurança classe II.
- Duas câmaras de PCR com UV.
- Termociclador com capacidade para RT-qPCR
- centrífuga
- termobloco
- micropipetas e pontas com filtro estéreis

III. Procedimento laboratorial

Organização do Trabalho:

Área 1 Extração de RNA.

Área 2 RT-qPCR (com separação entre Câmara de Mistura e Câmara de Amostras).

A. Preparação das Amostras

Área 1 Extração de RNA.

1. Limpar tubos com lixívia 15%.
2. Transferir 1 mL da amostra para tubo de rosca.
3. Incubar a 56°C por 15 min para reinativação.

B. Extração de RNA Viral

Seguir instruções do kit NZY Viral RNA Isolation Kit:

1. Preparação inicial:

- Organizar suportes para tubos (aplicação, lavagem, secagem).
- Pré-aquecer água livre de RNases a 65 °C para eluição final.

2. Lise e ligação à coluna:

- Adicionar **350 µL da amostra + 350 µL de etanol 100%** num microtubo.
- Misturar suavemente (não usar vortex).
- Transferir **700 µL do lisado** para a coluna de extração.
- Centrifugar a **8.000 rpm por 1 min** e descartar o fluxo.

3. Lavagens:

- Adicionar **200 µL tampão NV** → centrifugar 1 min.
- Adicionar **600 µL tampão NVW** → centrifugar 1 min.
- Adicionar **300 µL tampão NVW** → centrifugar 1 min.

4. Secagem da membrana:

- Centrifugar novamente a **8.000 rpm por 2 min**.

5. Eluição do RNA:

- Transferir a coluna para um tubo limpo.
- Adicionar **60 µL de água livre de RNases** diretamente na membrana.
- Incubar 2 min e centrifugar 2 min.

6. Armazenamento:

- Transferir o eluído para caixa de transporte e armazenar a **-20 °C ou usar de imediato**.

C. Preparação da Reação RT-qPCR

1. Descongelar reagentes (Master Mix, primers/sondas, RNA) e manter em bloco frio.
2. Preparar **Master Mix** na **Câmara de Mistura**:

a. Calcular volumes para todas as reações + 15% extra, sabendo que:

- Volume final por reação: 20 µL
- Composição de uma reação (para qualquer dos 3 alvos (RP, N1 ou N2)):
 - - 10 µL Master Mix (2x).
 - - 1 µL mix primers/sondas. (varia para cada alvo: RP, N1 ou N2)
 - - 4 µL água (ou 3 µL + 1 µL DNA salmão para N2).
 - - 5 µL RNA da amostra.
- Controlos: Negativo (água) e Positivo (RNA conhecido).
- Alvos: Virais - N1 e N2, controlo de qualidade - RP.

NOTA: Prepare as contas para as 3 mastermixes considerando que terá sempre 2 controlos negativos, 1 controlo positivo para cada alvo. As mastermixes não contém o RNA de amostra, e devem ser preparadas com 15% de volume extra.

- b. Misturar suavemente os reagentes, fazer spin-dow e pipeta-los cuidadosamente para o tubo (não usar vortex).
3. Confirmar layout da placa e distribuir cada **Master Mix** na placa de PCR (ex.: 15 µL por poço) usando pipeta multicanal, se possível.
4. Adicionar a 5 µL água aos poços dos controlos negativos
5. Transferir a placa (tapada) para Câmara de Amostras:
6. Adicionar 5 µL de RNA amostra ou controlos positivos nos poços correspondentes.
7. **Selar a placa com filme ótico** usando rolo apropriado.
8. **Centrifugar rapidamente (15 s)** para eliminar bolhas e garantir que o líquido está no fundo dos poços.
9. Verificar integridade do selo antes de colocar no termociclador.

D. Programa do Termociclador

1. Colocar placa no equipamento, garantindo orientação correta.
2. Selecionar programa e identifique na placa a posição de cada alvo e dos controlos positivos e negativos.
 - 50 °C – 10 min (transcrição reversa).
 - 95 °C – 5 min.
 - 45 ciclos:
 - 95 °C – 5 s.
 - 55 °C – 30 s (detecção fluorescência).

Confirmar parâmetros antes de iniciar corrida, incluindo o programa é o seguinte:

- 50 °C – 10 min (transcrição reversa).
- 95 °C – 5 min.
- 45 ciclos:
 - 95 °C – 5 s.
 - 55 °C – 30 s (detecção fluorescência).

E. Interpretação dos Resultados (explicativa e detalhada)

A análise é baseada nos valores de **Ct (Cycle Threshold)** ou **Cp (Cross Point)** e na presença/ausência de curvas de amplificação para os alvos específicos e controlos.

1. Critérios de Validação

- **Controlo Negativo (água):** não deve apresentar amplificação em nenhum alvo → garante ausência de contaminação da mastermix.
- **Controlo Positivo (RNA conhecido):** deve amplificar todos os alvos esperados → confirma que uma reação com essa mastermix funciona.
- **Controlo Interno (gene RP):** deve amplificar em todas as amostras → garante qualidade da extração do RNA e ausência de inibidores.

2. Classificação das Amostras

a) *Positivo:*

- Amplificação clara para os alvos específicos (ex.: N1 e N2) com **Ct ≤ 35**.
- Curvas exponenciais bem definidas.

b) *Negativo:*

- Sem amplificação para os alvos específicos.
- Controlo interno RP amplificado ($Ct \leq 35$).

c) *Inconclusivo:*

- Apenas um alvo viral amplificado ($Ct \leq 35$) ou ausência de RP.
- Repetir teste ou recolher nova amostra.

d) *Inválido:*

- $Ct > 35$ para todos os alvos ou ausência total de amplificação.

e) *Exemplos de Interpretação*

Alvo N1	Alvo N2	RP	Resultado
Ct 28	Ct 30	Ct 25	Positivo
—	—	Ct 26	Negativo
Ct 28	—	Ct 27	Inconclusivo
—	—	—	Inválido

Notas Importantes

- Nunca misturar materiais entre câmaras.
- Trocar pontas de pipeta a cada passo.
- Descontaminar superfícies com RNase Cleaner e etanol 70%.
- Ligar UV nas câmaras antes e depois do trabalho para descontaminação do espaço.

IV. Bibliografia

Baleizão, R. (2020). Procedimento Operacional Padrão e Avaliação de Risco: Extração de RNA Viral para Diagnóstico de COVID-19. IPS COVID Lab.

Miguel, F. (2020). Procedimento Operacional Padrão e Avaliação de Risco: Preparação de amostras para análise por PCR em tempo real. IPS COVID Lab.

NZYTech. (2024). Instructions for use – NZY Viral RNA Isolation Kit. Lisboa: NZYTech.

NZYTech. (2024). User Guide – NZYSpeedy One-step RT-qPCR Probe Master Mix. Lisboa: NZYTech.