

**Para a estimativa de quantidades necessárias para a realização do diagnóstico de COVID-19 pela RT-PCR deve-se considerar:**

A metodologia utilizada: para esse laboratório foi escolhido o protocolo do CDC (<https://www.fda.gov/media/134922/download>) o qual é aprovado pelo LACEN do Paraná. Neste protocolo são utilizados três primers: Um para controle e identificação de amostras humanas (RNase P - Human RNase P Forward Primer), e dois distintos para detecção de RNA viral (2019\_nCov\_N1 e 2019\_nCov\_N2), sendo assim são realizadas três reações de PCR-RT para cada amostra: RP, N1 e N2.

Os três estágios para o desenvolvimento do exame: **1. Extração do RNA viral, 2. Preparo do Mastermix de amplificação do material genético viral, 3. Amplificação do material genético viral.**

Para o estágio de **extração do material genético viral** serão necessários materiais que incluem: ponteiros de micropipeta (diferentes tamanhos), tubos de 1,5mL e tubos de armazenagem. (vide POP para maior detalhamento). Esse estágio está representado no Fluxo do exame como realizado dentro do ambiente de extração e uma descrição detalhada do material necessário este a seguir:

- Uma ponteira de micropipeta para cada fase do procedimento de extração para cada amostra processada. Dessa maneira, uma amostra processada poderá consumir até 5 ponteiros de micropipeta. Portanto, se processarmos 3 mil amostras, são **15 mil ponteiros de micropipetas apenas para essa fase;**
- Dois tubos de 1,5mL por amostra, dessa maneira são previstos **6 mil tubos** de 1,5mL;
- Um tubo para armazenagem (criotubo), dessa maneira, são previstos **3 mil tubos** de armazenagem.

O **estágio de preparo do MasterMix** de amplificação do material genético viral consiste no pré-preparo da reação de PCR por transcriptase reversa em tubos de 1,5mL que posteriormente serão agrupados aos *primers* para enfim serem encaminhados à etapa de amplificação do material genético viral. O agrupamento ocorre em placas de PCR ou tubos para PCR, a depender do número de amostras processadas. Quando são processadas até 6 amostras é economicamente viável a utilização de tubos de PCR, para processamento de mais de 6 amostras é economicamente viável a utilização de placas de PCR. As placas de PCR tem um limite de processamento de até 29 amostras, dada a necessidade de controles (positivos e negativos), bem como a natureza do teste (três *primers* por amostra). Nesse estágio serão necessários:

- 3 tubos de 1,5mL, um para cada *primer* (RP, N1 e N2) para cada reação preparada (independente do número de amostras 1 ou 29), assim, o *mínimo* de **104 tubos de 1,5mL** serão necessários para processar 3 mil reações.
- 5 ponteiros de micropipetas para cada reação preparada (independente do número de amostras 1 ou 29), estimando-se o máximo de 600 ponteiros para esse estágio.

O estágio de Amplificação do material genético viral ocorre no equipamento de PCR em tempo real. Para isso, as reações são preparadas em tubos de 0,2mL ou em placas de PCR contendo 96 poços de 0,2mL. As ilustrações a seguir representam a forma tradicional de organização das amostras, cada célula representa ou um tubo de 0,2mL ou um poço de 0,2mL em uma placa de 96 poços. Observe que cada amostra utiliza 3 tubos (ou três poços) e que para cada reação são necessários: 2 controles positivos (PTC-1, PTC-2) e 1 controle negativo (NTC) e um controle de amostras humanas (HSC). Note que os controles também ocupam 3 tubos, ou 3 poços cada um deles.

Exemplo de organização dos tubos para processamento de até quatro amostras. Note que cada fileira contém 8 tubos (A – H). Portanto, nesse exemplo são necessárias 3 fileiras de 8 tubos para processar 4 amostras, resultando em 24 tubos.

	1	2	3
	N1	N2	RP
A	NTC	NTC	NTC
B	HSC	HSC	HSC
C	Amostra 1	Amostra 1	Amostra 1
D	Amostra 2	Amostra 2	Amostra 2
E	Amostra 3	Amostra 3	Amostra 3
F	Amostra 4	Amostra 3	Amostra 4
G	PTC-1	PTC-1	PTC-1
H	PTC-2	PTC-2	PTC-2

Nesse contexto, se as 3 mil amostras forem processadas em tubos, **serão necessários no mínimo 9 mil tubos. Dessa forma, estima-se 1125 tiras** de 8 tubos (e suas respectivas tampas).

Ao organizar uma placa de 96 poços deve-se considerar a necessidade de espaço para os controles (positivo, negativo e de amostras humanas) de modo que cada placa de 96 poços poderá ser utilizada para processar **até 29** amostras. Desse modo, em um ambiente de processamento de altíssima eficiência, serão necessárias, **no mínimo, 104 placas** e seus respectivos selos, para processar 3 mil amostras.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	N1/NTC	N1/Amostra 1	N1/Amostra 2	N1/Amostra 3	N1/Amostra 4	N1/Amostra 5	N1/Amostra 6	N1/Amostra 7	N1/Amostra 8	N1/Amostra 9	N1/Amostra 10	N1/PTC
B	N2/NTC	N2/Amostra 1	N2/Amostra 2	N2/Amostra 3	N2/Amostra 4	N2/Amostra 5	N2/Amostra 6	N2/Amostra 7	N2/Amostra 8	N2/Amostra 9	N2/Amostra 10	N2/PTC
C	RP/NTC	RP/Amostra 1	RP/Amostra 2	RP/Amostra 3	RP/Amostra 4	RP/Amostra 5	RP/Amostra 6	RP/Amostra 7	RP/Amostra 8	RP/Amostra 9	RP/Amostra 10	RP/PTC
D	N1/Amostra 11	N1/Amostra 12	N1/Amostra 13	N1/Amostra 14	N1/Amostra 15	N1/Amostra 16	N1/Amostra 17	N1/Amostra 18	N1/Amostra 19	N1/Amostra 20	N1/Amostra 21	N1/HTC
E	N2/Amostra 11	N2/Amostra 12	N2/Amostra 13	N2/Amostra 14	N2/Amostra 15	N2/Amostra 16	N2/Amostra 17	N2/Amostra 18	N2/Amostra 19	N2/Amostra 20	N2/Amostra 21	N2/HTC
F	RP/Amostra 11	RP/Amostra 12	RP/Amostra 13	RP/Amostra 14	RP/Amostra 15	RP/Amostra 16	RP/Amostra 17	RP/Amostra 18	RP/Amostra 19	RP/Amostra 20	RP/Amostra 21	RP/HTC
G	N1/Amostra 22	N2/Amostra 22	RP/Amostra 22	N1/Amostra 23	N2/Amostra 23	RP/Amostra 23	N1/Amostra 24	N2/Amostra 24	RP/Amostra 24	N1/Amostra 25	N2/Amostra 25	RP/Amostra 25
H	N1/Amostra 26	N2/Amostra 26	RP/Amostra 26	N1/Amostra 27	N2/Amostra 27	RP/Amostra 27	N1/Amostra 28	N2/Amostra 28	RP/Amostra 28	N1/Amostra 29	N2/Amostra 29	RP/Amostra 29

No entanto, na rotina do laboratório é pouco provável o processamento de 29 amostras a cada turno de trabalho, de modo que variações no número de amostras processadas ocorrerão, o que torna o processo de quantificação do número de placas e tubos bastante complexo. Considerando a natureza da atividade: **diagnóstico da COVID-19**, é provável que **em alguns momentos seja necessário processar 10 amostras, e em outros momentos 29 amostras. Dessa maneira, prever um número de placas maior que o mínimo necessário justifica-se.**

Ainda, é salutar destacar que durante o processo de montagem da placa para o estágio de amplificação são utilizadas ponteiras de micropipetas. Assim, o processamento de cada amostra poderá consumir até 3 ponteiras de micropipetas, resultando num mínimo de 9 mil ponteiras de micropipetas para esse estágio.

Dessa forma, a estimativa leva em consideração uma variação de 25% sobre o número de amostras previstas a serem processadas (3 mil), essa variação é justificada por:

- Exames cujo resultado é “inconclusivo” ou “inválido” e necessitam repetição;
- Exames com erros de processamento que podem inviabilizar o material e também necessitam repetição;
- É mais prático e barato trabalhar com tiras de 8 tubos em vez de tubos individuais, daí a necessidade de compra em tiras.

Material	Necessidade por amostra	Para o Processamento mínimo de 4 amostras	Processamento máximo de 29 amostras	Previsto para processamento de 3 mil amostras	Estimativa caso ½ seja processado em placas e ½ em tubos
Ponteiras de micropipeta	13	52	377	39000	
Tubos de 0,2 mL + tampas	3	24 * (vide figura 1)		9000	
Tira de 8 tubos 0,2mL + tampas	1	3		1125	563
Placas de PCR + selos	1	NA	1	104	104 *

\* Processar 3000 mil em placas e processar 1500 consumirá a mesma quantidade de material.