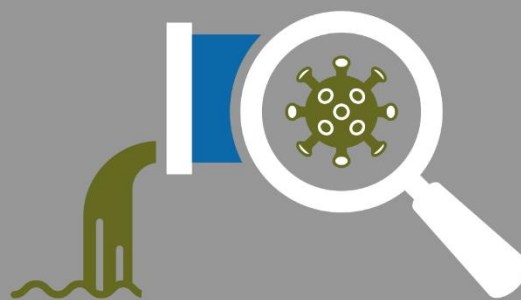


NOTA TÉCNICA

Metodologia para concentração e quantificação do novo coronavírus em amostras de água e esgoto por técnicas moleculares



MONITORAMENTO
COVID ESGOTOS



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – INCT ETEs Sustentáveis

etes-sustentaveis.org

Agência Nacional de Águas – ANA

www.ana.gov.br

Companhia de Saneamento de Minas Gerais – COPASA

www.copasa.com.br

Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais – SES

www.saude.mg.gov.br

Instituto Mineiro de Gestão das Águas – IGAM

www.igam.mg.gov.br

Equipe Técnica

ANA

Supervisão do Projeto

Sérgio Ayrimoraes

Equipe Técnica

Carlos Perdigão

Diana Leite

Flávia Pierry

Flávio Tröger

Marcus Fuckner

Thamiris Lima

Thiago Fontenelle

INCT ETEs Sustentáveis

Coordenação Geral

Carlos Chernicharo

Coordenação Executiva

Juliana Calábria

Cesar Mota

Equipe Técnica

Ayana Lemos

Bernardo Borges de Lima

Gabriel Tadeu

Izabel Chiodi

Lariza Azevedo

Livia Lobato

Lucas Chamhum

Lucas Vassalle

Matheus Pascoal

Rafael Pessoa

Thiago Bressani

Thiago Morandi

Equipe de Laboratório

Cíntia Leal

Deborah Leroy

Elayne Machado

Luyara Fernandes

Maria Fernanda Espinosa

Thiago Leão

COPASA

Supervisão do Projeto

Marcus Tullius

Equipe Técnica

David Bichara

Jorge Luiz Borges

Gilberto Gomes

Ronaldo de Melo

Sérgio Neves

Solange da Costa

SES

Supervisão do Projeto

Filipe Laguardia

Equipe Técnica

Beatriz Carvalho

Dario Ramalho

IGAM

Supervisão do Projeto

Marília Melo

Equipe Técnica

Katiane Cristina de Brito Almeida

Valquíria Moreira

Equipe Editorial

Supervisão editorial

Agência Nacional de Águas

Elaboração dos originais

INCT ETEs Sustentáveis

Revisão dos originais

Agência Nacional de Águas

Projeto gráfico, editoração e capa

Monumenta Comunicação e Estratégias Sociais

Mapas temáticos

INCT ETEs Sustentáveis

O projeto piloto: *Detecção e quantificação do novo coronavírus em amostras de esgoto nas cidades de Belo Horizonte e Contagem - Monitoramento COVID Esgotos* - é coordenado e executado pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Estações de Tratamento de Esgotos Sustentáveis (INCT ETEs Sustentáveis) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com o apoio técnico e financeiro da Agência Nacional de Águas (ANA) e apoio técnico da Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA), da Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (SES) e do Instituto Mineiro de Gestão das Águas (IGAM). Gestão Financeira: Fundação Christiano Ottoni.

As ilustrações, tabelas e gráficos sem indicação da fonte foram elaborados pelo INCT ETEs Sustentáveis. Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução deste texto e dos dados nele contidos, desde que citada a fonte. Reproduções para fins comerciais são proibidas. Disponível também em: <http://www.ana.gov.br>.

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	PROTOCOLO PARA CONCENTRAÇÃO E DETECÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO VIRAL	2
2.1	ESCOLHA DO MÉTODO UTILIZADO NO PROJETO	2
2.2	METODOLOGIA PARA CONCENTRAÇÃO DO VÍRUS EM AMOSTRAS DE ÁGUA E ESGOTO.....	2
2.3	EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO DO VIRUS	4
2.4	DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO SARS-COV-2 POR RT-qPCR	4
2.4.1	<i>Materiais e Reagentes necessários.....</i>	<i>4</i>
2.4.2	<i>Preparando a Reação de RT-qPCR.....</i>	<i>5</i>
2.5	INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS	9
2.5.1	<i>Controles.....</i>	<i>9</i>
2.5.2	<i>Análise dos Resultados Qualitativos.....</i>	<i>10</i>
2.5.3	<i>Análise dos Resultados Quantitativos</i>	<i>11</i>
2.5.4	<i>Controle de Qualidade dos Resultados.....</i>	<i>11</i>
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	12
4	REFERÊNCIAS	12
5	ANEXO	14

APRESENTAÇÃO

Essa Nota Técnica foi elaborada tomando por base um dos protocolos que estão sendo utilizados no âmbito do *Projeto-piloto: Detecção e quantificação do novo coronavírus em amostras de esgoto nas cidades de Belo Horizonte e Contagem*, que é uma iniciativa conjunta da Agência Nacional de Águas (ANA) e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Estações Sustentáveis de Tratamento de Esgoto (INCT ETEs Sustentáveis - UFMG), em parceria com a Companhia de Saneamento de Minas Gerais (Copasa), o Instituto Mineiro de Gestão das Águas de Minas Gerais (Igam) e a Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (SES).

Esta Nota Técnica busca contribuir para o estabelecimento de protocolo referente à concentração e quantificação do novo coronavírus em amostras de água e esgoto por técnicas moleculares. O protocolo proposto se baseia na experiência acumulada no âmbito do projeto piloto em referência.

1 INTRODUÇÃO

O monitoramento do esgoto como ferramenta de vigilância epidemiológica é conhecido desde a década de 1940, quando utilizado para detectar o poliovírus (causador da poliomielite) nos Estados Unidos (Paul & Trask, 1941). Desde então essa ferramenta tem sido usada para o monitoramento de vírus entéricos, como norovírus, rotavírus, adenovírus e picornavírus (como os vírus da hepatite) em diferentes partes do mundo (Hellmér *et al.*, 2014; Asghar *et al.*, 2014; Berchenko *et al.*, 2017), incluindo no Brasil (Teixeira *et al.*, 2017).

A quantificação e o mapeamento do novo coronavírus (SARS-CoV-2) a partir de amostras de esgoto vêm sendo realizados em diferentes partes do mundo. Até o momento, tem-se informações da detecção do SARS-CoV-2 no esgoto da Holanda (Medema *et al.*, 2020), Estados Unidos (Wu *et al.*, 2020a, Nemudryi *et al.*, 2020, Peccia *et al.*, 2020), Austrália (Ahmed *et al.*, 2020a), França (Wuertzer *et al.*, 2020a; Wuertzer *et al.*, 2020b), Espanha (Randazzo *et al.*, 2020a; Randazzo *et al.*, 2020b), Itália (La Rosa *et al.*, 2020; Rimoldi *et al.*, 2020), Israel (Bar-Or *et al.*, 2020), Turquia (Kocacemi *et al.*, 2020), Japão (Haramoto *et al.*, 2020) e Brasil (Chernicharo *et al.*, 2020; Prado *et al.*, 2020). Não existe, até o momento, um protocolo padrão para determinar a concentração das partículas virais do SARS-CoV-2 em esgoto (Kitajima *et al.*, 2020). Entretanto, existem diversos artigos publicados, baseados na concentração e detecção de vírus entéricos a partir de amostras de esgoto (Symonds *et al.*, 2014; Ahmed *et al.*, 2015). Também estão disponíveis informações recentes sobre a aplicação desses protocolos para vírus envelopados como o SARS-CoV-2 (Ahmed *et al.*, 2020a), e a comparação da eficiência de recuperação do vírus por diferentes protocolos de concentração de amostras (Ahmed *et al.*, 2020b).

Assim, a presente Nota Técnica busca contribuir para o estabelecimento de uma metodologia, relativamente simples, para concentração e quantificação do novo coronavírus por técnicas moleculares, que possa ser utilizada em vários laboratórios de países em desenvolvimento, já que utiliza equipamentos convencionais para filtração de amostras de água e esgoto. Nesse protocolo, são descritas as etapas de processamento das amostras de água e esgoto para: i) concentração do vírus; ii) extração do RNA viral; e iii) detecção e quantificação do vírus através da reação de transcrição reversa e PCR em tempo real (*RT-qPCR*).

2 PROTOCOLO PARA CONCENTRAÇÃO E DETECÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO VIRAL

2.1 Escolha do método utilizado no projeto

A escolha do método para concentração e extração do RNA viral considerou artigos científicos, que usaram a mesma metodologia para concentração de vírus entéricos em esgoto, e posterior detecção via análise molecular por PCR quantitativo-qPCR (Symonds *et al.*, 2014; Ahmed *et al.*, 2015; Ahmed *et al.*, 2020a). Assim, o protocolo escolhido, de filtração em membrana eletronegativa e extração do RNA viral diretamente da membrana, baseia-se no método de adsorção-eluição modificado, também conhecido como método de adsorção-extração direta (Ahmed *et al.*, 2020b).

As membranas eletronegativas são tipicamente usadas para a concentração de vírus entéricos em amostras de esgoto e outros efluentes (Symonds *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 2017), com eficiência de recuperação de 31% a 78% para adenovírus humano e poliomavírus (Ahmed *et al.*, 2015). Vírus envelopados, como o SARS-CoV-2, apresentam alta afinidade de adsorção à membrana eletronegativa (Haramoto *et al.*, 2009) e à fração sólida presente no esgoto, quando comparado aos vírus não-envelopados (Ye *et al.*, 2016).

Importante destacar que, em publicação recente, Ahmed *et al.* (2020b) compararam sete métodos diferentes para concentração de vírus e posterior detecção via RT-qPCR baseada na recuperação do vírus da hepatite murina (MHV- *murine hepatitis virus*), que também é um coronavírus, para avaliar a detecção do SARS-CoV-2 a partir de esgoto. Os autores reportaram que os dois métodos mais eficientes foram o método de adsorção-extração (sem acidificação) com adição de $MgCl_2$ (concentração final de 25mM) (65,7% de eficiência de recuperação do MHV) e o mesmo método em pH neutro (sem adição de $MgCl_2$) (com recuperação de 56,0% do vírus MHV).

Portanto, como destacado no estudo de Ahmed *et al.* (2020b) e comprovado no presente projeto, o método de adsorção em membrana eletronegativa e extração do RNA viral diretamente da membrana é um método simples, de baixo custo e relativamente rápido para processar grande número de amostras, se comparado a outros métodos. Por exemplo, os métodos de ultrafiltração usando os dispositivos Centricon ou Amicon são caros e requerem várias etapas de centrifugação. Já o método de ultracentrifugação, muito usado em laboratórios de virologia, requer uma ultracentrífuga, equipamento de custo elevado e usualmente não disponível em laboratórios menos especializados.

2.2 Metodologia para concentração do vírus em amostras de água e esgoto

A etapa inicial de processamento das amostras consiste na concentração das partículas virais, pois amostras de água e esgoto costumam apresentar concentrações virais relativamente baixas. O método utilizado no projeto é uma modificação do método de adsorção-eluição em membranas eletronegativas de Katayama *et al.* (2002) e Symonds *et al.* (2014). Neste método, não se realiza a eluição dos vírus retidos na membrana, mas faz-se a extração do material genético diretamente da membrana, usando kit comercial para extração de ácidos nucleicos virais (detalhado a seguir).

No laboratório, as amostras de esgoto e/ou água coletadas em campo (mantidas a 4°C durante todo o tempo de coleta) passam pelas seguintes etapas de processamento (*ver nota ao final sobre protocolo de biossegurança para manipulação das amostras*):

- Medir e transferir um volume de 100 mL para um becker contendo barra magnética, ambos previamente esterilizados por autoclavagem.
- Adicionar à amostra 1 mL de $MgCl_2$ (2.5M), para obter a concentração final de 25 mM. Homogeneizar a amostra com o auxílio de agitador magnético durante 3 min e depois medir o pH.
- Acidificar a amostra usando ácido acético (1M) até pH entre 3 e 3,5. Para esgoto bruto, o volume de ácido adicionado usualmente varia entre 8 e 20 mL.
- Filtrar a amostra através de membrana eletronegativa, HAWP04700 de éster de celulose, com poro de $0,45\mu m$, diâmetro de 47mm (MILLIPORE, Darmstadt, Alemanha), previamente autoclavada, conectada a um suporte de filtro de vidro estéril. Filtrar o maior volume possível, até a membrana colmatar (filtrar mínimo 10mL para esgoto e 100mL para água de rios). Geralmente a filtração de 30 mL de esgoto leva de 20 a 30 minutos.
- Remover a membrana do suporte do filtro (com pinça estéril).
- Colocar a membrana (dobrada) dentro do tubo PowerBead, específico do kit de extração de DNA, AllPrep PowerViral DNA/RNA (Qiagen®, Hilden, Alemanha).
- Adicionar 600 μ L da solução PM1 do kit de extração AllPrep PowerViral DNA/RNA (Qiagen®, Hilden, Alemanha) e 6 μ L de 2-mercaptoetanol, a fim de minimizar riscos de degradação do RNA. Este passo deve ser realizado dentro de capela de exaustão, pois o 2-mercaptoetanol tem odor muito forte.
- Armazenar a membrana (no tubo com as soluções) à $-20^{\circ}C$ até posterior extração do RNA. Caso o kit de extração de RNA com a solução PM1 não se encontre disponível, armazenar a membrana em tubo Eppendorf de 2ml à $-80^{\circ}C$.

Na Figura 1 são ilustradas as etapas e procedimentos para concentração de RNA viral usando o método de filtração em membrana eletronegativa.

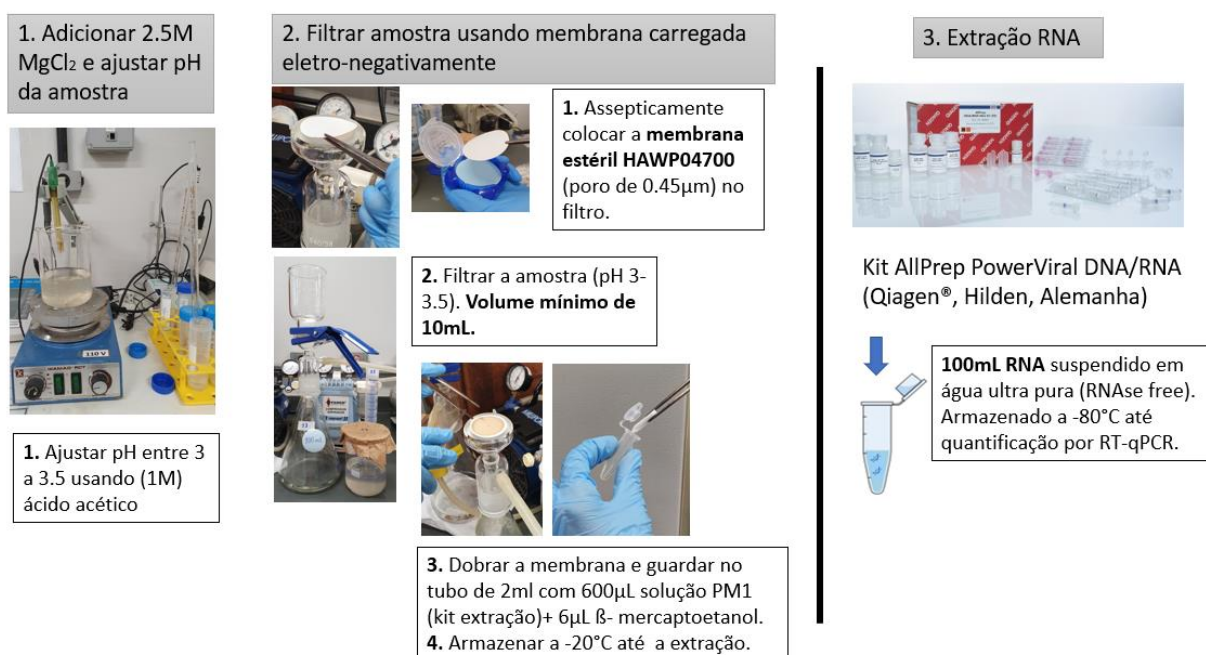


Figura 1: Processo de concentração de RNA viral pelo método de filtração com membrana eletronegativa.

Fonte: Figura elaborada por Espinosa M. F.

2.3 Extração do material genético do vírus

A extração do RNA é realizada seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante do kit AllPrep PowerViral DNA/RNA (Qiagen®, Hilden, Alemanha). Ao final de cada extração, o RNA é eluído em 100µL de água ultra pura (livre de RNA). Em seguida, o RNA total da amostra é quantificado usando o NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Califórnia, Estados Unidos). Finalmente, a amostra é congelada a -80°C até a quantificação por RT-qPCR.

2.4 Detecção e quantificação do SARS-CoV-2 por RT-qPCR

A detecção do SARS-CoV-2 em amostras de esgoto é realizada pela técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real com transcrição reversa (RT-qPCR). Os primers e sondas (oligonucleotídeos marcados com fluorescência) para a detecção do SARS-CoV-2 foram selecionados a partir de regiões do gene da Nucleocapsídeo (N) do vírus. O princípio da técnica consiste na transcrição reversa do RNA isolado das amostras de esgoto para cDNA e posterior amplificação do material genético no equipamento de PCR em Tempo Real. A Técnica RT-qPCR é considerada padrão ouro pela Organização Mundial da Saúde para a detecção do novo coronavírus (SARS-CoV-2) causador da Covid19.

O protocolo apresentado a seguir foi adaptado para as amostras de esgoto e é baseado no Protocolo do *Center for Disease Control and Prevention* (2019).

2.4.1 Materiais e reagentes necessários

- 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, n° catálogo # 4351104).
- Água para PCR, grau molecular, livre de nucleases.
- Centrífuga para microplacas.
- Luvas nitrílicas ou de látex sem talco.
- MicroAmp Optical adhesive Film PCR/Real time PCR compatível com equipamento 7500 (Applied Biosystems ref 4311971).
- Microcentrífuga.
- Micropipetas (10 µL, 200 µL e 1000 µL).
- Microplaca de PCR 96 Poços, borda elevada, compatível com equipamento 7500 Applied Biosystems, ref PCR-96-AB-C).
- Microtubos, estéril, livres de DNase e RNase (0,2ml, 1,5ml e 2,0ml).
- Ponteiras com filtro, estéril, livres de DNase e RNase.
- Racks para microtubos (tipo Eppendorfs).
- Solução de limpeza RNase Away™ (Fisher Scientific; catálogo #21-236-21) ou equivalente.
- Vórtex.

Primers, Sondas e Kits RT-qPCR

Na Tabela 1 é apresentada a listagem dos reagentes validados no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA/UFMG) para a detecção e quantificação do SARS-CoV2 em amostras de água e esgoto por RT-qPCR.

Tabela 1: Reagentes usados para a detecção e quantificação do SARS-CoV-2 por RT-qPCR

Reagente	Descrição	Nº Catálogo
2019-nCoV RUO Kit (IDT)	Kit de primers/sondas, consiste em 2 ensaios específicos para o SARS-CoV-2 (regiões N1 e N2 determinadas pelo CDC) e 1 controle interno humano (RPP30)	10006605 10006713
2019-nCoV_N_Positive Control (IDT)	Plasmídeo contendo a sequência completa do gene do Nucleocapsídeo do vírus 2019-nCoV, com as regiões N1, N2 e N3	10006625
Hs_RPP30 Positive Control (IDT)	Plasmídeo contendo a sequência completa do gene RPP30 Humano contendo regiões analisadas pelo 2019-nCoV RUO Kit.	10006626
MERS-CoV Control (IDT)*	Plasmídeo contendo a sequência completa do gene do Nucleocapsídeo dos vírus MERS. (Opcional)*	10006623
SARS-CoV Control (IDT)*	Plasmídeo contendo a sequência completa do gene do Nucleocapsídeo dos vírus SARS. (Opcional)*	10006624
Itaq Universal Sondas One Step Kit (Biorad)	Master Mix utilizado para as reações da qPCR, possui todos os reagentes necessários e a enzima Transcriptase Reversa para promover a transcrição em um único passo	1725141

*A utilização desses controles é OPCIONAL segundo o protocolo do CDC.

Observações:

1. Segundo protocolo modificado em 15 de março de 2020, (<https://www.fda.gov/media/134922/download>), o CDC determinou a retirada da região N3 do protocolo de realização da análise. Fica a critério do Laboratório fazer ou não a análise dessa região.
2. Cada laboratório pode validar seus próprios reagentes segundo seus protocolos internos.
3. É utilizado o ensaio TaqMan e o kit de primers/sondas é marcado com FAM/BHQ1 (Black Hole Quencher®-1); Observação importante: NÃO é para RT-qPCR multiplex.
4. As sequências dos primers, sondas e controles encontram-se disponíveis no Anexo 1 deste protocolo.

2.4.2 Preparação da Reação de RT-qPCR

Cuidados na manipulação dos reagentes e amostras

Antes de começar as atividades de Biologia Molecular, alguns cuidados de Biossegurança e minimizar riscos de contaminação das amostras devem ser observados:

- Uso de EPI's (Equipamentos de Proteção Individual), tais como luvas, jalecos e proteção para os olhos.
- Sempre utilizar luvas sem talco para o preparo das reações do qPCR.
- Manipular os reagentes de Biologia Molecular no local adequado e com luvas limpas.
- Manter locais separados fisicamente para cada etapa: extração do RNA, manipulação dos reagentes e montagem do mix, e adição das amostras nas microplacas.
- Usar sempre ponteiras com barreiras (filtros).
- Limpar as bancadas, pipetas e equipamentos que serão usados antes e após o uso com solução de álcool 70%.
- Álcool 70% deve ser usado para descontaminação das bancadas onde houver manipulação de RNA. A solução RNase Away™ deve ser usada para descontaminar as superfícies e pipetadores a fim de evitar contaminação e/ou degradação do RNA.
- Primers, sondas (incluindo alíquotas) e o Mix com as enzimas devem ser descongelados e mantidos em racks com gelo (*cold block*) durante todo o tempo de preparação e uso.

- O RNA deve ser mantido em *rack* com gelo (*cold block*) durante a preparação e uso, para garantir a estabilidade.

Diluição dos controles

Os controles utilizados no projeto (marca IDT) já vêm ressuspensos em tubo contendo 250 μL (200.000 cópias/ μL) em IDTE pH 8,0. Para utilização, os controles devem ser diluídos para concentrações menores, conforme as instruções do fabricante.

Os Plasmídeos Controle podem ser diluídos em tampão TE, pH 8,0 (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) para a diluição ideal determinada internamente para cada laboratório.

Uma diluição sugerida pelo Laboratório de Microbiologia do DESA/UFMG para o controle positivo 2019-nCoV_N é a de 100x, assim obtém-se a alíquota de trabalho com a concentração de 2000 cópias/ μL (1º ponto da curva). Para os outros controles (SARS, MERS e HsRPP 30), sugere-se a diluição de 1.000x para alíquotas de trabalho com a concentração de 200 cópias/ μL . Essas diluições podem variar de acordo com cada laboratório, equipamento e Mix utilizados.

Observações:

1. Os controles são transportados à temperatura ambiente, mas devem ser armazenados de -15 à -30°C em temperatura constante.
2. O controle concentrado de 200.000 cópias/ μL deve ser manuseado com extremo cuidado, longe dos locais de extração e preparação de amostras, e também dos equipamentos de qPCR, para minimizar o risco de contaminação.
3. Ciclos repetidos de congelamento e descongelamento devem ser evitados. O ideal é dividir em alíquotas menores para uso.

Preparação da Curva Padrão

As Curvas Padrão são preparadas com o controle positivo 2019-nCoV_N para ambos os alvos (N1 e N2). Consistem em diluições seriadas da alíquota de trabalho do controle positivo diluído. São realizadas somente nas análises quantitativas.

No caso das amostras de esgoto coletadas nas cidades de Belo Horizonte e Contagem, padronizou-se o primeiro ponto da Curva Padrão com uma diluição de 100x, conforme sugerido na etapa de diluição dos controles. Na Figura 2 é apresentado um exemplo da diluição seriada, com fator de diluição 1:10. Na Figura 3 é apresentado um exemplo da Curva Padrão obtida com as diluições sugeridas.

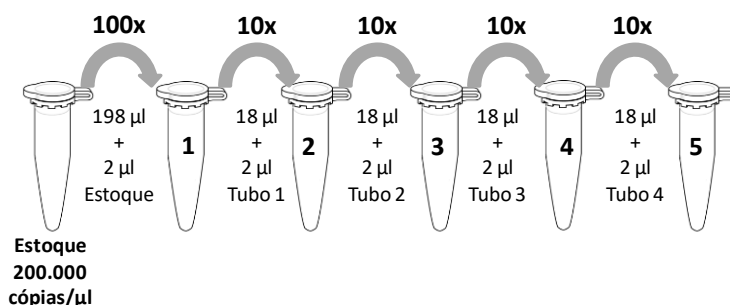


Figura 2: Diluição seriada (fator de diluição 1:10)

Select a target

* Select a target for the standards N1

Define the standard curve

* # of Points: 5 5 Recommended

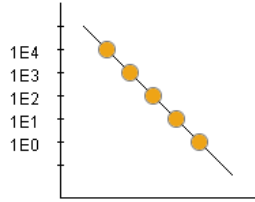
* # of Replicates: 3 3 Recommended

* Starting Quantity: 10000.0 Enter the highest or lowest standard quantity for the standard curve.

* Serial Factor: 1:10 Select a value from 1:10 to 10×

5 Points X 3 Replicates = 15 Required Wells

Standard Curve Preview



*Considerar o valor por reação (5µl) para o primeiro ponto da Curva Padrão

Figura 3: Curva Padrão com as diluições sugeridas

Observações:

1. O volume mínimo a ser pipetado deve ser 2µl a fim de evitar erros de pipetagem.
2. É desejável que a Curva Padrão tenha pelo menos 5 pontos.
3. A Curva Padrão pode ser diluída em água para uso em Biologia Molecular (livre de DNases e RNases) ou em algum tipo de carreador como diluente (ex.: Yeast tRNA 100 ng/µL).
4. A cada pipetagem, os microtubos devem ser homogeneizados brevemente no vórtex.
5. Sugere-se que a Curva Padrão seja preparada antes da montagem da placa.
6. As reações devem ser realizadas em triplicata para cada ponto da Curva Padrão e de acordo com o protocolo de amplificação.
7. Não é necessário fazer Curva Padrão para o controle RNase P (Controle Interno, HsRPP 30).

Procedimentos para a Amplificação

Para as reações da PCR em Tempo Real utilizou-se o *MasterMix Itaq Universal Probes One Step Kit* (Biorad). Esse mix possui uma combinação de *iScript RNase H⁺ transcriptase reversa* e a *DNA polimerase iTaq hot-start* para completar as reações em tempo real em uma única etapa. Os reagentes utilizados na reação e suas respectivas concentrações estão detalhados na Tabela 2, sendo as concentrações utilizadas sugeridas pelo fabricante. Cada Laboratório deve estabelecer um protocolo de acordo com o kit escolhido. O volume final de cada reação foi igual a 20 µL. As reações foram realizadas em triplicata, tanto para as amostras, quanto para os controles negativos e diluições das curvas padrão (controle positivo).

Tabela 2: Reagentes e volumes usados na reação de RT-qPCR

Reagentes	Volume (µl) por reação
Água livre de Nucleases	N x 3,0
Primer/Probe Mix	N x 1,5
Reverse Transcriptase	N x 0,5
Master Mix One-Step Kit	N x 10
Amostra/Controles	5,0
Volume Final	20,0

N = Número de Amostras

São distribuídos 15 µL da mistura dos reagentes em cada poço da microplaca de 96 poços. Antes de mover a microplaca para a área de manipulação dos ácidos nucleicos, preparar o Controle Negativo (No Template Control - NTC) pipetando 5 µL de água livre de nucleases em cada reação. Em bancada separada, distribuir 5 µL das amostras/controles em cada poço contendo a reação. Cada laboratório deve

padronizar a distribuição das amostras e controles na microplaca. Na Figura 4 é apresentado um modelo de distribuição.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S N1 2E3	S N1 2E3	S N1 2E3	S N1 200	S N1 200	S N1 200	S N1 20	S N1 20	S N1 20	S N1 2	S N1 2	S N1 2
B	S N1 0,2	S N1 0,2	S N1 0,2	Sample 1 U N1	Sample 1 U N1	Sample 1 U N1	Sample 2 U N1	Sample 2 U N1	Sample 2 U N1	Sample 3 U N1	Sample 3 U N1	Sample 3 U N1
C	Sample 4 U N1	Sample 4 U N1	Sample 4 U N1	SARS U N1	SARS U N1	SARS U N1	MERS U N1	MERS U N1	MERS U N1	N N1	N N1	N N1
D	S N2 2E3	S N2 2E3	S N2 2E3	S N2 200	S N2 200	S N2 200	S N2 20	S N2 20	S N2 20	S N2 2	S N2 2	S N2 2
E	S N2 0,2	S N2 0,2	S N2 0,2	Sample 1 U N2	Sample 1 U N2	Sample 1 U N2	Sample 2 U N2	Sample 2 U N2	Sample 2 U N2	Sample 3 U N2	Sample 3 U N2	Sample 3 U N2
F	Sample 4 U N2	Sample 4 U N2	Sample 4 U N2	SARS U N2	SARS U N2	SARS U N2	MERS U N2	MERS U N2	MERS U N2	N N2	N N2	N N2
G	Controle Positivo S RNaseP 1	Controle Positivo S RNaseP 1	Controle Positivo S RNaseP 1	Sample 1 U RNaseP	Sample 1 U RNaseP	Sample 1 U RNaseP	Sample 2 U RNaseP	Sample 2 U RNaseP	Sample 2 U RNaseP	Sample 3 U RNaseP	Sample 3 U RNaseP	Sample 3 U RNaseP
H	Sample 4 U RNaseP	Sample 4 U RNaseP	Sample 4 U RNaseP	N RNaseP	N RNaseP	N RNaseP						

Wells:  48 Unknown  33 Standard  9 Negative Control 6 Empty

Figura 4: Placa de qPCR com modelo de distribuição das amostras e controles

A placa mostrada na Figura 4 é um exemplo para os ensaios quantitativos. Para ensaios qualitativos, aplicar somente o Controle Positivo 2019-nCoV_N diluído 1000x (200 cópias/ μ L).

Após montagem da microplaca, vedar com o selante óptico (*MicroAmp Optical adhesive Film PCR*) e centrifugar brevemente a microplaca (30 segundos, 500 x g) para remover as bolhas. Na Tabela 3 é apresentado o protocolo de ciclagem utilizado pelo Laboratório de Microbiologia e sugerido pelos fabricantes dos Mix e Primers/Probes utilizados. Temperaturas e passos podem variar de acordo com o mix utilizado, apenas a temperatura de anelamento dos primers (55°C) deve ser obrigatoriamente mantida.

Tabela 3: Protocolo de amplificação para detecção do SARS-CoV-2 por RT-qPCR usando as regiões alvo N1 e N2

Passo	Temperatura	Tempo
Incubação para transcrição reversa (RT)	50°C	10 min
Ativação da enzima	95°C	2 min
Amplificação*	95°C	3s
	55°C	30 s

*45 ciclos

Após programar as etapas de ciclagem, os dados da fluorescência (FAM) devem ser coletados no passo de 55°C, conforme apresentado na Figura 5.

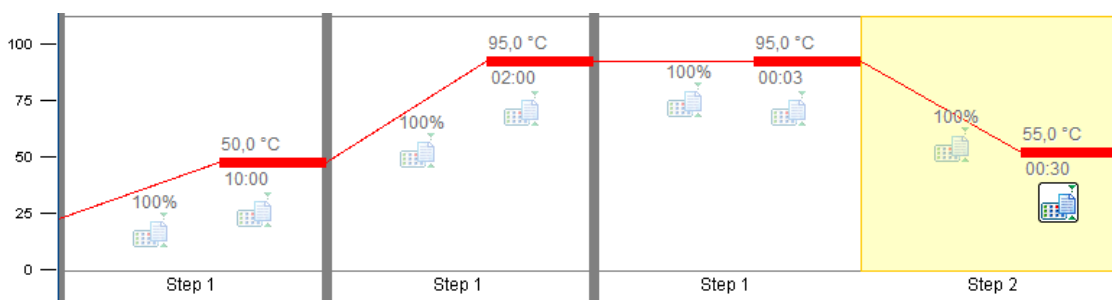


Figura 5: Etapas de ciclagem na reação de amplificação via qPCR

Observações:

1. Todos os alvos (N1, N2 e RNaseP) utilizados neste protocolo possuem o mesmo programa de amplificação e a mesma temperatura de anelamento, portanto podem ser colocados na mesma placa. Porém, as reações devem ser preparadas separadamente.
2. Cada laboratório deve definir o número de replicatas por amostras a serem testadas conforme seus procedimentos internos.
3. Todas as placas devem conter um controle negativo (NTC, sem DNA) para controlar a presença de contaminação do ambiente.

2.5 Interpretação dos resultados

2.5.1 Controles

No Template Control (NTC)

O NTC consiste no uso de água livre de nuclease nas reações de RT-qPCR em vez de RNA. As reações NTC para todos os conjuntos de primers e sondas não devem exibir curvas de crescimento de fluorescência que cruzem a linha do *Threshold*. Se qualquer uma das reações NTC exibir uma curva de crescimento que ultrapasse o limite do ciclo, pode ter ocorrido contaminação. Nessa situação, a corrida deve ser invalidada e o ensaio repetido, seguindo rigorosamente os cuidados citados no protocolo.

Controle interno da reação (Hs_RPP30 Positive Control ou RNase P)

O RNase P consiste em material celular humano cultivado não infeccioso (tratado com beta-propiolactona). É utilizado para demonstrar a recuperação bem-sucedida do RNA, bem como a integridade do reagente de extração. O ácido nucleico purificado deve produzir um resultado positivo com o primer/sondas RP e resultados negativos com todos os marcadores 2019-nCoV. Deve ser feito com todas as amostras. Caso não amplifique (resultado negativo), recomenda-se investigar a presença de inibidores nas amostras de esgoto, repetir a análise diluindo a amostra (diluição de inibidores) ou repetir a extração do RNA.

Controles Opcionais

Em relação aos controles positivo e negativo SARS e MERS, os quais são opcionais, seguem algumas considerações:

- O **MERS-CoV Control** não é alvo para nenhum dos primers e sondas contidos nos kits e deve ter resultado NEGATIVO para todas as regiões.
- O **SARS-CoV Control** possui apenas o alvo para os primers e sondas contidos para o N3 e deve ser POSITIVO para a região N3 e NEGATIVO para as regiões N1 e N2.

- Apesar dos Controles SARS e MERS serem opcionais, eles são importantes pois comprovam a especificidade e sensibilidade das reações para os primers/sondas escolhidos.

2.5.2 Análise dos Resultados Qualitativos

Na Tabela 4 é apresentada a forma de interpretação dos resultados do RT-qPCR, já levando em consideração a atualização do CDC que remove a região N3 da análise.

Tabela 4: Interpretação dos resultados de amplificação

Regiões alvo 2019 nCOV_N1	Regiões alvo 2019 nCOV_N2	RP*	NTC** (branco)	Resultado	Interpretação do resultado
+	+	+	-	Ct*** < 40 SARS-CoV2 Detectado	Positivo
-	-	+	-	Ct > 40	Negativo
+	-	+	-	SARS-Cov2 Detectado	Positivo para o alvo N1
-	+	+	-	SARS-Cov2 Detectado	Positivo para o alvo N2
-	-	-	-	Inválido, pois não amplificou com o RP*	Inválido

* RP: RNAse P – **Controle interno da reação**, material celular humano cultivado não infeccioso. Quando isso acontece pode-se refazer a reação de amplificação usando uma alíquota de RNA viral diluída 10x (assim dilui-se eventuais substâncias inibidoras da reação).

** NTC: corresponde ao branco da reação de RT-qPCR, pois utiliza-se água livre de nucleases.

***Ct - *Ciclo Threshold*

Observação:

Resultados Falso Negativos podem ocorrer devido à baixa quantidade de vírus presentes na amostra, devido a problemas na coleta, transporte ou manuseio. O limite de detecção do teste deve ser estabelecido por cada laboratório levando em consideração todas as variáveis envolvidas. **No presente projeto, o limite de detecção (determinado com a curva padrão elaborada a partir da diluição do controle positivo) foi de 2 cópias por µL de reação de RT-qPCR para ambos os alvos (N1 e N2), e o limite de quantificação observado (ou seja, a menor concentração do RNA viral determinada na amostra de esgoto) foi de 0,03 e 0,06 número de cópias por mL para N1 e N2, respectivamente.**

2.5.3 Análise dos Resultados Quantitativos

Para o cálculo do número de cópias dos genes por reação, utilizam-se as equações da reta obtidas a partir das Curvas Padrão. Por meio da equação da reta, obtém-se a quantidade em n° de cópias de RNA por reação das amostras investigadas. A exportação da planilha Excel com os resultados já nos apresenta os valores por reação, sendo necessário apenas padronizar o **Fator de Conversão** para as amostras.

A quantidade de RNA por mL de amostra de esgoto é obtida a partir do **Fator de Conversão** do resultado do número de cópias por reação e o volume de amostra que foi filtrado. A seguir é apresentado um exemplo referente à determinação do N° de cópias/mL de amostra filtrada de esgoto (resultado final).

Etapas:

- Resultado da reação qPCR (5 µL da amostra) → $9,5 \times 10^1$ cópias
- Eluição: 100 µL (volume no qual o RNA foi ressuscitado) → $20 \times 9,5 \times 10^1$ cópias
- Volume filtrado: 50 mL → $(20 \times 9,5 \times 10^1 \text{ cópias}) / 50$

Fator de Conversão = 0,4

Resultado final em N° cópias/mL de amostra filtrada → $3,8 \times 10^1$ cópias/mL*

* Para obter os resultados em N° de cópias/mL de amostra de esgoto, basta calcular o Fator de Conversão e multiplicar o valor obtido no equipamento por reação pelo Fator de Conversão.

2.5.4 Controle de Qualidade dos Resultados

A fim de garantir resultados de qualidade e com alta confiabilidade, torna-se importante observar os seguintes aspectos principais, relacionados a procedimentos gerais de análises para os experimentos quantitativos e qualitativos.

- Deve-se realizar a análise cuidadosa de cada corrida, conforme os princípios teóricos da técnica de qPCR. O *Threshold* deve ser posicionado no ponto correspondente à máxima eficiência dentro da fase exponencial e deve ser configurado/estabelecido para cada primer/sonda (N1, N2 e RP). Portanto, a função *Auto Threshold* deve ser desabilitada.
- Para os experimentos com Curva Padrão Absoluta é possível verificar os parâmetros: Slope, Y-intercept, R^2 e eficiência. É desejado um valor de slope = $-3.3 \pm 10\%$ (100%). Um Y-intercept entre 33 – 37 e um $R^2 \geq 0.99$. Cabe ressaltar que o correto posicionamento do *Threshold* na fase exponencial e a correta análise do *baseline* serão fundamentais para a obtenção dos valores acima destacados. É aceitável uma eficiência de 90% a 110%.
- Para a análise das réplicas (triplicatas técnicas), o ideal é que o desvio padrão do Ct seja de no máximo 0,5. Caso seja maior, repetir o RT-qPCR da amostra. Observar se não existem inibidores na amostra ou algum problema ocorrido na extração. No caso de inibidores, sugere-se diluir a amostra.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Encontram-se descritos no presente Protocolo os métodos utilizados para concentração de partículas virais a partir de amostras de esgoto (bruto e tratado) e água de córregos e rios. Também foram apresentadas as informações sobre a quantificação do material genético viral a partir das amostras concentradas pela técnica de RT-qPCR, seguindo recomendações da CDC (Centro de Prevenção e Controle de Doenças, 2020 dos Estados Unidos). A adequabilidade deste protocolo vem sendo demonstrada no âmbito do *Projeto-piloto: Detecção e quantificação do novo coronavírus em amostras de esgoto nas cidades de Belo Horizonte e Contagem*. Os resultados de determinação das concentrações obtidas foram apresentados no boletim temático 2 (ver Boletim Temático N. 2 - <https://etes-sustentaveis.org/monitoramento-covid-esgotos/>).

Notas:

1-Para manipulação das amostras de esgoto e realização da análise de RT-PCR para detecção do material genético do vírus, deve-se seguir o Protocolo de Biossegurança disponibilizado pelo Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC-EUA) disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab-biosafety-guidelines.html>).

2-Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os procedimentos de segurança para proteção dos usuários contra os vírus e outros patógenos presentes no esgoto rotineiramente adotados em laboratórios e demais lugares onde há manuseio de amostras de esgoto (como estações de tratamento de esgoto doméstico), também são válidos para o vírus SARS-CoV-2, causador da Covid-19 (*Water, sanitation, hygiene, and waste management for the COVID-19 virus: interim guidance*).

4 REFERÊNCIAS

- Ahmed W., Harwood V.J., Gyawali P., Sidhu J. P. S., Toze S. 2015 Comparison of concentration methods for quantitative detection of sewage-associated viral markers in environmental waters. *Applied and Environmental Microbiology*, **81**(6), 2042-2049. DOI: 10.1128/AEM.03851-14
- Ahmed W., Angel N., Edson J., Bibby K., Bivins A., O'Brien J. W., Choi P. M., Kitajima M., Simpson S. L., Li, J., Tscharke, B., Verhagen, R., Smith, W. J. M., Zaugg, J., Dierens, L., Hugenholtz, P., Thomas, K. V., Mueller, J. F. 2020a. First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *Science of the Total Environment*, **728**(138764), 1-8. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.138764
- Ahmed W., Bertsch P.M., Bivins A., Bibby K., Farkas K., Gathercole A., Haramoto E., Gyawali P., Korajkic A., McMin B. R., Mueller J. F., Simpson S. L., Smith W. J. M., Symonds E. M., Thomas K. V., Verhagen R., Kitajima M. 2020b Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. *Science of the Total Environment*, **739**(139960), 1-8. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.139960
- Asghar H., Diop O.M., Weldegebriel G., Malik F., Shetty S., Bassioni L. E., Akande A. O., Maamoun E.A., Zaidi S., Adeniji A. J., Burns C. C., Deshpande J., Oberste M. S., Lowther S. A. 2014 Environmental surveillance for polioviruses in the global polio eradication initiative. *The Journal of Infectious Diseases*, **210**(S1), S294–303. DOI: 10.1093/infdis/jiu384
- Bar-Or, I., Yaniv, K., Shagan, M., Ozer, E., Erster, O., Mendelson, E., Mannasse, B., Shirazi, R., Kramarsky-Winter, E., Nir, O., Abu-Ali, H., Ronen, Z., Rinott, E., Lewis, Y.E., Friedler, E., Bitkover, E., Paitan, Y., Berchenko, Y., Kushmaro, A., 2020. Regressing SARS-CoV-2 sewage measurements onto COVID-19 burden in the population: a proof-of concept for quantitative environmental surveillance. medRxiv <https://doi.org/10.1101/2020.04.26.20073569>
- Berchenko Y., Manor Y., Freedman L.S., Kaliner E., Grotto I., Mendelson E., Huppert A. 2017 Estimation of polio infection prevalence from environmental surveillance data. *Science Translational Medicine*, **9**(383), 6786. DOI:10.1126/scitranslmed.aaf6786
- Center for Disease Control and Prevention. 2019-Novel coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR panel primers and probes. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html> (accessado em 12 Maio, 2020).
- Chernicharo, C.A.L.; Araújo, J.C.; Mota Filho, C.R.; Bressani-Ribeiro, T. ; Chamhum-Silva, L. A.; Leal, C.D. ; Leroy, D. ; Machado, E.; Cordero, M.F.E. ; Azevedo, L. S.; Fernandes, L.; Leão, T.; Laguardia, F.2 ; Reis, M.T.P. 3 ; Melo, M.C.; Ayrimoraes, S.R. 2020. Monitoramento do Esgoto como ferramenta de vigilância epidemiológica para controle da COVID-19: Estudo de caso na cidade de Belo Horizonte. ESA-edição especial-Covid-19, 31 de julho de 2020.
- Espinosa M. F. Occurrence and removal of enteric viruses, SARS-CoV-2 and viral and fecal indicators in wastewater treatment plants. Tese de Doutorado (em preparação)
- Haramoto E., Kitajima M., Katayama H., Ito T., Ohgaki S. 2009 Development of virus concentration method for detection of koi herpesvirus in water. *Journal of Fish Diseases* **32**(3), 297-300. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2008.00977.x
- Haramoto E., Malla B., Thakalib O., Kitajima M. 2020 First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and river water in Japan. *Science of The Total Environment* **737**, 140405. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.140405
- Hellmér M., Paxéus N., Magnius L., Enache L., Arnholm B., Johansson A., Bergström T., Norder H. 2014 Detection of pathogenic viruses in sewage provided early warnings of hepatitis A virus and norovirus outbreaks. *Applied and Environmental Microbiology* **80**(21): 6771–6781. DOI: 10.1128/AEM.01981-14
- Kitajima M., Ahmed W., Bibby K., Carducci A. L., Gerba C. P., Hamilton K. A., Haramoto E., Rose J. B. 2020 SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs. *Science of the Total Environment* **739**(139076): 1-19. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.139076
- Kocamemi, B.A., Kurt, H., Hacio, S., Yarali, C., Saatci, A.M., Pakdemirli, B., 2020. First dataset on SARS-CoV-2 detection for Istanbul wastewaters in Turkey. medRxiv <https://doi.org/10.1101/2020.05.03.20089417>.

- Katayama, H., Shimasaki, A., Ohgaki, S., 2002. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1033–1039. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1033-1039.2002>
- La Rosa, G., M. Iaconelli, P. Mancini, Ferraro, G.B., Veneri, C., Bonadonna L., Lucentini, L., Suffredini, E. 2020 First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. *Science of the Total Environment* 2020, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139652>
- Medema, G., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R., 2020. Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in sewage and correlation with reported COVID-19 prevalence in the early stage of the epidemic in the Netherlands. *Environ. Sci. Technol. Lett.* <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00357>.
- Nemudryi, A., Nemudraia, A., Surya K., Wiegand T., Buyukyoruk M., Wilkinson, R., Wiedenhelft, B. 2020. Temporal detection and phylogenetic assessment of SARS-CoV-2 in municipal wastewater. <https://doi.org/10.1101/2020.04.15.20066746>.
- Paul, J., Trask, J 1941. The virus of poliomyelitis in stools and sewage. *JAMA*. 1941;116(6):493-498. doi:10.1001/jama.1941.02820060041009
- Peccia, J., Zulli, A., Brackney D.E., Grubaugh N.D., Kaplan, E., Casanovas-Massana A., Ko, A.I., Malik A.A., Wang, D., Wang, M., Weinberger, D.M., Omer S.B. 2020 SARS-CoV-2 RNA concentrations in primary municipal sewage sludge as a leading indicator of COVID-19 outbreak dynamics. medRxiv doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.19.20105999>.
- Peccia, J., Zulli, A., Brackney, D.E. et al. 2020. Measurement of SARS-CoV-2 RNA in wastewater tracks community infection dynamics. *Nat. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0684-z>
- Prado, T., Fumian, T., Mannarino, C., Maranhão, A., Siqueira M., Miagostovich, M.P. 2020. Preliminary results of SARS-CoV-2 detection in sewerage system in Niterói municipality, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 115: e200196.
- Randazzo, W., Cuevas-Fernando, E., Sanjuan, R., Domingo Calap, P., Sanchez G. 2020a Metropolitan Wastewater Analysis for COVID-19 Epidemiological Surveillance. medRxiv doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.23.20076679>.
- Randazzo, W., Truchado P., Cuevas-Fernando, E., Simon, P., Allende A., Sanchez G. 2020b SARS-CoV-2 RNA Titers in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. medRxiv doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.22.20075200>.
- Rimoldi, A.G., Stefani, F., Gigantiello, A., Polesello, S., Comandatore, F., Mileto, D., Maresca, M., Longobardi, C., Mancon, A., Romeri, F., Pagani, C., Moja L., Gismondo, M., Salerno F. 2020 Presence and vitality of SARS-CoV-2 virus in wastewaters and rivers. medRxiv doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.01.20086009>
- Symonds, E. M., Verbyla, M. E., Lukasik, J. O., Kafle, R. C., Breitbart, M., Mihelcic, J. R. 2014 A case study of enteric virus removal and insights into the associated risk of water reuse for two wastewater treatment pond systems in Bolivia. *Water Res.* 65, 257–270.
- Teixeira, D.M., Spada, P.K.P., Morais, L.L., Fumian, T.M., Lima, I.C.G., Oliveira, D., Bandeira, R., Gurjao, T.C., Sousa, M., Mascarenhas, J.D., Gabbay, Y.B. 2017 Norovirus genogroups I and II in environmental water samples from Belém city, Northern Brazil. *J. Water and Health* 15 (1): 163-174.
- Wu, F., Xiao, A., Zhang, J., Gu, X., Lee, W., Kauffman, K., Hanage, W., Matus, M., Ghaeli, N., Endo, N., Duvallet, C., Moniz, K., Erickson, T., Chai, P., Thompson, J., Alm, E., 2020a. SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.04.05.20051540>.
- Wurtzer et al., 2020a. Time course quantitative detection of SARSCoV2 in Parisian wastewaters correlates with COVID-19 confirmed cases. <https://doi.org/10.1101/2020.04.12.20062679>doi: medRxiv preprint.
- Wurtzer et al. 2020b. Evaluation of lockdown impact on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in Paris wastewaters. medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.04.12.20062679>.
- Ye, Y., Ellenberg, R.M., Graham K.E., Wigginton, K.R. 2016. Survivability, Partitioning, and Recovery of Enveloped Viruses in Untreated Municipal Wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 50, 5077–5085. doi: 10.1021/acs.est.6b00876

ANEXO

Sequências dos primers, sondas e controles utilizados conforme o CDC (Center for Disease Control and Prevention, 2019)

As cores foram utilizadas para diferenciar e localizar a sequência de cada primer dentro do genoma do vírus.

2019-nCoV_N1-F 2019-nCoV_N1 **GACCCCAAATCAGCGAAAT**

2019-nCoV_N1-R 2019-nCoV_N1 **TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG**

2019-nCoV_N1-P 2019-nCoV_N1 **ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC**

2019-nCoV_N2-F 2019-nCoV_N2 **TTACAAACATTGGCCGCAAA**

2019-nCoV_N2-R 2019-nCoV_N2 **GCGCGACATTCCGAAGAA**

2019-nCoV_N2-P 2019-nCoV_N2 **ACAATTTGCCCCAGCGCTTCAG**

RP-F_RNAseP_Forward **AGATTTGGACCTGCGAGCG**

RP-R_RNAseP_Reverse **GAGCGGCTGTCTCCACAAGT**

RP-P_RNAseP_Probe **TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG**

>2019-nCoV_N_Positive Control:

ATGTCCTGATAATG**GACCCCAAATCAGCGAAATGACCCCGCATTACGTTTGGTGGACCC****TCAGATTCAACTGGCAGTAACCAGA**ATGGAGAACGCAGTGGG
GCGCGATCAAAACAACGTCGGCCCCAAGGTTTACCCAATAATACTGCGTCTTGGTTTACCCTCTCACTCAACATGGCAAGGAAGACCTTAAATTCCTCGA
GGACAAGGCGTTCCAATTAACACCAATAGCAGTCCAGATGACCAAAATGGCTACTACCGAAGAGCTACCAGACGAATTCTGGTGGTGACGGTAAAAATGAAA
GATCTCAGTCCAAGATGGTATTTCTACTACCTAGGAAGCTGGCCAGAAGCTGGACTTCCCTATGGTGCTAACAAAGACGGCATCATATGGGTTGCAACTGAG
GGAGCCTTGAATACACCAAAAGATCAGATTGGCACCAGCAATCCTGCTAA**CAATGCTGCAATCGTGCTACA**ACTTCCCTCAAGGAACAACATTGCCAAAAGGC
TTCTACGCAGAAGGGAGCAGAGGGCGGAGTCAAGCCTCTTCTCGTTCTCATCAGTAGTCGCAACAGTTCAAGAAATCAACTCCAGGCAGCAGTAGGGGA
ACTTCTCTGCTAGAAATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTTGTGTTGCTGCTGCTTGACAGATTGAACAGCTTGAGAGCAAAATGTCTGGTAAAGGC
CAACAACAACAGGGCCAACTGTCTACTAAGAAATCTGCTGCTGAGGCTTCTAAGAAGCCTCGGCAAAAACGTAAGTCCACTAAAGCATAAATGTAACACAA
GCTTTTCGGCAGACGTGGTCCAGAACAAACCCAGGAATTTTGGGGACAGGAACATAATCAGACAAGGAAGTGA**TTACAAACATTGGCCGCAAA**TTGC**ACAA**
TTTGGCCCCAGCGCTTCAGCGTTCTTCGGAATGTCGCGCATTGGCATGGAAGTCACACCTTCGGGAACGTGGTTGACCTACACAGGTGCCATCAAATTTGGAT
GACAAAGATCCAAATTTCAAAGATCAAGTCATTTTGTGAATAAGCATATTGACGCATACAAAACATTCCACCAACAGAGCCTAAAAAGGACAAAAAGAA
AAGGCTGATGAACTCAAGCCTTACCGCAGAGACAGAAGAAACAGCAAACTGTGACTCTTCTTCTGCTGCAGATTGGATGATTTCTCAAACAATTGCAA
CAATCCATGAGCAGTGTGACTCAACTCAGGCCTAA

Hs_RPP30_Positive Control:

GGACTTCAGCATGGCGGTGTTTGC**AGATTTGGACCTGGGAGCGGGTTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCGGACTTGTGGAGACAGCCGCT**CACCGTGAGTTGCG
GTCTCCAGAGTCTCTGGGATGTCCCTGGAGGCTGATG

>SARS_CoV_Control

ATGTCCTGATAATGGACCCCAAACCAACGTAAGTGCACCCCGCATTACATTTGGTGGACCCCTCAGATTCAAGTGACAATAGCAAAAACGGAGAGCGCAATGGT
GCACGACCTAAACAACGTCGACCCCAAGGCTTACCCAATAATACTGCTCTTGGTTTACCCTCTCACTCAACATGGCAAGGAACCTTACGTTCCCTCGA
GGGCAAGGTGTTCCAATTAACACCAATAGCTCTAAAGATGACCAAAATGGCTACTACCGTAGAGCTACCAGACGAATTCTGGTGGTGACGGTAAAAATGAAA
GAGCTCAGCCCCAGATGGTATTTTACTATCTAGGAAGCTGGACCAGAAGCTGGACTTCCCTATGGTGCTAACAAAGAAGGCATCATATGGGTTGCAACTGAG
GGAGCCTTAAACACACCGAAAGACCACATTGGCACCAGCAATCCTGCTAA**CAATGCTGCAATCGTGCTACA**ACTTCCCTCAAGGAACAACATTGCCAAAAGGC
TTCTACGCAGAAGGGAGCAGAGGGCGGAGTCAAGCCTTCTTACGCTCCTCATCAGTAGTCGCAACAGTTCAAGAAATCAACTCCAGGCAGCAGTAGGGGA
ACTTCTCTGCTAGAAATGGCTGGCAATGGCGGTGACACTGCTCTTGTGTTGCTGCTGCTAGATAGGTTGAACAGCTTGAGAACAAAGTATCTGGCAAGGC
CAACAACAACAGGGCCAACTGTCTACTAAGAAATCTGCTGCTGAGGCTTCTAAGAAGCCTCGGCAAAAACGTAAGTCCACTAAAGCATAAATGTAACACAA
GCATTTGGGAGACGTGGTCCAGAACAAACCCAGGAATTTTGGGGACCAAGAAATTAATCAGACAAGGAAGTGA**TTACAAACATTGGCCGCAAA**TTGC**ACAA**
TTTGTCTCAAGTGCTCTGCTATCTTTGGAATGTCACGCATTGGCATGGAAGTCACACCTTCGGGAACATGGCTGACTTATCATGGAGCCATTAAATTTGGAT
GACAAAGATCCAAATTTCAAAGATCAAGTCATTTTGTGAATAAGCATATTGACGCATACAAAACATTCCACCAACAGAGCCTAAAAAGGACAAAAAGAA
AAGGCTGATGAACTTCAAGCCTTACCGCAGAGACAGAAGAAACAGCAAACTGTGACTCTTCTTCTGCTGCAGATTGGATGATTTCTCAAACAATTGCAA
CAATCCATGAGTGGTACTGATTCAACCCAGGCTTAA

>MERS_CoV_Control

ATGGCATCCCCTGCTGCACCTCGTGCTGTTTCCTTTGCCGATAACAATGATATAACAAATACAAACCTATCTCGAGGTAGAGGACGTAATCCAAAACCACGA
GCTGCACCAAATAACACTGTCTCTTGGTACACTGGGCTTACCCAACACGGGAAAGTCCTCTTACCTTCCACCTGGGCAGGGTGTACCTCTTAATGCCAAT
TCTACCCCTGCGCAAAATGCTGGGTATTGGCGGAGACAGGACAGAAAAATTAATACCGGGAATGGAATTAAGCAACTGGCTCCCAGGTGGTACTTCTACTAC
ACTGGAAGTGGACCCGAAGCAGCACTCCCATTCGCGGCTGTTAAGGATGGCATCGTTTGGGTCCATGAAGATGGCGCCACTGATGCTCCTTCAACTTTTGGG
ACGCGGAACCCTAACAATGATTAGCTATTGTTACACAATTGCGCGCCCGTACTAAGCTTCTTAAAACTTCCACATTGAGGGGACTGGAGGCAATAGTCAA
TCATCTTCAAGAGCCTCTAGCTTAAGCAGAACTCTTCCAGATCTAGTTCACAAGGTTCAAGATCAGGAACTCTACCCGCGGCACCTTCCAGGTCCATCT
GGAATCGGAGCAGTAGGAGGTGATCTACTTTACCTTGATCTTCTGAACAGACTACAAGCCCTTGAGTCTGGCAAAGTAAAGCAATCGCAGCCAAAAGTAATC
ACTAAGAAAGATGCTGCTGCTGCTAAAAATAAGATGCGCCACAAGCGCACTTCCACCAAAAGTTCAACATGGTGCAAGCTTTTGGTCTTCGCGGACCAGGA
GACCTCCAGGGAACTTTGGTGATCTTCAATTGAATAAACTCGGCACTGAGGACCCACGTTGGCCCCAAATTGCTGAGCTTGCTCCTACAGCCAGTGCTTTT
ATGGGTATGTCGCAATTTAACTTACCCATCAGAACAATGATGATCATGGCAACCCTGTGTACTTCTTCGGTACAGTGGAGCCATTAACTTGACCCAAAG
AATCCCACTACAATAAGTGGTGGAGCTTCTTGAGCAAAATATTGATGCCTACAAAACCTTCCCTAAGAAGGAAAAGAAACAAAGGCACCAAAAGAAGAA
TCAACAGACCAAAATGTCTGAACCTCCAAAGGAGCAGCGTGTGCAAGGTAGCATCACTCAGCGCACTCGCACCCGTCGAAGTGTTCAGCCTGGTCCAATGATT
GATGTTAACACTGATTAG

