



DESENVOLVIMENTO, IMPLANTAÇÃO E AVALIAÇÃO DE UM PROGRAMA DE MONITORAMENTO DE TEMPERATURA DE TERMOCICLADORES

Elisa Abreu Santos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientadores: Rosimary Terezinha de Almeida

Roberto Macoto Ichinose

Rio de Janeiro

Abril de 2019

DESENVOLVIMENTO, IMPLANTAÇÃO E AVALIAÇÃO DE UM PROGRAMA
DE MONITORAMENTO DE TEMPERATURA DE TERMOCICLADORES

Elisa Abreu Santos

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA BIOMÉDICA.

Examinada por:

Prof. Rosimary Terezinha de Almeida, PhD.

Prof. Carlos Julio Tierra Criollo, DSc.

Prof. Cinthya Sternberg, DSc.

Prof. Eduardo Vieira Neto, DSc.

Prof. Roberto Carlos Lyra da Silva, DSc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

ABRIL DE 2019

Santos, Elisa Abreu

Desenvolvimento, Implantação e Avaliação de um Programa de Monitoramento de Temperatura de Termocicladores/ Elisa Abreu Santos. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2019.

XIV, 78 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Rosimary Terezinha de Almeida

Roberto Macoto Ichinose

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Biomédica, 2019.

Referências Bibliográficas: p. 56-64.

1. Avaliação de Tecnologia Biomédica. 2. Engenharia Clínica. 3. Laboratório de Biologia Molecular. 4. Termociclador. 5. PCR. I. Almeida, Rosimary Terezinha de, *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Biomédica. III. Título.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,
Leny e Ronaldo, *in memoriam*.
Por amor e por tudo que vivemos juntos.

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são”.
(Aristóteles)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por toda a benção em minha vida.

Ao Celso pelo seu amor, paciência, estímulo e apoio que foram essenciais para a condução deste estudo. Agradeço por ser meu porto seguro nessa jornada.

Aos meus estimados professores Rosimary Almeida e Roberto Macoto pelos ensinamentos e pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Muito obrigada.

Aos professores da banca avaliadora pelas valiosas contribuições na finalização da tese.

À Dra. Cinthya Sternberg pelo impulso inicial ao presente trabalho, com o apoio à realização dos ensaios para a avaliação de termocicladores do laboratório de Pesquisa Clínica do INCA e as estimulantes conversas sobre biologia molecular.

À Dra. Eliana Abdelhay pelo incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho, pela confiança e oportunidade de convívio nos laboratórios do CEMO/INCA, pela orientação e leitura crítica em parcela desse estudo.

À Dra. Ilana Renault e a todas as biólogas do laboratório de Biologia Molecular do CEMO/INCA, especialmente a Telma e a Luciana sempre próximas e atenciosas.

Ao Dr. Miguel Moreira e ao Dr. Gustavo Stefanoff por acreditarem no trabalho e por disponibilizarem os termocicladores dos laboratórios de Genética e do Banco Nacional de Tumores para as avaliações iniciais do Programa no Centro de Pesquisa do INCA.

Aos meus colegas da Engenharia Clínica do INCA por estarmos juntos nos momentos críticos: Peter, Edson, Flávio, Marcos, Quintanilha, Marcelo, Adail, Abdala e Gilberto. E também aos técnicos que participaram do Programa: Carlos, Raphael, Diego, Vinícius, Paulo, Sirdilei e Ayrton.

Aos colegas do LESS/PEB pela companhia, pela força e delicadeza demonstradas no dia a dia, e em suas histórias de vida. E, claro, obrigada pelas muitas comidinhas deliciosas que saboreamos juntos: Rogério, Aline, Mariá, Alfonso, Sulafa, Letícia, Cesar, Karla. Agradeço também ao Alex e a Lúcia, sempre presentes e prestativos.

Às minhas irmãs e aos meus sobrinhos por serem cúmplices em minha vida, e também, a Eliana que nas horas vagas veio a ser a “minha farmacêutica de plantão”.

Sou grata a todos que de algum modo incentivaram a realização deste trabalho.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

DESENVOLVIMENTO, IMPLANTAÇÃO E AVALIAÇÃO DE UM PROGRAMA
DE MONITORAMENTO DE TEMPERATURA DE TERMOCICLADORES

Elisa Abreu Santos

Abril/2019

Orientadores: Rosimary Terezinha de Almeida

Roberto Macoto Ichinose

Programa: Engenharia Biomédica

Esta tese teve por objetivo desenvolver, implantar e avaliar a efetividade de um programa de monitoramento de temperatura de termocicladores em laboratório de biologia molecular. Para garantir a qualidade da medição de temperatura, foi necessário adaptar um analisador de termociclador e criar procedimentos para realizar as medições. O Programa foi implantado em 11 laboratórios do Instituto Nacional de Câncer (INCA), em um total de 41 termocicladores, dos quais 44% estavam inadequados ao uso. O *número de exames com recomendação para repetir* foi utilizado como indicador de efetividade do Programa. Foram avaliadas duas amostras, com 102 e 141 exames, obtidas em 2011 e 2013, respectivamente antes e depois da implantação do Programa. Houve redução de 18,9 pontos percentuais no número de exames. Em entrevista com profissionais, não foi relatada alteração nos demais fatores determinantes do desempenho do exame rearranjo t(9;22) BCR/ABL, nesse período. O custo operacional de repetição de exames foi estimado para a produção de exames em laboratórios do INCA e para a produção no âmbito do Sistema Único de Saúde. Esses achados são um alerta quanto à necessidade de verificação sistemática da temperatura do termociclador, às vezes negligenciada devido à confiança depositada no equipamento.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

DEVELOPMENT, IMPLEMENTATION AND EVALUATION OF A PROGRAM OF
MONITORING TEMPERATURE OF THERMOCYCLERS

Elisa Abreu Santos

April/2019

Advisors: Rosimary Terezinha de Almeida

Roberto Macoto Ichinose

Department: Biomedical Engineering

This study aimed to develop, implement and evaluate the effectiveness of a thermocycler temperature monitoring program in a molecular biology laboratory. It was necessary to adapt a thermocycler analyzer and create procedures to ensure the quality of the temperature measurement. The program was implemented in 11 laboratories of the Brazilian National Cancer Institute (INCA), in a total of 41 thermocyclers, of which 44% were unsuitable for use. The number of tests with a recommendation to be repeated was used as an indicator of program effectiveness. Two data samples obtained before and after the program's implementation, with 102 and 141 tests from 2011 and 2013 respectively were evaluated. There was a reduction of 18.9 percentage points in the number of tests. In the interview with the staff, there were no change in the other determinants of the performance of the test t(9;22) BCR/ABL gene rearrangement in this period. The operational cost of repeating the test was estimated for the INCA laboratories and within the Unified Health System (SUS). These findings have warned about the need for systematic verification of the temperature of thermocyclers, which is sometimes neglected due to the trust placed in the equipment.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVO	5
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	6
3.1	A reação em cadeia da polimerase	6
3.1.1	<i>Exemplo de aplicação</i>	11
3.2	Os termocicladores	12
3.2.1	<i>Características dos termocicladores</i>	13
3.2.2	<i>Termociclador em um laboratório de biologia molecular</i>	14
4	REVISÃO DA LITERATURA	16
5	MATERIAIS E MÉTODOS	22
5.1	Pré-implantação do programa de monitoramento de temperatura de termocicladores	23
5.1.1	<i>Procedimentos para a avaliação do sistema de medição da temperatura</i>	23
5.1.2	<i>Avaliação dos fatores que influenciam na medição de temperatura do termociclador</i>	27
5.1.3	<i>Contribuições das fontes de incertezas de medição</i>	29
5.1.4	<i>Procedimentos do monitoramento de termocicladores</i>	30
5.2	Implantação do monitoramento de temperatura de termocicladores	34
5.3	Avaliação da efetividade do monitoramento de temperatura de termocicladores	35
5.3.1	<i>Seleção do cenário</i>	35
5.3.2	<i>Levantamento das condições dos fatores determinantes da otimização da PCR</i>	35
5.3.3	<i>Desfechos da efetividade do monitoramento de temperatura de termocicladores</i>	37
5.3.4	<i>Estimativa de custo operacional de repetição de exames</i>	38
6	RESULTADOS	43
6.1	Implantação do programa de monitoramento de temperatura de termocicladores	43
6.2	Avaliação da efetividade do monitoramento de temperatura de termocicladores	43
6.2.1	<i>Condições dos fatores determinantes da PCR</i>	43
6.2.2	<i>Desfechos da efetividade do monitoramento de temperatura de termocicladores</i>	45
6.2.3	<i>Estimativa de custo operacional de repetição de exames</i>	48
7	DISCUSSÃO	50
8	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56
	APÊNDICE A: Trabalho Publicado	65
	APÊNDICE B: Estimativas de Incerteza de Medição Expandida	70
	APÊNDICE C: Conceitos Básicos para Avaliar a Incerteza de Medição	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do DNA.	6
Figura 2: Descrição do processo PCR, com as etapas de desnaturação, anelamento e extensão.	8
Figura 3: Diagrama exemplificando a amplificação exponencial da reação PCR.	10
Figura 4: Foto de bloco termoelétrico de 96 poços destacando o bloco de amostras e o dissipador térmico.	13
Figura 5: Ilustração dos componentes básicos de um bloco termoelétrico com 2 células <i>Peltiers</i>	13
Figura 6: Áreas independentes e fluxo do processo de realização de um exame por PCR.	15
Figura 7: Fatores básicos determinantes da qualidade da PCR.	17
Figura 8: Evolução temporal das etapas do trabalho.	22
Figura 9: Descrição das etapas básicas do trabalho.	23
Figura 10: Placa com sensores do instrumento analisador de termociclador, modelo TAS, sendo posicionada no bloco térmico de um termociclador, para medição com tampa do termociclador aberta.	24
Figura 11: Ilustração de um sensor adaptado.	25
Figura 12: Instrumento analisador de termociclador preparado para a medição da temperatura com a tampa fechada do termociclador modelo Veriti, marca Applied Biosystems®.	25
Figura 13: Fatores que influenciam na medição de temperatura do termociclador.	27
Figura 14: Identificação das fontes de incertezas de medição de temperatura do termociclador.	28
Figura 15: Diagrama de posicionamento dos 18 sensores no bloco do termociclador.	31
Figura 16: Totais das amostras de exames utilizadas para os estudos em cada período.	45
Figura 17: Gráfico com os percentuais dos exames com recomendação para repetir pelo motivo da recomendação, Amostra Inadequada e Indeterminação de Resultado.	47

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Planilha das incertezas nas medições de temperatura de termocicladores.	29
Tabela 2: Diagnóstico da análise de adequação de uso dos termocicladores da implantação do programa de monitoramento de temperatura de termocicladores.....	43
Tabela 3: Caracterização dos exames das amostras do estudo por finalidade do exame.	46
Tabela 4: Frequência observada dos desfechos e tamanho das amostras.....	46
Tabela 5: Recomendação para repetir em função da finalidade clínica do exame.....	48
Tabela 6: Exames indicados para repetição devido indeterminação do resultado, que após a repetição apresentaram resultado positivo.....	48
Tabela 7: Estimativas de custo operacional de repetição de exames.	49

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1: Critérios para a análise da adequação de uso dos termocicladores.....	33
Quadro 2: Roteiro para o levantamento das condições determinantes para a otimização da PCR no laboratório de estudo.....	36
Quadro 3: Condições dos fatores de otimização da PCR no laboratório de biologia molecular do CEMO/INCA.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABHH – Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia
ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
AMB – Associação Médica Brasileira
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAP – *College of American Pathologists*
CDC – *Center for Disease Control and Prevention*
CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*
COPPE – Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa em Engenharia
dNTPs – Desoxirribonucleotídeos Trifosfatos
DCE – Diagrama de Causa e Efeito
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
ECRI – *Emergency Care Research Institute*
EPA – *United States Environmental Protection Agency*
GUM – *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*
IEC – *International Electrotechnical Commission*
INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO – *International Organization for Standardization*
JCI – *Joint Commission International*
MSAC – *Medical Service Advisory Committee*
MS – Ministério da Saúde
NHS – *National Health Service*
NIH – *National Institutes of Health*
LMC – Leucemia Mieloide Crônica
OECD – *Organisation for Economic Co-operation and Development*
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
PEB – Programa de Engenharia Biomédica
RAPD – *Randomly Amplified Polymorphic DNA*
RBC – Rede Brasileira de Calibração
RBLE – Rede Brasileira de Laboratórios de Ensaio
RCPATH – *The Royal College of Pathologists*
RNA – Ácido Ribonucleico

RT-PCR – *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

SBI – Sociedade Brasileira de Infectologia

SIASUS – Sistema de Informação Ambulatorial do Sistema Único de Saúde

SBPC – Sociedade Brasileira de Patologia Clínica

SUS – Sistema Único de Saúde

VIM – Vocabulário Internacional de Metrologia

WHO – *World Health Organization*

1 INTRODUÇÃO

A Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, Polymerase Chain Reaction - PCR) consiste de teste *in vitro* baseado em reação bioquímica ativada por temperatura, com a finalidade de amplificar material genético em condição controlada. Representa importante técnica usada em laboratórios de biologia molecular para diversas finalidades. Na agricultura é usada em procedimentos para o melhoramento genético de espécies (BRASILEIRO, 1998; FERREIRA, 1998). No direito forense aplica-se aos testes de paternidade e testes de apoio à criminalística (BONACCORSO, 2005). Na área da saúde está amplamente presente em testes diagnósticos, como por exemplo, para a identificação das sequências gênicas ou do RNA/DNA dos vírus do HIV (BRASIL, 2013), Hepatite C (BRASIL, 2011a), Hepatite B (BRASIL, 2016a), Dengue (BRASIL, 2016b), Zika (BRASIL, 2017a), Chikungunya (BRASIL, 2015a); ou do DNA do bacilo da Tuberculose (*Mycobacterium Tuberculosis*) (BRASIL, 2011b), e ainda de rearranjos gênicos nas Leucemias (BRASIL, 2014). Em oncologia a PCR é usada em estudos de caracterizações de tumores cancerígenos; no diagnóstico e prognóstico de cânceres; no acompanhamento de tratamento de pacientes; e ainda no aconselhamento de doenças hereditárias (BRASIL, 2014; BRASIL, 2009b).

O uso de técnica PCR no diagnóstico e no prognóstico de doenças oncológicas, pode ser evidenciado no caso das Leucemias. Por exemplo, de 95% a 98% dos casos de Leucemia Mieloide Crônica (LMC) podem ser diagnosticados com exames PCRs realizados com amostra de sangue periférico dos pacientes, ou com amostra de medula óssea (AMB, 2016; BRASIL, 2015b; BRASIL, 2014; BARBOSA *et al.*, 2000; MSAC, 2004).

A PCR desde sua invenção na década de 1980 continua se destacando como um dos métodos mais difundidos de análise de DNA. BLOW (2017) destaca que quase todas as estratégias de codificação de dados de DNA dependem da PCR para amplificar ou copiar informações do DNA, ou da transcrição reversa da polimerase (do inglês, Transcriptase Reversa of Polymerase Chain Reaction - RT-PCR) para analisar RNA, como é o caso dos rearranjos BCR-ABL nas Leucemias. Nesse sentido, POTAPOV *et al.* (2017) enfatizam que muitas tecnologias de sequenciamento de nova geração (do inglês, Next Generation Sequencing - NGS) dependem da PCR como parte dos procedimentos para a preparação das amostras, e, que os erros cometidos durante a PCR

aparecem em dados de sequenciamento, contribuindo para falsas mutações, variantes fantasmas, que levam a confundir as análises genéticas.

Ainda com relação ao sequenciamento de DNA, PINTO *et al.* (2012) comentam a lacuna de estudos sobre o efeito da ineficiência da PCR para a interpretação de dados de sequenciamento, e pontua os vários fatores que afetam a otimização da PCR, tais como a escolha do *primer* e as condições de termociclagem; além da padronização correta da reação PCR e sequenciamento.

As condições de termociclagem são dadas, sobretudo, pelo termociclador, o equipamento que provê os ciclos de temperaturas necessários às reações em cadeia da polimerase. O termociclador é reconhecido como tecnologia estável e amplamente utilizada na área do diagnóstico molecular (ECRI, 2013). No entanto, apesar de sua importância, SCHODER *et al.* (2005) alertaram sobre a carência de estudos sobre o desempenho do termociclador. Alguns trabalhos discutiram o uso inapropriado do termociclador, associado à ocorrência de resultados indesejados de PCR. SCHODER *et al.* (2003) mencionaram que falhas nos padrões de resultados de PCR são atribuídos a ciclos inadequados dos termocicladores. Além disso, foram associadas ao termociclador distorções no processo RAPD-PCR (SAUNDERS *et al.*, 2001) e no processo Multiplex-PCR (KIM *et al.*, 2008).

O uso apropriado do termociclador está associado à exatidão e a uniformidade das temperaturas nos diversos poços do bloco térmico do equipamento. O controle das temperaturas na PCR é fator determinante para os desfechos dos resultados dos exames. Por exemplo, a falta de controle das temperaturas da PCR poderá levar a ocorrência de resultados falsos negativos; ou gerar resultados inconclusivos, implicando nesses casos em recomendações para a repetição do exame, e, gerando um maior gasto de insumos, tempo de pessoal qualificado, e de material de paciente, às vezes escasso e sem possibilidade de outra coleta.

A garantia da efetividade do uso do termociclador é dada essencialmente pelo controle sistemático das temperaturas nos poços do bloco térmico, conforme citado pelo Colégio Americano de Patologistas (do inglês, College of American Pathologists – CAP) (2012). Porém, a calibração de termocicladores não é atividade compulsória regulamentada no país, quer por orientação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) ou do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO).

O processo regulatório da ANVISA estabelece a obrigatoriedade do Registro do equipamento termociclador para fins de comercialização no Brasil. O Manual para Regularização de Equipamentos Médicos na ANVISA estabelece a Classe I para o enquadramento de risco sanitário do termociclador (BRASIL, 2009a). Nesta classe não são exigidos certificados de calibração para o registro de equipamentos. Assim, não há laboratório acreditado na Rede Brasileira de Calibração (RBC/INMETRO) para a calibração das temperaturas dos termocicladores, e tampouco existe laboratório acreditado na Rede Brasileira de Laboratórios de Ensaio (RBLE/INMETRO) para efetuar ensaios em termocicladores. Não é só no Brasil que não existe uma normativa específica para a calibração de termocicladores, mesmo no cenário internacional isso também ocorre, a atividade de calibração de termocicladores não é compulsória. (NOLAN *et al.*, 2013). No Brasil, e em outros países, não existe uma metodologia harmonizada para a verificação da temperatura de termocicladores (SPAN *et al.*, 2017; SOUZA, 2017; SANTOS *et al.*, 2014).

Por outro lado, existe uma tendência de aumento na intensidade de uso dos equipamentos termocicladores, associada ao aumento crescente da demanda por exames de PCR no Brasil. Dados do Sistema de Informação Ambulatorial do Sistema Único de Saúde (SIASUS) revelam o crescimento da produção de exames genéticos no Brasil (BRASIL, 2017g).

Os exames PCR são identificados como exames de genética no SIASUS. Foi registrado um aumento de 686% no ano de 2016 em relação ao ano de 2015 para esses exames, passando de 28.864 exames em 2015 para 198.014 em 2016 (BRASIL, 2017g). Este aumento pode ter sido ocasionado por problemas de alteração na forma de lançamento dos exames na plataforma, incluindo a imprecisão da nomenclatura do SIASUS: 02.02.10.008-1: identificação de mutação/rearranjos por PCR, PCR sensível à metilação, qPCR e qPCR sensível à metilação. A Região Sudeste registrou um aumento de 1.216% na produção de exames neste período, passando de 15.257 exames em 2015 a 185.536 em 2016. A Região Sul teve crescimento de 4%, passando de 5.695 exames no ano de 2015 para 5.940 no ano de 2016. As Regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste apresentaram redução destes exames no período (BRASIL, 2017g).

É importante ressaltar que essa discrepância na produção de exames entre as regiões, pode ser explicada pela carência de laboratórios com a infraestrutura necessária e recursos humanos capacitados para a realização de exames de biologia molecular, principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Centro-oeste. Embora aparentemente

verdadeira pelo "senso comum", há que se ter cautela nesta conclusão com base apenas nos dados do SIASUS. Por exemplo, para o caso de procedimentos relativos à prevenção e controle do câncer há de se considerar a gestão dos Centros de Alta Complexidade em Oncologia (CACONS) e das Unidades de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia (UNACONS).

Não obstante, é razoável supor que este cenário de demanda crescente por exames de biologia molecular deverá continuar, em decorrência de novas incorporações no Sistema Único de Saúde (SUS) de medicamentos biológicos, que geralmente demandam a realização de um exame genético para indicação ou controle da terapia (BRASIL, 2017b, 2017c, 2017d, 2017e, 2017f).

A ampla difusão de exames genéticos no SUS deve servir de alerta aos gestores sobre a importância do uso adequado e seguro dos materiais, procedimentos e infraestrutura existentes nos laboratórios de biologia molecular visando garantir a efetividade dos exames realizados. No caso do termociclador, vale destacar, que o necessário gerenciamento da utilização dos termocicladores, compreende o monitoramento do desempenho do equipamento, fundamental para garantir a otimização da realização de exames por PCR. Porém, embora essencial para a garantia da efetividade do termociclador, o controle sistemático da temperatura nos poços dos blocos térmicos não é uma atividade compulsória regulamentada.

Um exemplo da importância desse monitoramento foi um estudo realizado no Centro de Pesquisas do Instituto Nacional de Câncer (INCA) para verificar o desempenho de termocicladores. O estudo foi realizado em dois ensaios distintos, o primeiro ensaio desenvolvido no Laboratório de Pesquisa Clínica e o segundo no Laboratório de Carcinogênese Molecular. Cada ensaio consistiu no preparo de 45 amostras homogêneas e íntegras para a amplificação do gene b-actina em três termocicladores. Os termocicladores foram usados simultaneamente, cada um recebendo 15 amostras. Resultados mostraram evidências de falhas no desempenho de 66,7% dos termocicladores utilizados no estudo. Foram identificados poços de termocicladores com reações falhas ou com diferentes expressões gênicas.

Esses resultados alertaram sobre a relevância e a justificativa para a realização da presente pesquisa, sobretudo quando consideradas as potenciais consequências dos exames por PCR com resultados indeterminados e os custos operacionais associados a repetição desses exames.

2 OBJETIVO

Desenvolver e implantar um programa de monitoramento de temperatura de termocicladores e avaliar a sua efetividade mediante a influência de outros fatores determinantes da otimização de exames por PCR.

Objetivos Específicos:

- Adaptar o instrumento de medição de temperatura de termocicladores.
- Desenvolver os procedimentos para o monitoramento e controle de temperatura de termocicladores.
 - Identificar fatores determinantes para a otimização da PCR e avaliar as condições desses fatores no cenário do estudo.
 - Avaliar a efetividade do programa de monitoramento de temperatura de termocicladores.
 - Realizar estimativa de custo de repetição de exame.

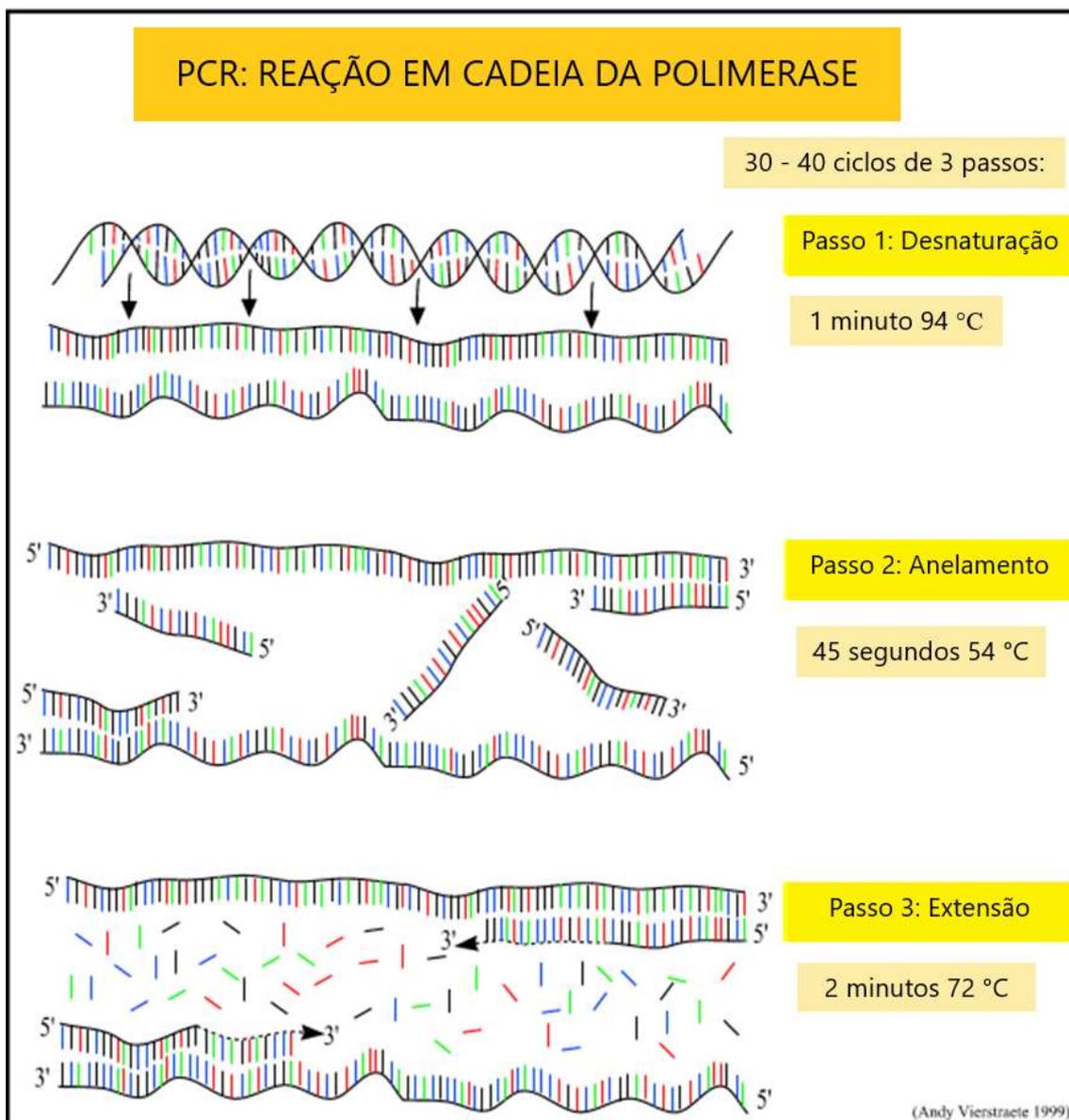
A PCR é considerada uma técnica rápida, sensível e específica para a amplificação de sequências de DNA, conhecidas como sequências alvo. Uma única molécula de DNA pode ser amplificada exponencialmente produzindo milhões de cópias de DNA. A PCR é a base para diversos procedimentos de um laboratório de biologia molecular (WATSON *et al.*, 2015). A PCR foi desenvolvida durante os anos 1980, pelo cientista Kary Banks Mullis e permitiu muitos avanços no estudo do DNA, levando o seu descobridor a receber o prêmio Nobel de Química, em 1993.

O dogma central da biologia molecular é formado por três processos, a síntese de DNA (denominado replicação), a síntese de RNA (denominado transcrição) e a síntese de proteínas (denominado tradução). Os processos de replicação e transcrição podem ser reproduzidos *in vitro* a partir da PCR. A multiplicação de cadeias de DNA, promovida *in vitro* pela técnica PCR, é um mecanismo análogo ao que ocorre nos seres vivos para a replicação de DNA (WATSON *et al.*, 2015).

Para a realização da técnica PCR é usado o equipamento termociclador que provê as temperaturas necessárias à reação. Nos poços do termociclador são colocados, em pequenos tubos, os materiais necessários para que ocorra a PCR. São usados: água ultrapura, moléculas de DNA a serem duplicadas (amostra de DNA alvo), os dNTPs, as sequências de bases para iniciar a reação (*primers*), a enzima DNA polimerase e uma solução tampão contendo cloreto de magnésio (cofator da enzima DNA polimerase).

Importante ressaltar que a PCR é uma reação enzimática. Ocorre somente com a presença de enzimas para catalisar, acelerar a reação. Mas, apenas com a descoberta da enzima Taq Polimerase, originalmente obtida da bactéria *Thermus aquaticus*, foi possível o desenvolvimento da PCR, visto que esta enzima suporta as temperaturas elevadas necessárias para a reação *in vitro*, em geral superiores a 92°C.

O princípio da PCR envolve três etapas básicas ativadas pela temperatura, e repetidas em vários ciclos: a desnaturação, o anelamento e a extensão. O processo para a amplificação, multiplicação do número de cópias de DNA de interesse realizado na PCR ocorre basicamente promovendo-se a separação da dupla fita de um fragmento de DNA (desnaturação), alinhando-se uma sequência específica de bases nitrogenadas, *primers*, à nova fita simples (anelamento), e completando-se essa sequência com dNTPS para a formação da nova fita dupla (extensão). A Figura 2 descreve e ilustra as etapas da PCR.



Fonte: adaptado de VIERSTRAETE (2012).

Figura 2: Descrição do processo PCR, com as etapas de desnaturação, anelamento e extensão.

Nas etapas da PCR, os tempos e as temperaturas podem variar de acordo com a padronização da PCR para uma determinada aplicação. A etapa de desnaturação (ou separação) da dupla cadeia de DNA, em duas cadeias simples e complementares, é ativada por temperaturas próximas a 95°C (usualmente 92°C a 96°C). É necessário observar o tipo de enzima DNA Polimerase e a recomendação de temperatura, e ainda o tempo suportado pela enzima. Pois, é importante proteger a enzima de altas temperaturas, e por outro lado, é necessário o uso de alta temperatura para romper as

ligações de hidrogênio entre os nucleotídeos complementares (MCPHERSON *et al.*, 2006; INNIS *et al.*, 1995).

A etapa de anelamento (ou hibridização) é ativada por temperaturas próximas a 55°C para os iniciadores de reconhecimento, sequências de bases nitrogenadas denominadas *primers*, realizarem o emparelhamento com suas sequências complementares nas cadeias simples de DNA. A temperatura de anelamento varia de acordo com os *primers* utilizados e com a quantidade de bases usadas na reação PCR, a depender da temperatura de *melting* (T_m). O CAP (2012) recomenda que a temperatura de anelamento seja calculada em função da T_m.

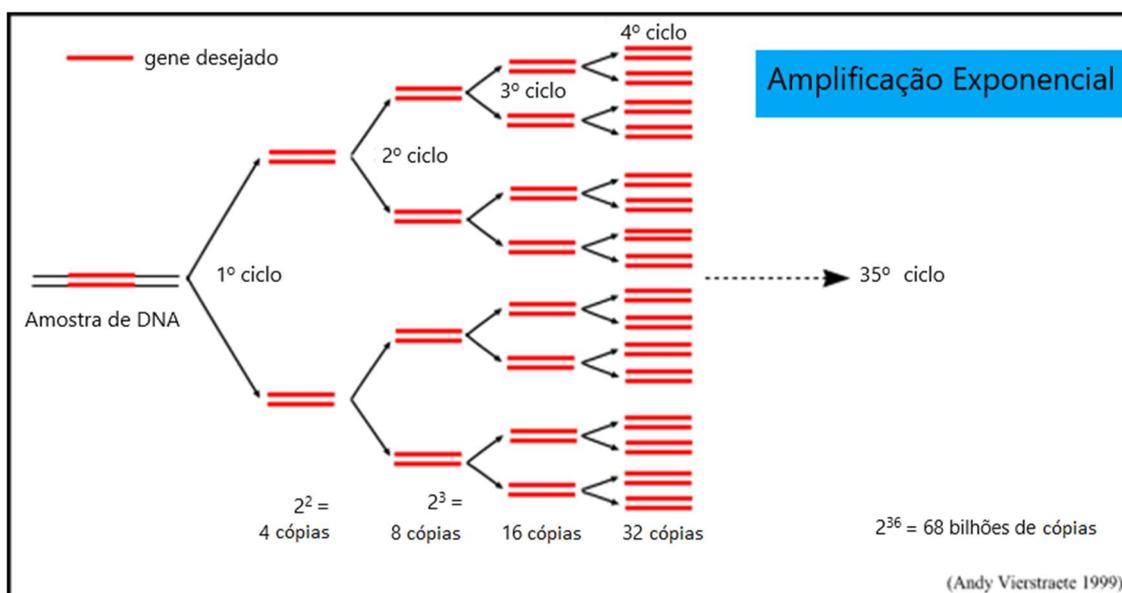
A temperatura de *melting*, ou o ponto de fusão do DNA, é a temperatura à qual 50% das moléculas de DNA encontram-se como cadeia simples, ou a temperatura na qual 50% dos fragmentos da amostra de DNA alvo já estão pareados com os *primers*. Esta temperatura depende do tamanho dos produtos de amplificação (*amplicons*) e das quantidades de bases nitrogenadas dos *primers* a serem usadas na reação. A Equação (1) expressa a T_m em função das quantidades de bases nitrogenadas (G-guanina, C-citosina, A-adenina e T-timina) usadas na reação (MCPHERSON *et al.*, 2006; INNIS *et al.*, 1995).

$$T_m = ((\text{Número de G+C}) \times 4^\circ\text{C} + (\text{Número de A+T}) \times 2^\circ\text{C}) \quad (1)$$

A etapa de extensão (ou síntese) é ativada por temperaturas próximas a 72°C para ativar o prosseguimento do pareamento dos nucleotídeos na sequência definida pela fita simples do DNA da amostra. As propriedades da enzima DNA Polimerase são usadas para catalizar a reação, dar condições de estabilidade e continuidade à reação iniciada pelos *primers*. São acrescentados os dNTPs complementares à fita de DNA. A enzima DNA polimerase atua catalisando a ligação de um dNTP a uma ligação OH livre da pentose, na extremidade 3'. Assim, a direção da construção da nova dupla fita de DNA, será na direção da extremidade 5' para a extremidade 3' (WATSON *et al.*, 2015). Na Figura 2 podemos observar as extremidades citadas.

As três etapas da PCR são repetidas ciclicamente. A cada ciclo ocorre a duplicação das moléculas de DNA, obtendo-se uma amplificação exponencial. Os protocolos PCR determinam o número de ciclos em cada etapa do processo, que são definidos em função da técnica a ser usada e das características do conjunto de elementos necessários na reação. O tempo total decorrido nos protocolos PCR varia de

cerca de 120 minutos na ciclagem convencional ou típica, a cerca de 70 minutos nos procedimentos multiplex, 50 minutos nos procedimentos RAPD (do inglês, *Randomly Amplified Polymorphic DNA*) e 35 minutos nos equipamentos conhecidos como *fast PCR*, por exemplo. Os procedimentos multiplex e RAPD serão descritos a seguir, e o *fast PCR* no item 3.2.1. A Figura 3 mostra um diagrama exemplificando a amplificação exponencial da reação PCR.



Fonte: adaptado de VIERSTRAETE (2012).

Figura 3: Diagrama exemplificando a amplificação exponencial da reação PCR.

A técnica da PCR continua a ser usada, testada e validada para diversas aplicações. Outros procedimentos decorrentes da PCR foram desenvolvidos e incorporados ao conjunto de técnicas aplicadas em biologia molecular; tais como:

RAPD: Denominado DNA polimórfico amplificado ao acaso, ou, do inglês RAPD-*randomly amplified polymorphic DNA*, tem como princípio a amplificação pela PCR de regiões aleatórias do DNA. A estratégia consiste na utilização de sequência aleatória de único *primer*, *primers* decâmeros (compostos apenas por dez nucleotídeos), em alternativa a par de *primers* compostos de cerca de 20 nucleotídeos. Quando as amostras de DNA são submetidas à PCR, os *primers* se anelam às regiões da amostra de DNA que sejam complementares. O RAPD é usado para a detecção de polimorfismo (WILLIAMS *et al.*, 1990), na microbiologia é usado para a tipagem de bactérias, leveduras, fungos filamentosos e na agricultura para a identificação de cultivares.

PCR multiplex: Na PCR multiplex são usados múltiplos pares de *primers*, promovendo a amplificação de diferentes segmentos de DNA alvo, em um só tubo, em uma só reação. A PCR multiplex é útil para testar vários agentes infecciosos que podem ser detectados e diferenciados em um único tubo de reação ao mesmo tempo. Outra aplicação comum é a investigação de paternidade, onde vários marcadores genômicos devem ser analisados (BEST *et al.*, 2016).

Nested PCR: Conhecida como PCR em ninho. São usados dois pares de *primers* complementares à sequência alvo, a fim de aumentar a sensibilidade e a especificidade da PCR. Inicialmente é realizada a amplificação com um par de *primers*, denominado *primers* externos, e, posteriormente, o produto desta PCR é amplificado com o outro par de *primers*, denominado internos, que utilizará como amostra de DNA alvo, os fragmentos multiplicados na primeira reação (BRUNO, 2017).

RT-PCR: Denominada transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase, este tipo de PCR é usado para amplificar RNA. Devido não ser possível a enzima DNA Polimerase usar RNA como amostra alvo, é necessário primeiro fazer a transcrição reversa do RNA mensageiro, o mRNA, para o DNA complementar, o cDNA. Após, prossegue-se normalmente com a PCR. Assim, inicialmente realiza-se a reação com a enzima *transcriptase reversa* e a amostra de RNA alvo. A ação da enzima determina a síntese de moléculas de DNA complementar ao RNA, que é então amplificado por PCR. Esse tipo de PCR permite análise da expressão de genes a partir de moléculas de RNA mensageiro.

3.1.1 Exemplo de aplicação

Um exemplo de aplicação da técnica RT-PCR é a detecção do *Rearranjo t(9;22) BCR/ABL*, o qual é considerado o padrão ouro para o diagnóstico de Leucemia Mieloide Crônica (LMC), devido a sua sensibilidade e por dispensar coleta de amostra de medula óssea para a realização do exame (BEST *et al.*, 2016; REIS *et al.*, 2019).

O rearranjo formado pela translocação t(9;22) é caracterizado pelo *gene* híbrido BCR/ABL denominado cromossomo *Philadelphia*. Nessa translocação, o *gene* ABL do cromossomo 9 se associa a uma porção de um *gene* no cromossomo 22, denominado BCR. No exame *Rearranjo t(9;22) BCR/ABL*, por RT-PCR multiplex, é realizada a identificação dos transcritos b2a2, b3a2 ou e1a2. Esses transcritos determinam as localizações dos *exons* (sequências de nucleotídeos presentes no gene) onde ocorrem os

pontos das quebras no *gene* BCR do cromossomo 22, que estão relacionados à LMC (BARBOZA *et al.*, 2000; ANDRADE, 2008; REIS *et al.*, 2019).

Um procedimento típico para a realização do exame *Rearranjo t(9;22) BCR/ABL*, por RT-PCR Multiplex, utiliza vários pares de *primers* a fim de detectar os transcritos de interesse. O *gene* BCR normal é amplificado como controle interno. O controle positivo da reação é feito com a amplificação da linhagem celular K562 (BARBOZA *et al.*, 2000; ANDRADE, 2008).

O controle interno consiste de um fragmento de DNA adicionado a cada amostra para a amplificação, o qual leva sempre a um resultado positivo, por isso é usado para monitorar a amplificação de cada amostra da reação. O controle interno tem de ser o mais semelhante possível ao DNA alvo, mas com uma característica que o distinga deste; caso haja inibição da amplificação o ensaio deve ser repetido (OLIVEIRA, 2008).

3.2 Os termocicladores

Os termocicladores são compostos de bloco com poços térmicos para o recebimento de tubos de amostras para a operação dos ciclos de temperaturas da reação PCR. Os ciclos de temperaturas são programáveis pelos usuários no painel de controle do termociclador para a execução das variações sistemáticas de temperaturas (BOMMER *et al.*, 2009). No bloco termoelétrico a temperatura nos poços do bloco de amostra é dependente da massa térmica deste bloco e ainda da eficiência do processo de aquecimento-resfriamento de todo o bloco termoelétrico (BOMMER *et al.*, 2009). O bloco termoelétrico dos termocicladores, ilustrado na Figura 4, compreende basicamente três componentes, mostrados na Figura 5 e descritos a seguir:

- Componentes termoelétricos operam tipicamente seguindo os princípios do efeito *Peltier*. Tratam de semicondutores denominados elementos Peltier que atuam na geração das temperaturas para o bloco de amostras. Tais elementos quando associados a sensores e a outros dispositivos atuam também no controle das temperaturas (WOODS, 2010). Estas estruturas *Peltiers* são formadas por único elemento ou por até 8 elementos *Peltiers* independentes.
- Um bloco constituído de material com boa condução térmica, comumente o alumínio, com poços para receberem pequenos tubos de amostra para a reação PCR, denominado bloco de amostras.
- Um dissipador térmico usado para melhorar a eficiência nas trocas de calor do conjunto dos elementos *Peltier* e o bloco de amostras com o ambiente.



Figura 4: Foto de bloco termoelétrico de 96 poços destacando o bloco de amostras e o dissipador térmico.

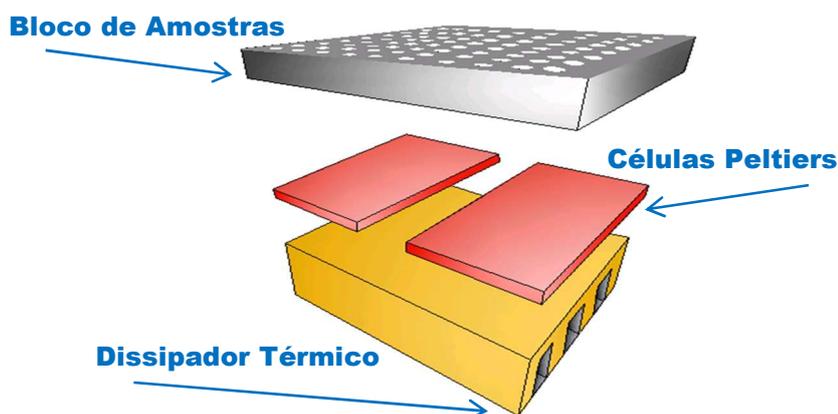


Figura 5: Ilustração dos componentes básicos de um bloco termoelétrico com 2 células *Peltiers*.

3.2.1 Características dos termocicladores

Ao longo do tempo o equipamento termociclador passou por algumas inovações tecnológicas. Quer inovações incrementais, tais como: a) modificação no circuito térmico para maior estabilidade com a configuração dos atuais sistemas *Peltier*; b) tampa aquecida para o fechamento do bloco térmico; c) mudanças na apresentação do tamanho dos blocos de amostras (48, 60, 96, 384 poços); e d) alterações de *software* tanto para a melhoria da programação dos protocolos quanto adaptações específicas para aceleração do processo PCR nos chamados *fast PCR*. A principal melhoria reconhecida foi incorporada ao termociclador qPCR, também denominado termociclador quantitativo ou termociclador em tempo real; que introduziu mecanismo

de detecção e quantificação por fluorescência e técnicas computacionais para a determinação dos resultados da amplificação e visualização em tela de computador. A visualização dos resultados da PCR em tempo real representa vantagem em relação à técnica de eletroforese em gel usada para visualizar os fragmentos de DNA após amplificação no termociclador qualitativo.

Outra inovação diz respeito ao termociclador digital, uma nova abordagem do qPCR, que apresenta especial melhoria devido ao uso do método de quantificação absoluta de DNA, que permite a contagem de moléculas e detecção de genes raros.

Além disso, estas novas tecnologias motivaram o crescimento da industrialização de diversos insumos para a operação das técnicas PCR e de kits laboratoriais para a detecção rápida e eficaz de doenças causadas por bactérias e vírus. O qPCR em especial tem se mostrado tecnologia promissora, pois, juntamente com as plataformas para sequenciamento de DNA, são considerados importantes para o desenvolvimento da prometida medicina personalizada (ou medicina especializada), a qual traz o conceito potencial de utilizar análises moleculares individuais para casos de diagnóstico e terapia, ou mesmo para a predisposição de um indivíduo ao sucesso de dado tratamento farmacológico, dentre outras finalidades.

Ainda assim, a técnica PCR qualitativa ou convencional, vinculada ao termociclador convencional, objeto do presente estudo, continua a ser o procedimento mais comumente utilizado nos laboratórios de biologia molecular. A grande vantagem desta técnica é o seu relativo baixo custo, a versatilidade e diversidade de possibilidades de utilização e ampla disseminação nos laboratórios de biologia molecular.

3.2.2 Termociclador em um laboratório de biologia molecular

Um laboratório de biologia molecular tem classificação de nível de biossegurança 2 (NB-2), devido envolver manipulação de sangue humano, líquidos corporais, tecidos ou células humanas onde a presença de um agente infeccioso pode ser desconhecida. A resolução RDC nº 50 da ANVISA (BRASIL, 2002) estabelece requisitos de infraestrutura física para o funcionamento desses laboratórios, tais como ambientes independentes com fluxo unidirecional para pré-PCR e pós-PCR. São amplamente recomendadas áreas limpas (NB-2) para as preparações de amostras, e fluxo operacional unidirecional planejado para minimizar a contaminação e os resultados falsos positivos (WEISSEINSTEINER *et al.*, 2007; CAP, 2012; CDC, 2009; NIH, 2013; NHS, 2013).

Um laboratório de biologia molecular utiliza áreas separadas e independentes para os passos básicos de realização dos exames por PCR, denominadas pré e pós-PCR. A Figura 6 mostra um diagrama com as áreas de um laboratório de biologia molecular.

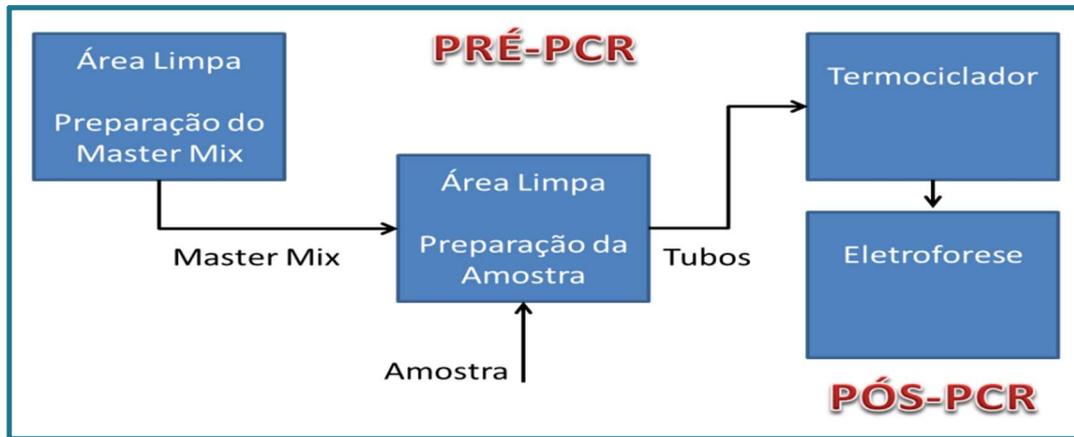


Figura 6: Áreas independentes e fluxo do processo de realização de um exame por PCR.

As áreas pré-PCR são: a) a sala de preparação do *master mix* (preparação e mistura de dNTPs, *primers*, enzima DNA Polimerase e outros materiais); e b) a sala de extração de DNA e preparação das amostras para a amplificação. São consideradas áreas pós-PCR: a) a sala de amplificação das amostras no termociclador; e b) a sala para a realização da eletroforese.

A eletroforese utilizada para a visualização dos resultados da amplificação do DNA nos termocicladores qualitativos tem como princípio o deslocamento da molécula de DNA de carga negativa em direção ao polo positivo de um campo elétrico, através de uma matriz com gel. As moléculas são separadas de acordo com o seu tamanho, os maiores fragmentos são registrados próximos ao ponto de aplicação e os menores fragmentos que migram mais rápido são registrados em áreas mais afastadas do ponto de aplicação. À molécula de DNA é acrescentado material corante para ativar a fluorescência do DNA e permitir o subsequente registro fotográfico do resultado da amplificação (WATSON *et al.*, 2015).

4 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da literatura teve como objetivo identificar os fatores determinantes da qualidade do exame PCR. Foi realizada utilizando múltiplas estratégias de busca nos portais: *Web of Science* e Biblioteca Virtual em Saúde, que inclui o *Pubmed*.

As seguintes palavras chaves foram usadas como núcleo principal das estratégias de busca:

polymerase chain reaction; diagnos; indicator; performance; quality control; quality assurance; quality improvement; effectiveness; assessment; guidelines; standard*; practice; accreditation; laboratory; molecular; thermal cyclers; thermocycler*

As buscas levaram a identificação de literatura relevante quanto a:

- Recomendações *Guidelines* da Qualidade em Laboratórios de Biologia Molecular sobre Boas Práticas de Laboratório Acreditação e Padrões de Qualidade em Laboratórios (CDC, 2009; OECD, 2015; NIH, 2013; RCPATH, 2006; NHS, 2013; WHO, 2009; CAP, 2012; JCI, 2010; EPA, 2004);
- Descrição conceitual sobre a reação PCR (INNIS *et al.*, 1995; WEISSEINSTEINER *et al.*, 2004; MCPHERSON *et al.*, 2006; DEGEN *et al.*, 2006; ALTSHULER, 2006; KENNEDY *et al.*, 2011; NOLAN *et al.*, 2013;);
- Artigos sobre o desempenho do termociclador (SAUNDERS *et al.*, 2001; SCHODER *et al.*, 2003; SCHODER *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2008).

Foi obtido o total de 431 trabalhos, dos quais 20 trabalhos foram considerados para identificar quais são os fatores importantes para garantir os resultados esperados da PCR.

A partir da literatura foi identificado que a otimização dos exames PCR é dependente da qualidade e da quantidade dos elementos que compõe a reação, do ajuste da temperatura para realizar a reação, dos componentes que dizem respeito à infraestrutura do laboratório e da capacitação de pessoal técnico para executar os procedimentos. Os fatores críticos para a otimização da PCR, identificados na literatura, foram resumidos e são descritos na Figura 7.

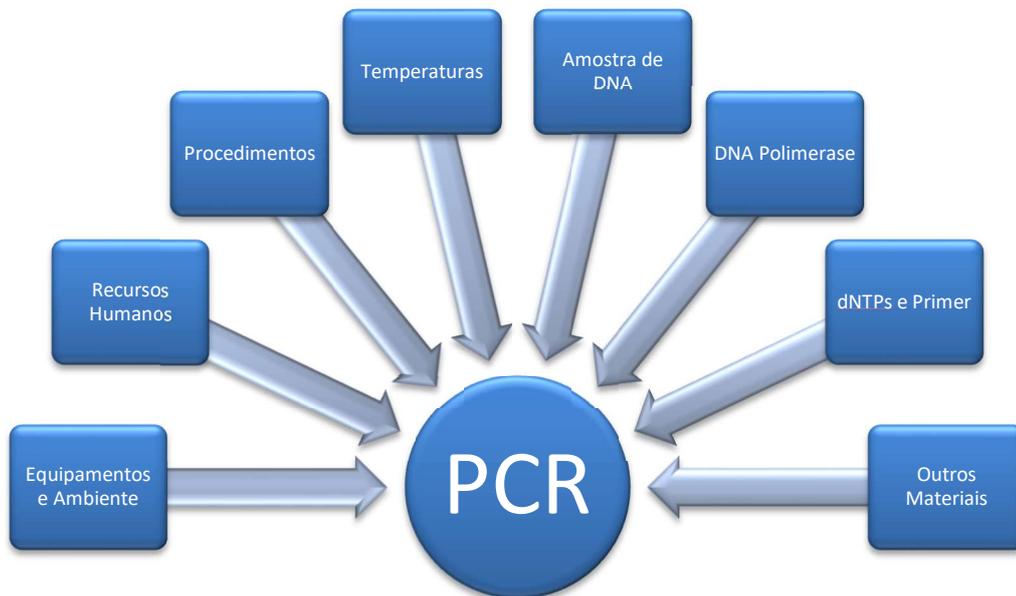


Figura 7: Fatores básicos determinantes da qualidade da PCR.

Com relação aos elementos que compõe a reação, foram identificados: a amostra de DNA alvo da reação; a enzima DNA Polimerase termoestável usada para catalisar a reação, os *dNTPs*, ou bases nitrogenadas, usados para compor o material à ser amplificado; e os *primers*, sequências específicas de bases nitrogenadas, usados para iniciar a reação. São ainda componentes importantes na reação, os outros materiais, como a solução tampão contendo magnésio e os controles de amostra e controles negativos e positivos.

A seleção do método de obtenção da amostra de DNA alvo é mencionada com especial destaque para a otimização da PCR, pois é responsável por garantir pureza, homogeneidade e integridade à amostra (WEISSEINSTEINER *et al.*, 2004).

A enzima DNA Polimerase termoestável confere estabilidade a PCR, assim o tipo da enzima irá definir a temperatura e o tempo de desnaturação, importantes para ativar a enzima, e mantê-la íntegra e sem danos, em condição de atividade ótima (MCPHERSON, 2006; DEGEN, 2006; INNIS, 1995). A enzima DNA Polimerase influencia na força iônica da reação e na quantidade de material genético amplificado (WEISSEINSTEINER, 2006; DEGEN, 2006). MCPHERSON *et al.* (2006) e INNIS *et al.* (1995) recomendam limitar o tempo de aplicação de altas temperaturas na etapa de

desnaturação, a fim de proteger e prolongar a vida útil da enzima DNA Polimerase. Alertam, por exemplo, que em geral, temperaturas acima de 97,5° C aplicadas por tempo superior a 5 minutos, tem potencial para danificar a enzima termoestável. As características da enzima DNA Polimerase também têm influência na programação da etapa extensão. INNIS *et al.* (1995) recomenda que a etapa de extensão seja programada em uma temperatura que favoreça a plena atividade da enzima termoestável.

A qualidade dos *dNTPs* e *primers* é importante para eliminar resíduos contaminantes que possam inibir a reação bioquímica. Já a observância das quantidades de *dNTPs* e *primers* usadas na PCR é citada como fundamental para formar soluções equilibradas de modo a minimizar a taxa de erro e aumentar a eficiência das reações (DEGEN, 2006). O planejamento da sequência e da concentração dos nucleotídeos na formação dos *primers* é fundamental para viabilizar o início dos ciclos de duplicações de fitas de DNA, deve-se atentar para o desenho correto dos *primers*. (WEISSEINSTEINER *et al.*, 2004; DEGEN *et al.*, 2006; MCPHERSON *et al.*, 2006; ALTSHULER, 2006; EPA, 2004; KENNEDY, 2011; CAP, 2012).

Outros materiais, como, a solução tampão contendo magnésio e os controles negativos e positivos, são citados na literatura. O magnésio tem papel fundamental para a ativação da enzima e eficiência da PCR, visto ser cofator da enzima DNA polimerase. A solução tampão é usada para garantir o pH e as concentrações iônicas adequadas à reação (DEGEN *et al.*, 2006; WEISSEINSTEINER *et al.*, 2006; MCPHERSON *et al.*, 2006). É importante observar a recomendação expressa dos fabricantes das enzimas para compor a solução tampão e o magnésio a serem usados na reação. Da mesma forma, deve-se observar a qualidade dos controles a serem usados nos procedimentos; utilizando-se controles de qualidade de amostra e de resultados, adequadamente qualificados (CAP, 2012; CDC, 2009; EPA, 2004; MCPHERSON *et al.*, 2006; DEGEN *et al.*, 2006).

Com relação às temperaturas da reação PCR, são citados os seguintes componentes que podem comprometer estas temperaturas, inviabilizando a reação: o cálculo da temperatura de *melting* e a temperatura de anelamento que é considerada a temperatura mais crítica para o sucesso da PCR (DEGEN *et al.*, 2006; MCPHERSON *et al.*, 2006); a programação dos ciclos de temperaturas; e as temperaturas geradas pelo equipamento termociclador (CAP, 2012).

A temperatura de anelamento é fator crítico para o alinhamento dos *primers*, e consequentemente para a eficiência da PCR (MCPHERSON *et al.*, 2006). O CAP

(2012) recomenda que a temperatura de anelamento seja calculada em função da temperatura de *melting*. Já o cálculo da estimativa da temperatura de *melting* deve considerar as quantidades dos *dNTPs* usados nas sequencias dos *primers* (MCPHERSON *et al.*, 2006; INNIS *et al.*, 1995).

O CAP (2012) destaca que a programação dos ciclos de temperaturas e a exatidão das temperaturas do termociclador são fundamentais para o bom desempenho de todo o processo de realização da PCR. Erros nas temperaturas da PCR podem ocasionar falhas na amplificação, quer impedindo totalmente, ou parcialmente a realização da PCR. A programação dos ciclos de temperaturas das etapas da PCR deve considerar as quantidades e especificidades dos componentes usados na reação (MCPHERSON *et al.*, 2006; INNIS *et al.*, 1995). Por exemplo, o tipo de enzima DNA polimerase irá influenciar a determinação de ciclos de temperaturas da PCR.

Quanto aos componentes externos da reação o CAP (2012) recomenda que o ambiente de preparação da amostra de DNA e o ambiente de preparação dos componentes da reação devam ser limpos e independentes do ambiente de realização da amplificação. O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês, Center for Disease Control and Prevention - CDC) (2009) ressalta que o fluxo de trabalho do laboratório requer planejamento, de modo a não favorecer a contaminação cruzada e não gerar resultados falsos positivos. A falta de exatidão dos volumes das pipetas e o descontrole das temperaturas nos poços dos termocicladores são mencionados como fatores críticos; ambos podem levar à falha da reação, conduzindo a resultados de exames indefinidos ou falsos negativos (CAP, 2012; CDC, 2009; NIH, 2013; NHS, 2013).

Os resultados falsos negativos, ou os resultados indefinidos, podem ser gerados não somente devido à falta de exatidão dos termocicladores na geração e controle dos ciclos de temperatura, mas também devido a vários outros fatores citados na literatura. Dentre os quais: a falta de qualidade da amostra de DNA; as quantidades e características dos componentes da reação (a enzima termoestável, os *dNTPs* e os *primers*) e solução tampão; o cálculo da temperatura de anelamento, a definição do ciclo de desnaturação e a programação dos ciclos térmicos. Os resultados falsos positivos podem estar associados à contaminação do termociclador, assim como de pipetas, amostras, soluções e insumos; quando há ocorrência de falha no controle de áreas limpas e fluxos unidirecionais do laboratório, e erros decorrentes de trocas de amostras.

O CAP (2012) recomenda a definição de procedimentos, com protocolos escritos, testados e validados para as condutas de operacionalização de exames de biologia molecular. Faz recomendações quanto a necessidade de qualificação de recursos humanos e para a organização de procedimentos de manutenção preventiva e verificação de parâmetros dos equipamentos envolvidos no exame. Os equipamentos de laboratório devem ser mantidos de forma consistente com testes seguros e confiáveis realizados periodicamente. As pipetas e os termocicladores são equipamentos citados com especial importância para o processo de realização da PCR. De forma geral, os procedimentos recomendados para o controle da qualidade de laboratórios de biologia molecular incluem verificações de especificações de desempenho de equipamentos, competência de pessoal especializado e gestão de registros, relatórios e amostras de pacientes (CAP, 2012; NIH, 2013; JCI, 2010; OECD, 2007; RCPATH, 2006; NHS, 2013; WHO, 2009; CDC, 2009).

Como visto, a natureza dos fatores básicos determinantes da PCR está relacionada à qualidade dos materiais adquiridos, mantidos e utilizados na reação; assim como à qualificação e experiência dos profissionais envolvidos no planejamento e na execução da PCR; e à infraestrutura física do laboratório e exatidão de parâmetros dos equipamentos. Em que pese à adequada gestão de equipamentos médico-hospitalares, destacam-se a necessidade de calibração de volume das pipetas e de verificação de temperatura dos termocicladores.

A calibração de pipetas é atividade certificada por laboratórios acreditados pelo INMETRO. São encontrados no mercado vários laboratórios fornecedores de serviço de calibração de volumes de pipetas, pertencentes à Rede Brasileira de Calibração (RBC). No entanto, não há laboratórios que realizem a atividade de calibração de temperatura de termocicladores na RBC.

No entanto, o mau desempenho do termociclador foi discutido por alguns autores. SAUNDERS *et al.* (2001) relataram um estudo inter laboratorial apontando distorções na reprodutibilidade no processo RAPD-PCR. SCHODER *et al.* (2003) apontaram que os ciclos inadequados do termociclador interferem diretamente na desnaturação e no anelamento, tendo como consequência resultados falsos negativos na PCR. KIM *et al.* (2008) estabeleceram relação direta dos perfis de temperaturas de termocicladores com as falhas de sensibilidade no processo Multiplex-PCR.

O uso apropriado do termociclador está associado à exatidão das temperaturas nos diversos poços do equipamento por meio da calibração de temperatura, o que ainda não

é prática comum, devido a não existência de procedimento validado para a certificação da calibração da temperatura dos termocicladores. É importante o desenvolvimento de regulamento específico para a calibração da temperatura do termociclador, com a finalidade de viabilizar a aplicação de normas técnicas vigentes no Sistema da Qualidade.

Atualmente o Sistema da Qualidade recomenda um conjunto de normas técnicas para a melhoria da qualidade de equipamentos e de laboratórios na área da saúde, as quais são adotadas por diversos organismos internacionais, tanto para a avaliação da conformidade de equipamentos médicos quanto para a acreditação de laboratórios clínicos e ainda para o reconhecimento da atividade de acreditação de laboratórios de ensaios e calibrações. No Brasil, estas normas foram internalizadas, respectivamente, como:

ABNT NBR ISO 14971:2009 Produtos para a saúde - Aplicação de gerenciamento de risco a produtos para a saúde (ABNT, 2009);

ABNT NBR ISO 15189:2015 Laboratórios clínicos - Requisitos de qualidade e competência (ABNT, 2015);

ABNT NBR ISO/IEC 17025 Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração (ABNT, 2010).

Não obstante, os representantes dos fabricantes de termocicladores dispõem de oferta de serviço de verificação da temperatura de termocicladores, sem, no entanto, divulgarem os regulamentos técnicos ou as normas técnicas adotadas para a execução dessa verificação. Assim, os procedimentos para a verificação da temperatura de termocicladores são de domínio dos fabricantes. Não há procedimento validado, harmonizado, reconhecido e implantado para a certificação da temperatura dos termocicladores.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento do presente trabalho cronologicamente precede ao início do doutorado, que ocorreu em 2014. O preâmbulo ocorrido no período de 2011 a 2014 foi a fase que ocorreu a percepção da magnitude do problema, a partir de uma avaliação da necessidade de manutenção de termocicladores do INCA. Nessa fase houve um embasamento sobre as condições necessárias para viabilizar o projeto de tese. A Figura 8 é uma representação da evolução cronológica das etapas do trabalho.

Este capítulo foi organizado para ser apresentado em três etapas: pré-implantação, implantação e avaliação da efetividade do programa de monitoramento de temperatura de termocicladores. A Figura 9 descreve as etapas básicas do trabalho.

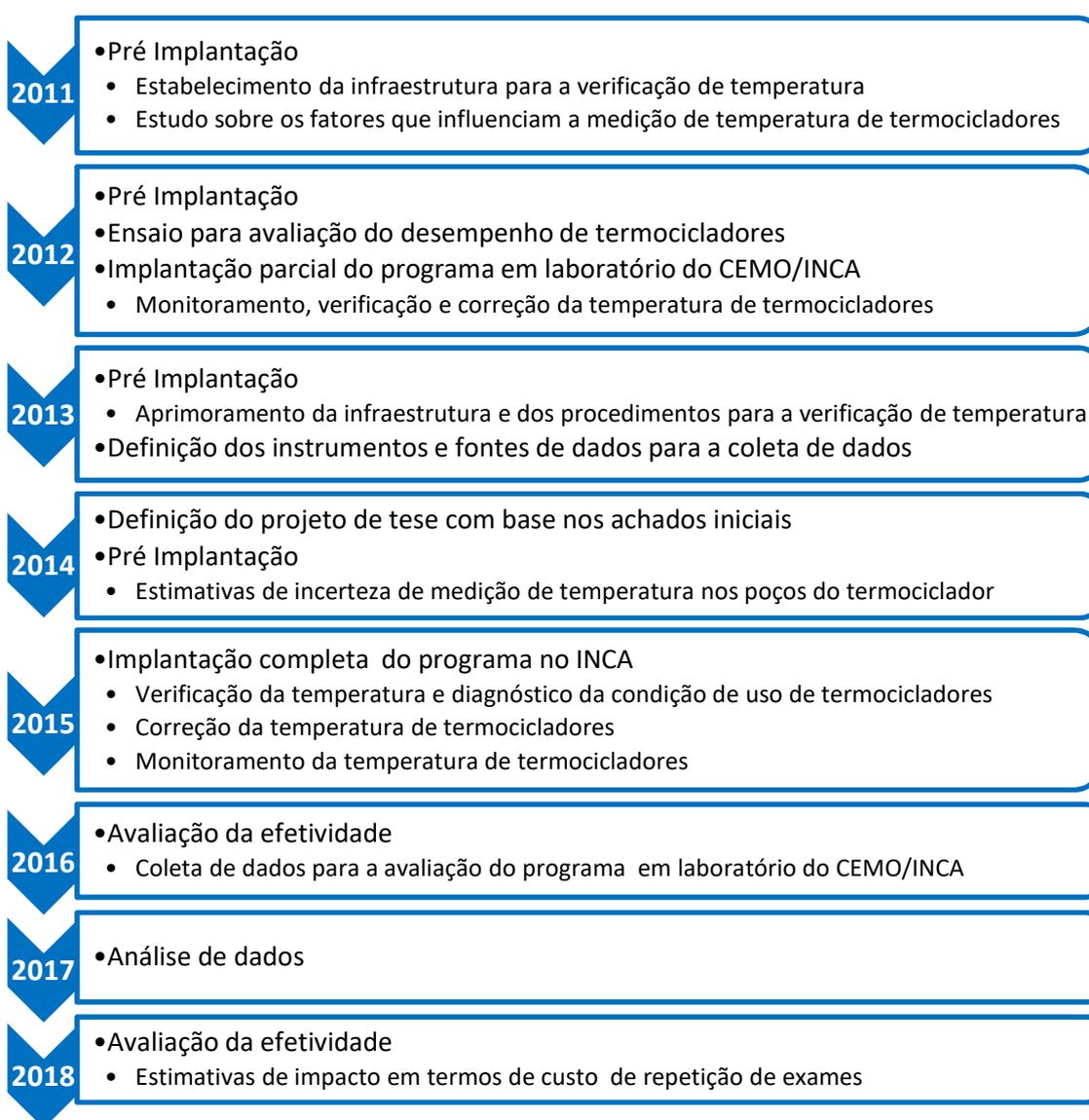


Figura 8: Evolução temporal das etapas do trabalho



Figura 9: Descrição das etapas básicas do trabalho.

5.1 Pré-implantação do programa de monitoramento de temperatura de termocicladores

A etapa de pré-implantação teve por objetivo desenvolver os requisitos para o programa de monitoramento de temperatura de termocicladores. Consistiu na adaptação e calibração do instrumento de medição de temperatura, na avaliação dos fatores que influenciam na medição de temperatura do termociclador, na estimativa das incertezas de medição dessas temperaturas, e na definição dos procedimentos do programa.

5.1.1 Procedimentos para a avaliação do sistema de medição da temperatura

a) Adaptação de sensores para a medição da temperatura

Os testes iniciais de medição de temperaturas foram realizados em um instrumento de teste comercial para a aquisição das temperaturas do termociclador, denominado analisador de termociclador, marca Hain Lifescience, modelo TAS. O analisador de termociclador TAS opera com o software TAS2.exe V2.8.0.

Durantes os testes, observou-se que a placa que suporta os sensores de temperatura do instrumento TAS impedia o fechamento da tampa do termociclador durante as medições de temperatura. Assim, o instrumento TAS realizava as medições com a tampa do termociclador aberta, gerando uma não conformidade com as condições normais de funcionamento do equipamento, onde a tampa é mantida fechada. A Figura 10 mostra o analisador de termociclador TAS com a placa e sensores a serem posicionados nos poços do bloco térmico de um termociclador.

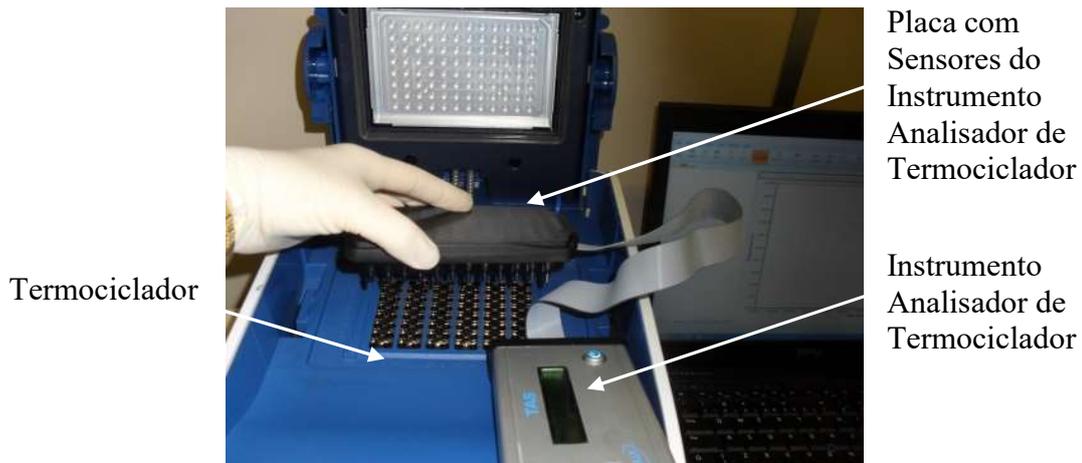


Figura 10: Placa com sensores do instrumento analisador de termociclador, modelo TAS, sendo posicionada no bloco térmico de um termociclador, para medição com tampa do termociclador aberta.

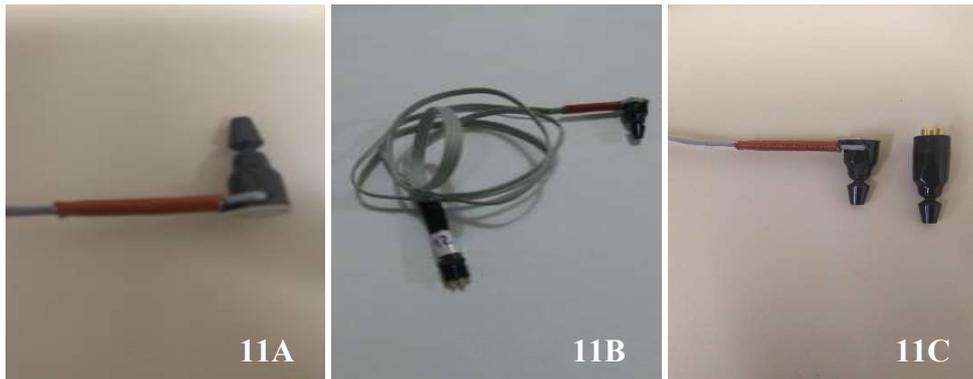
Mediante a possibilidade de a temperatura ambiente prejudicar no processo de verificação das condições operacionais dos termocicladores, foi realizado um estudo que analisou três experimentos de medição de temperatura de termociclador: a) medição com a tampa do termociclador aberta; b) medição com a tampa do termociclador fechada parcialmente; e c) medição com a tampa do termociclador fechada totalmente. Para o experimento “c” foram desenvolvidos sensores adaptados para esta finalidade, visto estes não serem comercializados (SANTOS *et al.*, 2014). Este estudo publicado está reproduzido no Apêndice A.

O estudo revelou que as medições da temperatura com a tampa do termociclador totalmente fechada apresentaram resultados em conformidade com a especificação do fabricante. No entanto, as medições com a tampa aberta ou fechada parcialmente apresentaram variabilidade além da especificação do fabricante, especialmente nas medições da temperatura de 95° C. As especificações dos fabricantes aceitam variações $\leq \pm 0,50^\circ \text{C}$, no estudo, a média da medida de temperatura observada com a tampa aberta foi de: $92,47^\circ \text{C} \pm 0,74^\circ \text{C}$, para a temperatura programada de 95° C.

Devido aos testes de medições de temperatura com a tampa do termociclador fechada, apresentarem melhores resultados que os demais testes, foram desenvolvidas as condições necessárias para usar o instrumento analisador de termociclador modelo TAS com a tampa do termociclador fechada. No Núcleo de Engenharia Clínica localizado no Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO) e Centro de Pesquisas (CPQ) foram adaptados os sensores de temperaturas tipo PT100 do analisador de

termociclador com cabos extensores de 65 cm, do tipo 28AWG de formato achatado, de modo a permitir o fechamento da tampa do termociclador. O encapsulamento de cada célula PT100 foi reduzido da altura de 2,8 cm para a altura de 1,8 cm.

Com a adaptação, o encapsulamento com o PT100 pôde ser posicionado em um poço do termociclador, e ser interligado por meio do cabo extensor à placa do analisador de termociclador, localizado externamente ao bloco térmico do termociclador. A Figura 11 mostra o sensor adaptado.



Legenda. 11A detalhe do sensor adaptado com o encapsulamento do PT100 reduzido; 11B sensor adaptado completo com cabo extensor interligando o PT100 ao conector; e 11C sensor adaptado e sensor original.

Figura 11: Ilustração de um sensor adaptado.

A Figura 12 ilustra o analisador de termociclador preparado para a medição de um termociclador com tampa fechada, usando 18 sensores adaptados conectados através de cabos extensores à placa localizada externamente ao bloco térmico.

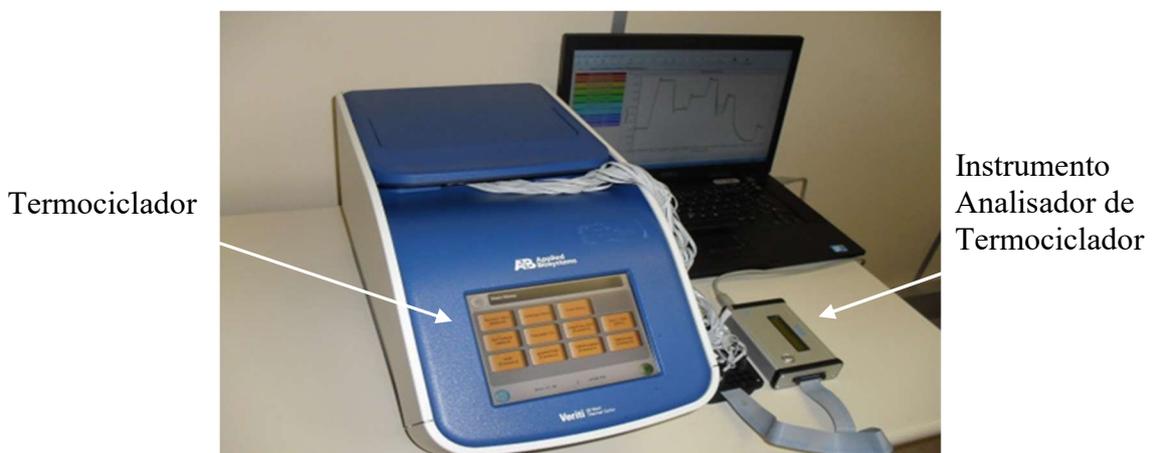


Figura 12: Instrumento analisador de termociclador preparado para a medição da temperatura com a tampa fechada do termociclador modelo Veriti, marca Applied Biosystems®.

b) Calibração e ensaios com o instrumento de medição de temperatura

Com o objetivo de conhecer a incerteza de medição associada ao instrumento de medição de temperaturas, o analisador de termociclador juntamente com os sensores adaptados foi submetido à calibração em laboratório da Rede Brasileira de Calibração (RBC), organizada pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). Foram calibrados 22 sensores nas temperaturas 4° C, 55° C, 72° C, 95° C, dos quais 18 sensores foram selecionados para compor o sistema de medição a ser usado no presente trabalho. Após a calibração, foram realizadas 10 medições de temperaturas repetidas em termocicladores modelo Veriti, marca Applied Biosystems® com o instrumento de medição analisador de termociclador para avaliar a repetibilidade das medidas. Para os ensaios, foram usados dois termocicladores do Banco Nacional de Tumores/CPQ/INCA, em boas condições operacionais e pouca intensidade de uso. Previamente, os equipamentos foram submetidos a testes operacionais realizados juntamente com os usuários. Os ensaios foram realizados no laboratório da Pesquisa Clínica e no Núcleo de Engenharia Clínica, ambos localizados no Centro de Pesquisa do INCA (CPQ/INCA). Os laboratórios foram selecionados devido à disponibilidade de espaço físico e liberação para a realização dos ensaios. Com o propósito de reduzir o tempo de medição, foram realizados novos ensaios com apenas três medidas repetidas, os quais se mostraram suficientes para verificar a repetibilidade das medidas, e adequados a serem adotados nos procedimentos operacionais do programa de monitoramento de temperatura de termocicladores.

Os ensaios iniciaram com a programação do protocolo com ciclos de temperaturas no termociclador, incluindo ciclos de temperaturas de 95° C, 55° C e 72° C (pontos de calibração dos sensores do analisador). Em seguida, foi dado início a geração das temperaturas no termociclador e a simultânea aquisição das temperaturas nos 18 sensores nos poços do termociclador pelo instrumento de analisador de termociclador. Posteriormente foi realizada a leitura das medidas de cada temperatura de cada um dos sensores e aplicadas às expressões propostas para a estimativa de incerteza de medição de temperatura do termociclador. Os resultados das medições do ensaio com três medidas, e as respectivas incertezas associadas, estão apresentados no Apêndice B.

Durante o processo de medição foram observadas as condições do ambiente e atendidas às especificações de temperatura e umidade estabelecidas nos manuais dos equipamentos termocicladores, tais como, temperatura: $\geq 15^{\circ} \text{C}$ e $30^{\circ} \text{C} \leq$; e umidade:

$\geq 30\%$ e $75\% \leq$. Em monitoramento da rede elétrica, durante os ensaios de medição de temperatura, não houve registro de variações de tensão e corrente ou interferência eletromagnética. Além disso, os ensaios foram úteis para obter informação sobre as características necessárias para a montagem e a operação do instrumento analisador de termociclador, de modo a apoiar a elaboração dos procedimentos operacionais do programa de monitoramento de temperatura de termocicladores.

5.1.2 Avaliação dos fatores que influenciam na medição de temperatura do termociclador

O resultado das medições de temperatura dos termocicladores pode ser influenciado principalmente pelos seguintes fatores: a) características do instrumento de medição; b) condições do ambiente; c) procedimento de medição; e d) habilidade dos operadores.

O *Diagrama de Causa e Efeito* (DCE) foi usado para melhor estudar os fatores que podem influenciar o processo de medição de temperatura do termociclador e para identificar as fontes de incertezas de medição visando posterior estimativa de incerteza de medição de temperatura do termociclador. Assim, foi elaborado o DCE na Figura 13 com a representação dos principais fatores de influência nessa medição de temperatura.

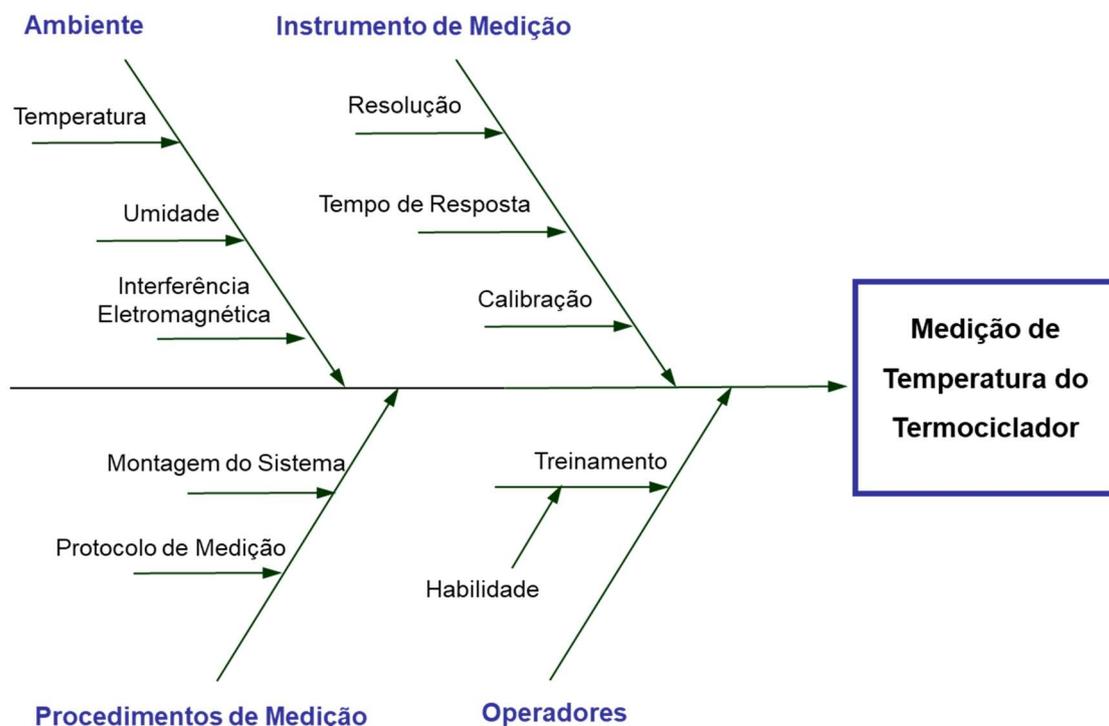


Figura 13: Fatores que influenciam na medição de temperatura do termociclador.

A partir da avaliação dos fatores descritos na Figura 13 foram selecionados os fatores que dispusessem de dados adequados para expressarem fontes de incertezas de medição, tais como: dados oriundos de especificações de manuais de fabricantes e de certificados de calibração, ou de medidas repetidas nos sensores posicionados nos poços dos termocicladores. Não foram considerados os fatores relativos às condições ambientais, uma vez que a temperatura e a umidade podem ser controladas com procedimentos operacionais e uma equipe treinada; e visto que não foram registradas interferências eletromagnéticas nos ambientes dos laboratórios, em avaliação realizada na rede de alimentação elétrica por empresa especializada. Com relação ao instrumento de medição, foi desconsiderado o tempo de resposta, devido à medição ser realizada em intervalo aproximado de 2s, portanto maior que o tempo de resposta do instrumento. Foram desconsiderados problemas de montagem do sistema de medição e problemas de habilidade de operadores, devido a estes fatores terem sido tratados em treinamento sobre a operação do sistema ministrado à equipe de técnicos de eletrônica. Foram desenvolvidos procedimentos operacionais para o programa de monitoramento de termocicladores capazes de orientar os operadores, e reduzir causas de falhas nas medições. A Figura 14 apresenta o DCE com as fontes de incertezas relacionadas à medição de temperatura do termociclador, consideradas neste trabalho.

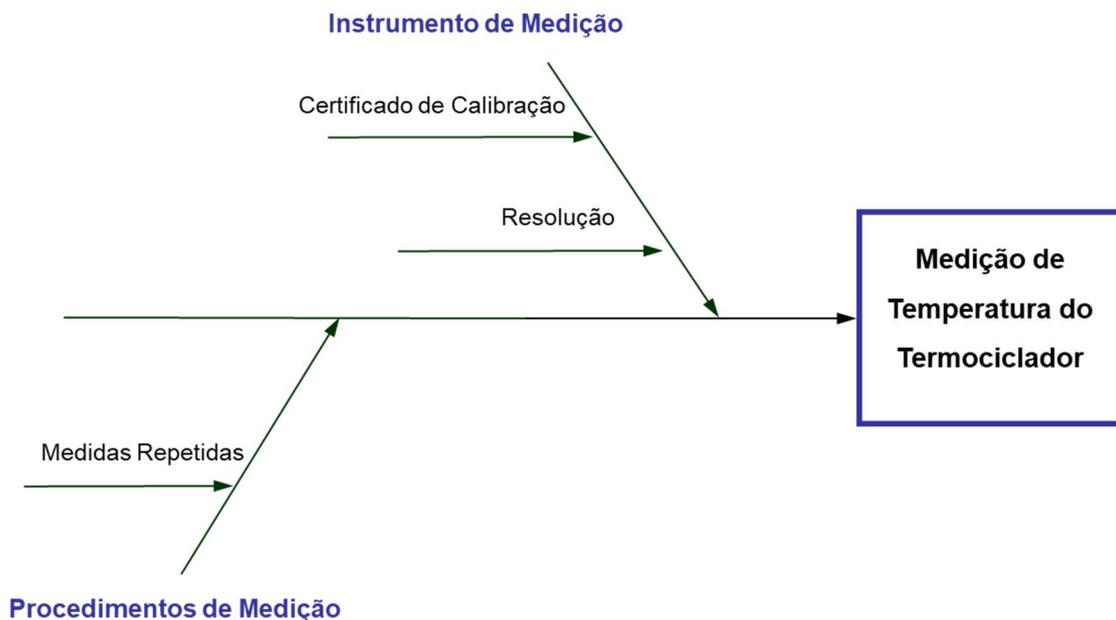


Figura 14: Identificação das fontes de incertezas de medição de temperatura do termociclador.

5.1.3 Contribuições das fontes de incertezas de medição

A seguir foram aplicados os procedimentos previstos no *Guia para a Expressão de Incerteza de Medição – GUM* (INMETRO, 2012a) para a estimativa de incertezas de medição. Para o cálculo da estimativa de incertezas de medição de temperatura do termociclador foram consideradas as seguintes fontes de incertezas de medição: a) as incertezas devido as medidas repetidas, estabelecida como incerteza padrão tipo A, denominadas $u(A)$; b) as incertezas declaradas nos certificados de calibração dos sensores e do instrumento de medição, estabelecida como incerteza padrão tipo B, denominadas $u(B_1)$; e c) a incerteza devido a resolução do instrumento de medição de temperatura, estabelecida como incerteza padrão tipo B denominada $u(B_2)$. Para garantir clareza da contribuição das fontes de incertezas na Incerteza Padrão Combinada, foi construída a Tabela 1, mostrada a seguir.

Tabela 1: Planilha das incertezas nas medições de temperatura de termocicladores.

Símbolo	Fonte de Incerteza	Incerteza	Distribuição	Estimativa de Incerteza	Parâmetro
$u(A)$	Medidas Repetidas nos Sensores de Temperatura	Tipo A	t-Student	$u(A_i) = \frac{S(A_i)}{\sqrt{n}}$	$n = 3$
$u(B_1)$	Certificado de Calibração de Instrumento de Medição	Tipo B	t-Student	$u(B_{1i}) = \frac{U(\text{declarado})}{k}$	$k = 2$
$u(B_2)$	Resolução do Instrumento de Medição de Temperatura	Tipo B	Retangular	$u(B_{2i}) = \frac{a}{\sqrt{3}}$	$a = 0,01$

Incerteza Combinada: $u_c(y) = \sqrt{u(A_i)^2 + u(B_{1i})^2 + u(B_{2i})^2} \text{ } ^\circ\text{C}$

Incerteza Expandida: $U = k u_c(y) \text{ } ^\circ\text{C}$, onde: $k=2$ = fator de abrangência; Nível de Confiança: 95,45%

As estimativas de incerteza expandida de medição utilizando as expressões da Tabela 1, calculadas para o ensaio com três medidas repetidas, foram: $\leq 0,13^\circ\text{C}$ para as temperaturas de 55°C e de 72°C , e $\leq 0,29^\circ\text{C}$ para a temperatura de 95°C . As estimativas de incerteza expandida de medição dos 18 sensores e as médias de temperaturas calculadas para o ensaio com três medidas, são mostradas no Apêndice B. O Apêndice C apresenta um resumo sobre os conceitos básicos para avaliar e expressar a incerteza de medição.

5.1.4 Procedimentos do monitoramento de termocicladores

O monitoramento de termocicladores consiste na verificação anual (SBPC, 2018) das temperaturas nos poços dos termocicladores. As temperaturas medidas nos termocicladores são submetidas à análise dos limiares de controle para o uso adequado do equipamento. Os termocicladores cujas temperaturas apresentem não conformidade ao critério de análise para a adequação de uso são indicados para a manutenção. Os procedimentos do Programa são realizados pela Engenharia Clínica do INCA e as manutenções preventiva e corretiva são realizadas por empresas terceirizadas para esta finalidade. A seguir são apresentados os procedimentos do monitoramento de temperatura de termocicladores.

a) Procedimento para início das medições

Para o início das medições são necessários procedimentos para a preparação do instrumento de medição, e procedimentos para a verificação do ambiente e da segurança do operador. A seguir são descritos os procedimentos necessários para o início das medições, os quais foram embasados em recomendações dos manuais dos equipamentos termocicladores, em manual de biossegurança em laboratórios (TEIXEIRA, 2010), e no manual do instrumento analisador de termociclador (BIOTECH, 2006).

- 1) Aplicar carga a bateria do instrumento TAS, durante 4h, conforme manual do fabricante.
- 2) Iniciar o procedimento de verificação de temperaturas somente se: a temperatura ambiente da sala estiver entre 15° C e 30° C; a umidade relativa do ar estiver na faixa de 30% a 75%; e o bloco do termociclador na temperatura ambiente.
- 3) Usar jaleco, luvas e óculos, para proteção individual do operador.
- 4) Realizar limpeza da bancada de trabalho com pano limpo, e hipoclorito de sódio.
- 5) Realizar limpeza do termociclador com cotonete ou pano limpo, e álcool isopropílico para a limpeza dos poços térmicos e da tampa do termociclador, conforme manual do fabricante.

b) Procedimento para a verificação de temperatura do termociclador

Este procedimento usa o método denominado *in-well*, o qual posiciona os sensores nos poços do termociclador. Foi elaborado tendo como referência o manual do instrumento analisador de termociclador (BIOTECH, 2006), e as instruções de posicionamento de sensores no bloco térmico do termociclador adotadas por BODIN *et*

al. (2012) e por NOLAN *et al.* (2013). O procedimento foi elaborado para a verificação das temperaturas de 95° C, 55° C e 72° C, que são os pontos de interesse para a medição, devido tratar-se de pontos próximos aos pontos de temperaturas programados para a PCR. Os pontos de temperaturas de 4° C e 30° C são considerados no protocolo do instrumento analisador de termociclador, mas não são utilizados para fins de medição, devido não serem importantes para a PCR.

- 1) Realizar o posicionamento dos sensores conforme diagrama da Figura 15.

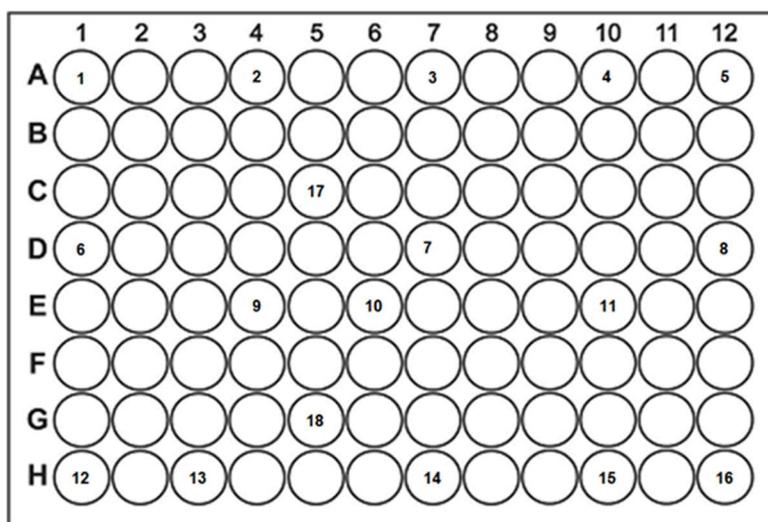


Figura 15: Diagrama de posicionamento dos 18 sensores no bloco do termociclador.

- 2) Preparar o instrumento de medição e conectá-lo ao computador e aos poços do termociclador.
- 3) Programar o termociclador com o seguinte protocolo de ciclos de temperaturas (BIOTECH, 2006): 1 min a 95° C; 2 min a 4° C; 1 min a 95° C; 1 min a 30° C; 1 min a 95° C; 1 min a 55° C; 1 min a 72° C; 30s a 95° C; 30s a 72° C; 2 a min 4° C.
- 4) Dar início às aquisições de dados temperatura, acionando o comando *start* do analisador de termociclador.
- 5) Realizar a leitura das medidas da temperatura de 95° C aos 30s do quinto ciclo de temperatura do protocolo do item “3”.
- 6) Realizar a leitura das medidas da temperatura de 55° C aos 30s do sexto ciclo de temperatura do protocolo do item “3”.
- 7) Realizar a leitura das medidas da temperatura de 72° C aos 30s do sétimo ciclo de temperatura do protocolo do item “3”.
- 8) Repetir duas vezes os itens “3” e “4”, em intervalos de 15 minutos.

c) Critério para a análise da adequação de uso do termociclador

Os critérios para a análise da adequação das temperaturas do termociclador foram estabelecidos visando determinar os parâmetros de exatidão e uniformidade da temperatura nos poços térmicos do termociclador. Cabe mencionar que o termo exatidão descrito no GUM (INMETRO, 2012a) refere *ao grau de concordância entre o resultado de uma medição e um valor verdadeiro do mensurando*. Neste trabalho, não é dada ênfase a análise estatística para a obtenção do valor verdadeiro do mensurando; aqui este valor é considerado o valor nominal de temperatura programada, conforme adotado nos manuais dos termocicladores e na literatura, como no CAP (2012).

Para determinar a exatidão da temperatura, inicialmente foram realizados os cálculos das médias das três medidas das temperaturas dos sensores e os respectivos cálculos das incertezas de medições. A uniformidade foi calculada determinando a diferença entre a temperatura máxima e a temperatura mínima nos poços do termociclador, a partir das médias das três medidas de cada temperatura.

A seguir, foram comparados os resultados das medições de temperatura com um *Limite de Controle*, com o propósito de analisar a conformidade das medições de temperatura aos valores aceitáveis ao uso seguro do termociclador à realização da PCR. Equipamentos com não conformidade ao *Limite de Controle* receberam recomendação para a retirada de uso.

Para estabelecer o *Limite de Controle* buscou-se determinar temperaturas limítrofes ao bom desempenho do termociclador. Para tal, foi considerada a criticidade da temperatura de anelamento (T_a) para o alinhamento dos *primers* (MCPERSON *et al.*, 2006), e observada a recomendação de relacionar a T_a à temperatura de *melting* (T_m), de acordo com a Expressão (2) (CAP, 2012).

$$T_m - 2,50^\circ \text{C} \leq T_a \leq T_m + 2,50^\circ \text{C} \quad (2)$$

Assim, foi estabelecida a Expressão (3) para determinar o *Limite de Controle* para a exatidão das temperaturas programadas no termociclador, neste trabalho temperaturas de 95°C , 55°C e 72°C , denominadas T:

$$T - 1,00^\circ \text{C} \leq T \leq T + 1,00^\circ \text{C} \quad (3)$$

A Expressão (3) também está de acordo com o trabalho de SOUZA (2017) o qual avaliou o desempenho de 18 termocicladores por meio de ensaios de PCR-controle,

realizados com amostras comerciais, e concluiu que somente variações acima de 3° C, da temperatura programada no termociclador, levaram a interferir nos resultados das reações de PCR-controle.

No presente trabalho, a variação de $\pm 1,00^\circ \text{C}$ admissível em torno das temperaturas T foi estimada considerando-se a média e o desvio padrão associados às medidas com o instrumento de medição, em relação à temperatura de $55,00^\circ \text{C}$, temperatura mais crítica do processo. Foram calculados a média amostral ($55,16^\circ \text{C}$) e o desvio padrão amostral ($0,39^\circ \text{C}$) conforme resultado do ensaio com três medidas, mostrado no Apêndice B. Também foi considerada a variação admissível para um nível de confiança de 95%, conforme a Equação (4), resultando no valor de $0,93^\circ \text{C}$ que aproximamos para $1,00^\circ \text{C}$.

$$\text{Variação admissível} = 55,00 - (\mu + 1,96 \sigma) \quad (4)$$

onde:

μ : média amostral

σ : desvio padrão amostral

Para determinar os *Limites de Alerta* de exatidão e de uniformidade de temperatura, foram adotadas as especificações publicadas pelos fabricantes dos equipamentos. Ou seja, dentre os sete modelos estudados, seis apresentam as especificações de $\pm 0,5^\circ \text{C}$ (exatidão) e, $< 0,5^\circ \text{C}$ (uniformidade) e o modelo Veriti apresenta $\pm 0,25^\circ \text{C}$ (exatidão) e $< 0,5^\circ \text{C}$ (uniformidade). O Quadro 1 mostra os critérios para a análise da adequação de uso dos termocicladores, em termos das exatidões e das uniformidades de temperatura entre poços do termociclador.

Quadro 1: Critérios para a análise da adequação de uso dos termocicladores.

Limites das Temperaturas dos Termocicladores			
Exatidão		Uniformidade	
Alerta ($^\circ\text{C}$)	Controle ($^\circ\text{C}$)	Alerta ($^\circ\text{C}$)	Controle ($^\circ\text{C}$)
$<T-0,25; > T+0,25$ (modelo Veriti)	$<T-1,00; > T+1,00$	$\geq 0,50$	$> 1,50$
$<T-0,50; > T+0,50$ (outros modelos)			
Ação: Manutenção	Ação: Retirada de Uso e Manutenção	Ação: Manutenção	Ação: Retirada de Uso e Manutenção

Por exemplo, para a verificação da temperatura de 55,00° C, os termocicladores de modelo 9700 com temperatura acima de 55,50° C ou abaixo de 54,50° C terão registro de alerta, com sinalização ao usuário do equipamento e recomendação para manutenção e acompanhamento da Engenharia Clínica. Os termocicladores com temperatura acima de 56,00° C ou abaixo de 54,00° C terão indicação para a imediata retirada do equipamento de uso e encaminhamento para a manutenção. A uniformidade de temperaturas entre os poços do bloco térmico do termociclador terá registro de alerta, e recomendação de manutenção, para diferenças iguais ou superiores a 0,50° C e indicação para a retirada do equipamento de uso quando tiver diferença de temperatura superior a 1,50° C, esse valor foi arbitrado, com base no histórico de verificação de temperatura dos equipamentos, pois mostrou ser um valor adequado para discriminar os equipamentos com necessidade de retirada uso.

5.2 Implantação do monitoramento de temperatura de termocicladores

O programa de monitoramento de temperatura de termocicladores teve implantação escalonada. As primeiras ações do programa foram realizadas no ano de 2012 nos termocicladores do laboratório de biologia molecular do CEMO/INCA. Esse laboratório atuou como um piloto para a implantação, uma vez que a temperatura dos três termocicladores do laboratório foi verificada, corrigida e monitorada desde o ano de 2012. A implantação do programa foi concluída no ano de 2015 com a aplicação dos procedimentos do programa em todos os termocicladores de 96 poços do INCA (CEMO e CPQ). A implantação do programa de monitoramento de temperatura de termocicladores contemplou o diagnóstico da condição de uso e a verificação da temperatura de todos os termocicladores de 96 poços do INCA (CEMO e CPQ); além das ações de manutenção necessárias para o pleno funcionamento dos equipamentos.

A implantação consistiu na seleção dos equipamentos de 96 poços térmicos, no treinamento dos técnicos e na aplicação dos procedimentos operacionais do monitoramento de temperatura de termocicladores. O treinamento dos técnicos, com duração aproximada de 20 horas, contemplou o total de seis técnicos de eletrônica que foram orientados sobre o funcionamento do termociclador e sobre a aplicação dos procedimentos operacionais do programa.

5.3 Avaliação da efetividade do monitoramento de temperatura de termocicladores

Esta etapa teve por objetivo avaliar a efetividade do monitoramento de temperatura dos termocicladores. Assim, serão descritos os critérios para a seleção do cenário, para o levantamento das condições dos fatores determinantes da otimização do processo de realização dos exames por PCR, e para a seleção e avaliação dos desfechos de efetividade. E ainda serão descritos os critérios para as estimativas de redução de custo operacional de redução de exames com o monitoramento de temperatura de termocicladores.

5.3.1 Seleção do cenário

A escolha do cenário para a realização da avaliação do monitoramento de temperatura de termocicladores teve como critério selecionar um laboratório que permitisse acesso aos registros de dados dos exames realizados. Assim, foi selecionado o laboratório de biologia molecular do CEMO/INCA com o conjunto de três termocicladores qualitativos. Dentre os exames realizados por esse laboratório foi escolhido o exame denominado Rearranjo t(9;22) BCR/ABL Qualitativo. Esse exame tem aplicação reconhecida para o diagnóstico e o acompanhamento do tratamento de Leucemia Mieloide Crônica (LMC) (ABHH, 2012; BRASIL, 2014).

5.3.2 Levantamento das condições dos fatores determinantes da otimização da PCR

A identificação das condições dos fatores determinantes para a otimização da realização dos exames PCR no cenário escolhido, foi obtida de entrevista estruturada com profissionais experientes do laboratório que detêm o domínio sobre as questões de interesse do estudo.

Para a entrevista foi construído um roteiro visando caracterizar as condições dos oito fatores determinantes da otimização da PCR descrito na Figura 7, com exceção apenas do termociclador.

Estes fatores foram associados a 15 itens, os quais foram avaliados pelos entrevistados quanto as suas condições, antes e depois do monitoramento das temperaturas dos termocicladores, na fase pré-implantação, relativo aos anos de 2011 e 2013, respectivamente. Esses itens são descritos no Quadro 2 que apresenta também as questões relacionadas as condições dos 15 itens de interesse do estudo.

Quadro 2: Roteiro para o levantamento das condições dos fatores determinantes para a otimização da PCR no laboratório de estudo.

Itens Determinantes	Questões de Interesse de Estudo	
Amostra de DNA	Existe o registro do método de obtenção de amostra de DNA alvo?	O método foi alterado? A alteração atingiu às características da amostra (homogeneidade, pureza, concentração, integridade de dNTPs)?
Enzima DNA Polimerase	Existe registro do tipo de enzima?	Houve alteração da enzima? Atingiu as características de temperatura e tempo de desnaturação?
dNTPs	Existe registro das características dos dNTPs?	Houve alteração? Atingiu a pureza, integridade, concentração e equilíbrio entre os 4 dNTPs?
Primer	Existe o registro de sequência dos dNTPs?	Houve alteração na sequência e nas características dos dNTPs?
Temperatura de Anelamento (Ta)	Existe o registro da Ta? A Ta faz referência a Tm?	Houve alteração na Ta?
Temperatura de Melting (Tm)	Existe o registro da Tm? Foi calculada mediante a quantidade de dNTPs?	Houve alteração na Tm?
Ciclos de Temperaturas	Existe planejamento dos ciclos de temperaturas?	Houve alteração no planejamento dos ciclos de temperaturas?
Solução Tampão	É fornecida com a Enzima? Existe registro?	Houve alteração? Atingiu o PH ou os elementos constitutivos da solução e suas e concentrações?
Magnésio	Está contido na solução fornecida com a Enzima? Existe registro?	Houve alteração na apresentação ou na concentração de magnésio usado?
Controles: Positivo e Negativo	São usados controles comerciais e/ou domésticos?	Houve alteração dos controles?
Procedimento Escrito para Obtenção de Amostra de DNA	Existe? (Sim/Não)	
Procedimentos Escritos para Multiplex e Nested Rearranjo t(9;22)	Existem? (Sim/Não)	
Recursos Humanos Qualificados	RH treinado na aplicação dos procedimentos e técnicas?	
Ambiente e Fluxo de Trabalho	Ambientes com pré e pós PCR?	Existe controle de Fluxo entre os ambientes?
Pipetas	Verificação da exatidão de volume nas Pipetas?	Qual periodicidade? Houve alteração?

5.3.3 Desfechos da efetividade do monitoramento de temperatura de termocicladores

a) Seleção dos desfechos

Para avaliar a efetividade do monitoramento de temperatura dos termocicladores, foram selecionados os seguintes indicadores: 1) Número de Exames com Recomendação para Repetir; e 2) Número de Exames de Diagnóstico com Resultado Falso. A seleção desses indicadores foi realizada em função dos dados disponíveis nos registros físicos e nos registros dos sistemas informatizados do CEMO/INCA.

Para o caso do indicador *Número de Exames com Recomendação para Repetir* é importante mencionar que no cenário do estudo a recomendação de repetição de exames é realizada em função de análise da equipe técnica do laboratório, considerando o resultado do exame Rearranjo t(9;22) BCR/ABL Qualitativo, realizado por RT-PCR Multiplex, e *Nested*. A recomendação para repetir exame ocorre devido à observação de amostra inadequada ou de resultado indeterminado, que neste último caso é devido a não amplificação do *gene* de controle interno da reação. A recomendação para a repetição de exame não tem influência de avaliação clínica de paciente.

O indicador *Número de Exames de Diagnóstico com Resultado Falso* foi avaliado apenas para o subgrupo de exames com a finalidade clínica de diagnóstico inicial de LMC. Com esse tipo de exame foi possível realizar o cruzamento de informação do resultado do diagnóstico inicial de LMC por PCR qualitativo com o resultado de outros exames também indicados para o diagnóstico de LMC.

b) Levantamento de dados sobre os desfechos

Este levantamento foi retrospectivo, realizado nos registros físicos dos *Formulários de Registros de Exames Rearranjo t(9;22) BCR/ABL*, visando caracterizar os indicadores de efetividade nas fases pré e pós o monitoramento da temperatura dos termocicladores, respectivamente ano 2011 e ano 2013.

Foram considerados, em cada um dos períodos, os exames que atenderam ao critério de estudo, aqui estabelecido pelos exames realizados para as seguintes finalidades clínicas: a) diagnóstico inicial de LMC; b) acompanhamento pós transplante de medula óssea (TMO); e c) identificação de mutação genética. A limitação quanto ao tipo de exames escolhidos para as amostras ocorreu em função de mudança realizada no ano de 2012 no protocolo dos exames para a avaliação do tratamento de LMC com medicamento. A partir de então os exames de acompanhamento de tratamento de

paciente com medicamento foram realizados por PCR quantitativo (qPCR, ou PCR em tempo real).

Foi necessário estabelecer um critério para a seleção das amostras de exames para o estudo, de modo a eliminar possíveis vieses nos desfechos em função dos tipos de exames representados nas amostras. Assim, foram obtidas duas amostras aleatórias de 30% dos exames que atenderam ao critério do estudo, que representam os grupos de estudos de exames realizados nos mesmos termocicladores qualitativos.

As variáveis utilizadas para a elaboração dos indicadores de efetividade, oriundas dos registros físicos, são: *Data e Número do experimento, Nome do paciente, Número da amostra, Resultados Multiplex/Nested (Positivo/Negativo/Repetir)*. As variáveis utilizadas, oriundas dos sistemas informatizados, são: *Número da Matrícula do Paciente, Nome do exame, Data do exame, Resultado*. Cabe destacar que neste estudo, o nome do paciente foi utilizado apenas para obter o seu número de matrícula, necessário para o acesso aos sistemas informatizados do INCA.

Com o objetivo de obter os dados necessários para identificar o número de *Exames Diagnósticos com Falsos Resultados*, foram realizadas consultas ao Sistema de Gerenciamento do CEMO (SGC) e ao Sistema de Aplicações Clínicas do INCA (SAC). Nesses sistemas foram obtidos os resultados de outros exames diagnósticos de LMC (Citogenética, Mielograma e Rearranjo t(9;22) BCR/ABL Quantitativo qPCR), os quais foram comparados com o resultado do exame Rearranjo t(9;22) BCR/ABL Qualitativo, para verificar a ocorrência ou não de falsos resultados nos exames de diagnóstico inicial em LMC por PCR qualitativo.

O acesso aos dados do CEMO/INCA foi liberado para o presente estudo mediante aprovação de projeto submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), número: 55039316.6.3001.5274, avaliado pelas comissões do CEP UFRJ e do CEP INCA.

A análise dos dados foi realizada com o pacote estatístico R *version 3.5.2, package meta*.

5.3.4 Estimativa de custo operacional de repetição de exames

Nesta seção serão descritas as estimativas de custo de repetição de exames, em três contextos distintos: a) CEMO 2011; b) CEMO 2015; e c) SUS 2016.

O contexto relativo ao CEMO ano de 2011 é definido pela fase anterior ao monitoramento da temperatura de termocicladores, relativa à avaliação da efetividade realizada no laboratório de biologia molecular do CEMO/INCA, com três

termocicladores, envolvendo o exame Rearranjo t(9;22) BCR/ABL Qualitativo (também denominado Rearranjo LMC).

O contexto relativo ao CEMO ano de 2015 é definido pelo diagnóstico da condição de uso de termocicladores realizado na implantação do programa de monitoramento de temperatura de termocicladores, referente a 13 termocicladores do CEMO/INCA, envolvendo os exames Rearranjo LMC, Rearranjo LMA (de Leucemia Mieloide Aguda), Translocações, Quimerismos, Vírus e Histocompatibilidade. Esse estudo foi limitado a termocicladores de três laboratórios do CEMO/INCA que realizaram os citados exames, em decorrência de restrição de disponibilidade de dados de outros exames realizados no CEMO/INCA. Os dados sobre os exames foram obtidos no Sistema de Gerenciamento do CEMO (SGC), no Sistema de Aplicações Clínicas do INCA (SAC) e em informações de produção de exames para faturamento do CEMO.

O contexto relativo ao SUS ano de 2016 é definido pelos exames de genética registrados em todo o Brasil no SIASUS para o ano de 2016. Esses dados foram obtidos no SIASUS para exames de código 020210, procedimento identificação de mutação/rearranjos por PCR e outros (BRASIL, 2017g).

As estimativas de custo operacional de repetição de exames foram realizadas em função do cálculo da estimativa de número de exames com recomendação para repetir, denominado *Número de Exames Repetidos*, Equação (5).

$$\text{Número de Exames Repetidos} = \text{Número de Exames} \times \text{Proporção} \times \text{Índice} \quad (5)$$

onde:

Número de Exames Repetidos: número de exames repetidos.

Número de Exames: número total de exames realizados no ano.

Proporção: proporção entre o número de equipamentos inadequados e o número total de equipamentos.

Índice: índice de repetição de exame por equipamento inadequado.

A Equação (5) foi construída considerando o pressuposto que o termociclador em condição adequada de uso não gera exame com indeterminação de resultado, e com consequente recomendação para repetir. Para atender ao pressuposto, foi descrita a Equação (6) para determinar o índice de repetição de exame por equipamento inadequado, e a Equação (7) para determinar o número de exames realizados em

equipamentos inadequados. As Equações (6) e (7) foram obtidas com dados da amostra do estudo de 2011, fase anterior ao monitoramento da temperatura de termocicladores em laboratório do CEMO/INCA.

$$\text{Índice} = \frac{\text{Número de Exames para Repetir da Amostra 2011}}{\text{Número de Exames Realizados em Equipamentos Inadequados}} \quad (6)$$

onde:

Índice: índice de repetição de exame por equipamento inadequado.

Número de Exames para Repetir da Amostra 2011: número de exames Rearranjo LMC da amostra do estudo de 2011 com recomendação para repetir devido resultado indeterminado.

Número de Exames Realizados em Equipamentos Inadequados: *y*.

$$y = \frac{\text{Número de Exames da Amostra 2011} \times \text{Número de Equipamentos Inadequados 2011}}{\text{Número de Equipamentos 2011}} \quad (7)$$

onde:

y: *Número de Exames Realizados em Equipamentos Inadequados* (considerando que o equipamento adequado não gera repetição de exame).

Número de Exames da Amostra 2011: número de exames Rearranjo LMC da amostra do estudo de 2011.

Número de Equipamentos Inadequados 2011: número de equipamentos inadequados do laboratório de Biologia Molecular do CEMO do estudo de 2011.

Número de Equipamentos 2011: número total de equipamentos do estudo de 2011.

Para indicar a proporção entre o número de equipamentos inadequados e o número total de equipamentos foi descrita a Equação (8).

$$\text{Proporção} = \frac{\text{Número de Equipamentos Inadequados}}{\text{Número de Equipamentos}} \quad (8)$$

onde:

Proporção: proporção entre o número de equipamentos inadequados e o número total de equipamentos, no contexto.

Número de Equipamentos Inadequados: número de equipamentos inadequados utilizados para a realização dos exames, no contexto.

Número de Equipamentos: número total de equipamentos utilizados para a realização dos exames, no contexto.

Para o cálculo das estimativas do custo operacional de repetição de exames foi construída a Equação (9), denominada *Custo de Repetição*.

$$\text{Custo de Repetição} = \text{Número de Exames Repetidos} \times \text{Custo Operacional} \quad (9)$$

onde:

Custo de Repetição: estimativa do custo operacional de realização dos exames com recomendação para repetir devido à indeterminação dos resultados.

Número de Exames Repetidos: número de exames repetidos no contexto.

Custo Operacional: custo operacional do exame no contexto.

As análises tiveram como perspectiva o custo operacional dos laboratórios para a realização de exames, deste modo, neste estudo foi utilizado o custo operacional dos exames descrito pela tabela da Associação Médica Brasileira (AMB), conforme informações a seguir.

a) Contexto CEMO 2011

Para a estimativa do custo operacional de repetição de exames no contexto do CEMO ano de 2011 foi utilizado o valor do custo operacional de R\$29,97 (Vinte e nove Reais e noventa e sete centavos). Esse valor é referente ao custo operacional do exame por PCR código: 4.03.14.04-9 (procedimento: Cromossomo Philadelphia, pesquisa) obtido da Classificação Brasileira Hierarquizada de Procedimentos Médicos (CBHPM) da Associação Médica Brasileira (AMB) (CBHPM, 2016).

b) Contexto CEMO 2015

A estimativa do número de exames repetidos neste contexto foi calculada para cada um dos três laboratórios que realizaram os exames, e a seguir foi efetuada a soma dessas estimativas para apresentar o valor consolidado para o contexto do CEMO 2015.

Para a estimativa do custo operacional de repetição de exames no contexto do CEMO ano de 2015, com a finalidade de simplificação, foi utilizado o valor do custo operacional R\$29,97 (Vinte e nove Reais e noventa e sete centavos), referente ao exame

código 4.03.14.04-9, procedimento Cromossomo Philadelphia, como referência para os exames: Rearranjos, Translocações, Quimerismos e Vírus.

O valor do custo operacional R\$62,40 (Sessenta e dois Reais e quarenta centavos) referente ao exame código 4.04.04.04-8, procedimento Análise HLA doador VNTR ou STR pré-transplante, foi utilizado como referência para os exames de Histocompatibilidade. Ambos obtidos da Classificação Brasileira Hierarquizada de Procedimentos Médicos (CBHPM) da Associação Médica Brasileira (AMB) (CBHPM, 2016).

c) Contexto SUS 2016

Para o contexto SUS ano 2016, devido à falta de informação sobre os termocicladores que realizaram os exames registrados no SIASUS, a Equação (8) foi calculada usando os dados do Contexto CEMO 2011 e do Contexto CEMO 2015, para descrever duas possibilidades de proporção entre o número de equipamentos inadequados e o número total de equipamentos.

Para a estimativa do custo operacional de repetição de exames, foi utilizado o valor do custo operacional de R\$32,64 (Trinta e dois Reais e sessenta e quatro centavos). Esse valor é referente ao custo operacional do exame código 4.05.03.14-3, procedimento amplificação de material genético (por PCR, PCR em tempo Real, LCR, RT-PCR ou outras técnicas), obtido da Classificação Brasileira Hierarquizada de Procedimentos Médicos (CBHPM) da Associação Médica Brasileira (AMB) (CBHPM, 2016).

6 RESULTADOS

6.1 Implantação do programa de monitoramento de temperatura de termocicladores

O programa foi aplicado em 11 laboratórios do INCA, em um total de 41 termocicladores, pertencentes a 4 fabricantes e 7 modelos distintos. O diagnóstico da implantação do programa de monitoramento de temperatura de termocicladores realizado em 2015 identificou: a) 23 termocicladores em condições operacionais, com suas temperaturas dentro da faixa de tolerância estabelecida para a adequação de uso; b) 16 termocicladores fora dos limites de tolerância de temperaturas para a adequação de uso, necessitando de ajustes de temperaturas e indicados para manutenção preventiva; e c) 2 equipamentos com defeito, indicados para manutenção corretiva. A Tabela 2 apresenta o total de equipamento avaliado por laboratórios do INCA, o número de equipamentos em boas condições (OK), o número de equipamentos indicado para manutenção preventiva (MP) e o número indicado para manutenção corretiva (MC).

Tabela 2: Diagnóstico da análise de adequação de uso dos termocicladores da implantação do programa de monitoramento de temperatura de termocicladores.

Laboratório	Total de Equipamentos	Análise de Adequação ao Uso		
		OK ¹	MP ²	MC ³
Pesquisa Clínica	5	3	1	1
Oncovirologia	4	4	0	0
Farmacologia	1	1	0	0
Célula Tronco	3	3	0	0
Biologia Molecular	5	4	1	0
Onco-Hemato Pediatria	4	1	3	0
Genética	8	2	6	0
Biologia Celular	1	1	0	0
Banco Nacional de Tumores	2	2	0	0
Carcinogênese Molecular	4	2	1	1
Imunogenética	4	0	4	0

¹Condições Operacionais; ²Indicação de Manutenção Preventiva; ³Indicação de Manutenção Corretiva.

6.2 Avaliação da efetividade do monitoramento de temperatura de termocicladores

6.2.1 Condições dos fatores determinantes da PCR

O Quadro 3 indica a condição de cada fator no laboratório do CEMO, e se houve alteração nas condições dos fatores entre os períodos de 2011 e 2013.

Quadro 3: Condições dos fatores de otimização da PCR no laboratório de biologia molecular do CEMO/INCA.

Fatores Determinantes da PCR	Condições no Laboratório
Amostra de DNA	Existe o registro do método de obtenção de amostra de DNA. Não houve alteração do método. A amostra é obtida com o protocolo operacional padrão escrito do laboratório.
Enzima DNA Polimerase	Existe o registro do tipo de enzima. Não houve alteração da enzima. São compradas apenas as marcas pré-qualificadas no INCA.
dNTPs	Existe registro das características dos dNTPs. Não houve alteração dos dNTPs. São compradas apenas as marcas pré-qualificadas no INCA.
Primer	Existe o registro das sequências dos dNTPs. Não houve alteração nas características e sequência dos dNTPs. São compradas apenas as marcas pré-qualificadas no INCA.
Temperatura de Anelamento (Ta)	Existe o registro da Ta. A Ta faz referência a Tm. Não houve alteração na Ta.
Temperatura de Melting (Tm)	Existe o registro da Tm. Não houve alteração na Tm. A Tm faz referência as quantidades de dNTPs.
Ciclos de Temperaturas	Existe o registro dos Ciclos de Temperaturas. Não houve alteração nos Ciclos de Temperaturas.
Solução Tampão	Existe registro da solução tampão. Não houve alteração na solução tampão. A solução tampão é fornecida com a enzima.
Magnésio	Existe registro do magnésio. Não houve alteração. O magnésio está contido na solução fornecida com a enzima.
Controles: Positivo e Negativo	Existe registro dos controles. Não houve alteração. São usados controles comerciais e ainda controle de DNA de doador.
Procedimento Escrito para Obtenção de Amostra de DNA	Existe procedimento operacional escrito. Não houve alteração no procedimento.
Procedimentos Escritos para PCR Rearranjo t(9;22) BCR/ABL Multiplex e Nested	Existem procedimentos operacionais escritos. Não houve alteração nos procedimentos.
Recursos Humanos Qualificados	Existem profissionais qualificados, treinados e experientes na aplicação dos procedimentos e técnicas. Houve alteração parcial, mas sem perda de qualificação e/ou experiência dos profissionais.
Ambiente e Fluxo de Trabalho	Existe infraestrutura com ambientes pré e pós PCR. Existe controle de Fluxo entre os ambientes. Não houve alteração no ambiente e fluxo de trabalho.
Pipetas	Existe verificação da exatidão de volume das Pipetas. Periodicidade anual. Não houve alteração.

Os procedimentos operacionais escritos do laboratório não tiveram alteração entre os períodos dos estudos. Assim como não houve alteração nos materiais usados na PCR, tais como enzimas e dNTPs, os quais em ambos os períodos foram adquiridos de marcas pré-qualificadas. Também não houve alteração nos controles positivos e negativos.

Houve alteração parcial de recursos humanos, no entanto, em ambos os períodos, o laboratório atuou com profissionais qualificados, treinados e experientes na aplicação dos procedimentos e das técnicas de biologia molecular. As condições do ambiente e fluxo de trabalho se mantiveram sem alteração, atendendo aos requisitos de áreas independentes para pré e pós PCR. Em ambos os períodos houve manutenção e calibração para as pipetas usadas nos laboratórios. Em 2013 o planejamento de manutenção foi ampliado, com contrato de manutenção específico para esta finalidade.

Assim, as condições dos 15 itens do formulário apresentaram-se satisfatórias, atendendo as condições necessárias estabelecidas para garantir a otimização da PCR, como preconizadas na literatura (CAP, 2015; OECD, 2015; WHO, 2009; KENNEDY *et al.*, 2011; DEGEN *et al.*, 2006; MCPHERSON *et al.*, 2006), e sem alterações entre os anos de 2011 e 2013.

6.2.2 Desfechos da efetividade do monitoramento de temperatura de termocicladores

a) Descrição da Amostra

Foram 1526 exames realizados no ano de 2011 e 2574 exames no ano de 2013. A Figura 16 mostra os totais de exames que atenderam ao critério de estudo e os totais das amostras de 30% dos exames que atenderam aos critérios do estudo, em cada período.

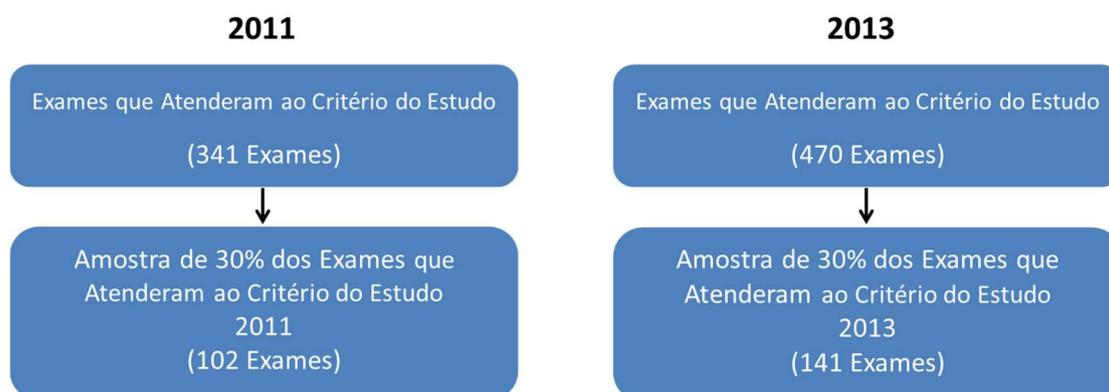


Figura 16: Totais das amostras de exames utilizadas para os estudos em cada período.

A Tabela 3 caracteriza as duas amostras com relação às finalidades clínicas dos exames.

Tabela 3: Caracterização dos exames das amostras do estudo por finalidade do exame.

Finalidade Clínica dos Exames	2011	2013
Diagnóstico inicial de LMC	52	71
Acompanhamento Pós Transplante de Medula Óssea	40	69
Mutação Genética	10	1

b) Indicadores da efetividade do Programa

A Tabela 4 apresenta as frequências observadas para os indicadores (*Número de Exames com Recomendação para Repetir* e *Número de Exames Diagnósticos com Falsos Resultados*) por período. Foram obtidos 21 (20,6%) *Exames com Recomendação para Repetir* em 2011 e 5 (3,5%) em 2013. Para o desfecho *Número de Exames Diagnósticos com Resultado Falso*, foram usados 52 exames no período 2011 e 71 exames no período 2013. Com relação a este segundo indicador, o presente estudo não identificou divergências de resultados entre os laudos dos exames Rearranjo t(9;22) BCR/ABL Qualitativo e os laudos de outros exames diagnósticos em LMC, quer no ano 2011 ou no ano de 2013.

Tabela 4: Frequência observada dos desfechos e tamanho das amostras.

Desfecho	2011	2013
Exames com Recomendação para Repetir	21 (N: 102)	5 (N: 141)
Exames Diagnósticos com Falsos Resultados	0 (N: 52)	0 (N: 71)

A Figura 17 ilustra o resultado dos *Exames com Recomendação para Repetir*, associados ao motivo da recomendação para repetição, quer por amostra inadequada representada em azul, ou por indeterminação de resultado representada em vermelho.

Note-se a redução em vermelho do indicador de recomendação para repetição de exames devido à indeterminação de resultado.

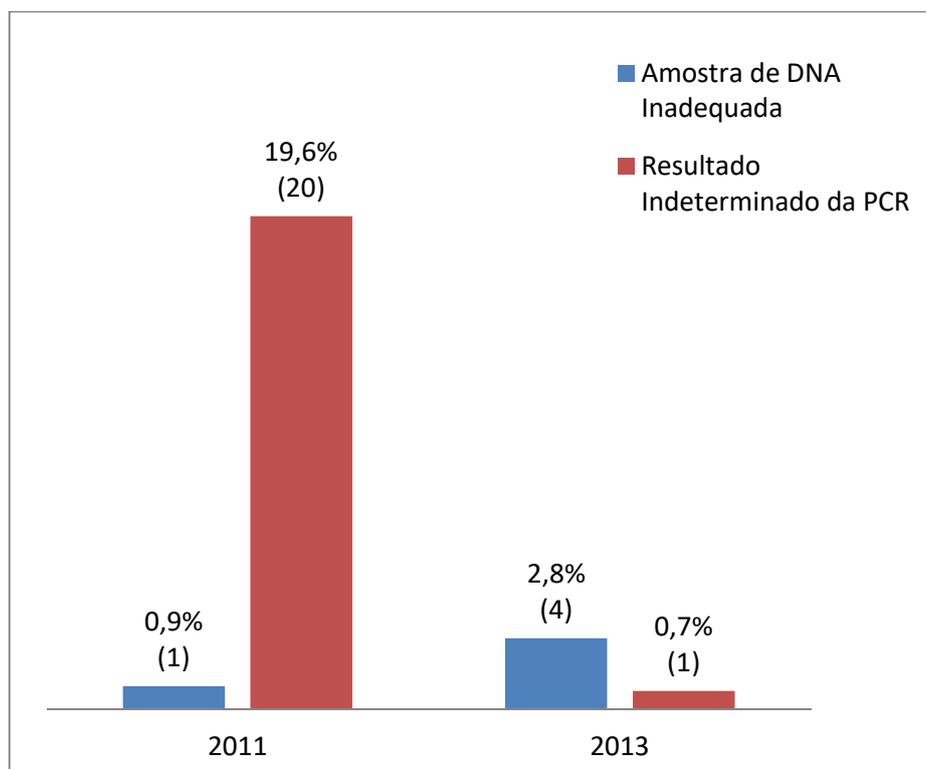


Figura 17: Gráfico com os percentuais dos exames com recomendação para repetir pelo motivo da recomendação, Amostra Inadequada e Indeterminação de Resultado.

Em 2011, 20 exames tiveram indicação para repetir devido a condição de indeterminação de seu resultado (19,6%), e um exame foi indicado para repetir devido a amostra de DNA apresentar-se inadequada para o exame (0,9%). Em 2013, um exame foi indicado para repetir devido a indeterminação de resultado (0,7%), e quatro exames tiveram indicação para repetir devido a amostra inadequada (2,8%).

O indicador *Exames com Recomendação para Repetir* devido à indeterminação ou impossibilidade de conclusão segura de seu resultado, representou redução de 18,9 pontos percentuais no ano de 2013, em relação ao ano de 2011. Isso equivale a uma diferença relativa de risco pré-intervenção sob o risco pós-intervenção de 18,90% com IC 95% [11,07 – 26,73], sendo significativo para o valor de $z = 4,73$ com $p < 0,0001$. Uma outra medida dessa associação pode ser dada pelo risco relativo de se ter um teste com recomendação de repetição na fase pré-intervenção pelo risco na fase de pós-

intervenção de 27,65 IC 95% [3,77 – 202,69], significativo para o valor de $z = 3,27$ com $p < 0.0011$. Outra forma de interpretar esse resultado é utilizar o NNH (do inglês, *Number Need to Harm*). Essa medida indica o número de exames a serem expostos ao risco para se obter um exame com recomendação para repetir, que no caso foi de 5.

A Tabela 5 associa os exames com recomendação para repetir com a finalidade clínica dos exames. A Tabela 6 ilustra o número de exames indeterminados, com recomendação para repetir, que após a repetição ficou claro tratarem-se de exames positivos.

Tabela 5: Recomendação para repetir em função da finalidade clínica do exame.

Finalidade Clínica dos Exames	Recomendação para Repetir	
	2011	2013
Diagnóstico inicial de LMC	11	4
Acompanhamento Pós Transplante de Medula Óssea	7	1
Mutação Genética	3	0

Tabela 6: Exames indicados para repetição devido indeterminação do resultado, que após a repetição apresentaram resultado positivo.

Finalidade Clínica dos Exames	Após Repetir	
	2011	2013
Diagnóstico inicial de LMC	0	0
Acompanhamento Pós Transplante de Medula Óssea	1	0
Mutação Genética	2	0

6.2.3 Estimativa de custo operacional de repetição de exames

As estimativas de Número de Exames Repetidos e de Custo de Repetição foram calculadas para os três contextos e apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7: Estimativas de custo operacional de repetição de exames.

CONTEXTO/Tipo de Exame	Número de Exames	Proporção de Equipamentos Inadequados	Estimativa de Número de Exames Repetidos ¹	Valor do Custo Operacional	Estimativa de Custo de Repetição ²
CEMO (2011) Rearranjo t(9;22)BCR/ABL	1.526	0,67	307	R\$ 29,97	R\$ 9.192,58
CEMO (2015) Rearranjos, Translocações, Quimerismos	1.866	0,20	112	R\$ 29,97	R\$ 3.355,44
Vírus	4.515	0,00	0	R\$ 29,97	R\$ 0,00
Histocompatibilidade	5.357	1,00	1.607	R\$ 62,40	R\$ 100.283,04
Todos os Exames	11.738		1.831		R\$ 103.638,48
SUS (2016) Exames de Genética ³	198.014	0,67	38.474	R\$ 32,64	R\$ 1.299.098,57
Exames de Genética ⁴	198.014	0,39	23.168	R\$ 32,64	R\$ 756.191,70

¹ Estimativa obtida pelo produto do número de exames, da proporção de equipamento inadequado, e do índice de repetição por equipamento inadequado (0,30).

² Estimativa obtida pelo produto da estimativa de exames repetidos e do valor do custo operacional.

³ Estimativas obtidas em função da proporção de equipamentos inadequados usada para o contexto do CEMO 2011 (0,67); (2/3 equipamentos inadequados).

⁴ Estimativas obtidas em função da proporção de equipamentos inadequados usada para o contexto do CEMO 2015 (0,39); (5/13 equipamentos inadequados).

7 DISCUSSÃO

Estudos apontam que erros na execução da PCR têm potencial de interferir nos diagnósticos de doenças, além de implicar em problemas como falsas mutações de sequenciamento de nova geração (PINTO *et al.*, 2012; POTAPOV *et al.*, 2017), assim como, em problemas de processamento de dados genéticos em larga escala (BLOW, 2017). Cabe aqui mencionar que o preparo de alguns tipos de biblioteca para o sequenciamento de nova geração pode ou não utilizar a PCR; nos casos que utilizam a PCR, um falso resultado positivo, por exemplo, pode levar a uma falsa mutação no sequenciamento.

Embora a PCR seja considerada técnica amplamente validada, os erros na sua execução podem ser explicados em função do mau desempenho de fatores da reação. Este trabalho buscou associar um dos fatores determinantes da otimização da PCR, o equipamento termociclador, a potencial ocorrência de falha na PCR.

Os resultados da avaliação da efetividade do programa de monitoramento de temperatura de termocicladores, obtidos no presente trabalho, corroboraram com os relatos de o mau desempenho do termociclador afetar a PCR (KIM *et al.*, 2008; SAUNDERS *et al.*, 2001; SCHODER *et al.*, 2003). A avaliação demonstrou que após a intervenção nos termocicladores houve redução de 18,9 pontos percentuais na recomendação de repetição de exames indeterminados. Associamos a melhoria deste indicador à intervenção de monitoramento de temperatura dos termocicladores, devido às condições dos demais fatores determinantes da PCR não ter apresentado modificação ao longo do estudo. Este achado nos alerta sobre a importância da verificação periódica da temperatura dos termocicladores, de modo a minimizar o risco de equipamento inadequado ao uso produzir resultado de PCR não confiável. Isto vai de encontro ao senso comum, que em geral, não considera o mau desempenho do termociclador como um fator de erro na PCR.

Este foi um ponto importante do presente trabalho, evidenciar a necessidade de um controle preciso e consistente da temperatura da PCR. Geralmente, é assumido que as temperaturas são uniformes em todos os poços em um termociclador e que os pontos de programação de temperatura são atingidos com exatidão durante a termociclagem. Porém, esses parâmetros de temperatura podem se alterar com o tempo, levando a exames com resultados falhos.

Por outro lado, o resultado da avaliação de efetividade do programa, mostrou que dentre os motivos para a recomendação de repetição de exame foi observado um

crescimento devido à amostra inadequada (1,9%), que não pode ser atribuído ao desempenho do termociclador. Isto talvez possa ter acontecido devido ao aumento de demanda externa ao INCA por realização do exame Rearranjo t(9;22) BCR/ABL, no ano de 2013. No entanto, a princípio, esta condição não representa vício no processo de preparação de amostra de DNA do laboratório em estudo, pois, a amostra de paciente é recebida de outras áreas do INCA e de diversos hospitais públicos para a realização do exame no laboratório do CEMO/INCA, sem que a coleta de amostras de pacientes seja realizada nesse laboratório.

Neste trabalho, o indicador de efetividade proposto *Número de Exames com Recomendação para Repetir* mostrou-se também relevante para conduzir estimativas de custo operacional de repetição de exames. Estas estimativas, descritas em três contextos, nos fazem supor que medidas para o monitoramento de temperatura de termocicladores podem ter impacto importante não somente para a redução de erros na PCR, mas também para a redução de gastos com a repetição de exames.

Devido à falta de conhecimento sobre a condição operacional dos termocicladores do contexto do SUS, consideramos para a estimativa de custo operacional de repetição de exames em 2016, valores diferentes para expressar a proporção entre equipamentos inadequados e o total de equipamentos que realizaram os exames. Neste caso, adotamos uma proporção maior, 2/3 (0,67), e outra menor, 5/13 (0,39), que foram obtidas nos estudos dos contextos do CEMO 2011 e do CEMO 2015, respectivamente. Isto permitiu estimar um valor médio de custo operacional de repetição para o contexto SUS 2016 de R\$1.027.645,14. Porém, alertamos que a magnitude dos gastos em decorrência de exames realizados em termocicladores inadequados, naturalmente poderá diferir à estimada neste trabalho, a depender da real condição de funcionamento desses termocicladores, e à ocorrência de outros fatores. Estas estimativas devem ser interpretadas com muita cautela, não somente por ser desconhecida a proporção de termocicladores inadequados, mais ainda, por haver outras condições que aqui se mostraram adequadas ou ótimas, mas que podem influenciar negativamente outros ensaios, em outros cenários. A inadequação dos termocicladores nestes outros cenários pode ter um impacto maior ou menor no número de exames a repetir.

Além disso, no contexto CEMO 2015 foi adotada uma simplificação com relação ao valor operacional dos exames para a identificação de partículas virais, que na realidade apresentam valores distintos, em geral valores superiores a R\$29,97; e também foi realizada uma extrapolação com relação à proporção de equipamentos

inadequados, que considerou uma mesma taxa de exames a serem repetidos, sem considerar as diferenças existentes entre as técnicas PCR de cada tipo de exame.

Temos ainda que considerar que eventualmente pode ter ocorrido subnotificação de exames nos sistemas de informação utilizados, o que, neste caso, levaria a um número maior de exames realizados e a um conseqüente aumento do valor estimado de custo operacional de repetição.

Ainda com relação à proporção entre o número de equipamentos inadequados e o número total de equipamentos, notamos que a proporção obtida para o contexto CEMO 2011, 2/3 (0,67), equivale à proporção de 4/6 (0,67) identificada na avaliação de termocicladores do Centro de Pesquisa/INCA em ensaios com amostras homogêneas. Ressaltamos que estas proporções dizem respeito a dados obtidos antes do monitoramento de temperatura de termocicladores. Contudo, a proporção de 2/3 (0,67), apresenta-se superior tanto à proporção do contexto do CEMO 2015, 5/13 (0,39), quanto à identificada na implantação do programa no INCA em 2015, 18/41 (0,44), quando alguns equipamentos já estavam sob o monitoramento de temperatura. Isto nos faz refletir que mesmo em uma instituição de referência do Ministério da Saúde, identificamos cenários que apresentam valores superiores a 60% de equipamentos inadequados.

Porém, a proporção do contexto CEMO 2011, 2/3 (0,67), apresenta-se inferior à proporção de 14/18 (0,78), quando comparada ao estudo de SOUZA (2017), que identificou 14 termocicladores inadequados ao uso em um total de 18 termocicladores avaliados em hospital universitário do Estado de Santa Catarina, por meio de ensaios com amostras comerciais, outro método de avaliação. Esse estudo revela o elevado número de termocicladores inadequados ao uso que poderá ser identificado em diversos laboratórios brasileiros, com conseqüente implicação no custo operacional de repetição de exames.

Com relação ao indicador *Número de Exames Diagnósticos com Resultado Falso*, a tentativa de utilizá-lo não foi bem sucedida. No presente trabalho, não foi identificado pedido de repetição de exame com resultado falso negativo, em ambas as amostras do estudo. Isso pode indicar que os procedimentos de controle do laboratório do CEMO, considerado um laboratório de referência nessa área, foram suficientes para impedir a conclusão de exame de paciente com resultado falso negativo. Por exemplo, os dados de 2011 revelaram três exames com recomendação para repetir, devido indeterminação de resultado, que, no entanto, após a repetição ficou claro tratarem de casos de resultados

positivos, e nestes casos os exames foram concluídos com laudos de resultados positivos.

Porém, o uso desse indicador deve ser considerado com cautela, dado o tamanho reduzido da amostra, uma vez que este estudo foi limitado aos exames com a finalidade de diagnóstico inicial de LMC. Devido ao fato de os demais tipos de exames dependerem de análise clínica para o acompanhamento e de comparação com outros exames, ou ainda representarem evento raro. Contudo, embora esse indicador não tenha mostrado ocorrência de registros, não é recomendável descartá-lo em eventuais estudos em outros laboratórios, sem antes realizar análise crítica das condições operacionais do laboratório. É possível supor que a condição dos fatores determinantes da PCR, encontrada no laboratório do CEMO, referência no Brasil para a avaliação de LMC, pode não se reproduzir igualmente em outros laboratórios de biologia molecular.

Outro ponto importante do presente trabalho foi o desenvolvimento do processo de medição de temperatura do termociclador, com o qual foi possível atribuir os resultados de PCR indesejáveis a falhas no controle da temperatura do termociclador. O principal desafio para o desenvolvimento da etapa de pré-implantação do programa foi realizar a adaptação do instrumento analisador de termociclador para garantir a adequada medição de temperatura. Foi necessário superar o problema de medição com a tampa do termociclador aberta e estabelecer os procedimentos para as verificações de temperatura e para as estimativas de incerteza de medição dos sensores.

Com relação ao resultado do diagnóstico da implantação do programa, os termocicladores que apresentaram não conformidade ao procedimento proposto foram os termocicladores de uso mais intenso. Isto pode ter ocorrido em função desses equipamentos estarem instalados em laboratórios com alta produção de exames. Entretanto, não foi possível quantificar a intensidade de uso dos termocicladores, pois estes não dispõem de medidores de tempo de uso, recurso que seria útil para refinar o programa.

Assim, tendo em vista o trabalho realizado, é possível apresentar algumas recomendações para as equipes dos laboratórios, visando à melhoria da otimização da PCR. Inicialmente são enfatizados quatro aspectos essenciais para manter o controle da temperatura do termociclador, que são: a) planejar a verificação periódica da temperatura de termocicladores; b) estabelecer um *layout* da disposição dos sensores nos poços do bloco térmico; c) estabelecer um limite de controle do usuário; e d) orientar as medições no ponto de ajuste dos ciclos de temperatura. Adicionalmente, é

recomendado que na ausência de um instrumento analisador de termociclador, a verificação periódica do desempenho do termociclador seja realizada, por exemplo, utilizando teste de PCR controle com amostras homogêneas.

Outra recomendação diz respeito ao desenvolvimento de um analisador de termociclador para a medição de temperatura com a tampa do termociclador fechada, devido à dificuldade de aquisição de um instrumento adequado à medição de temperatura de termociclador, aqui identificada.

For fim, vale ressaltar que a metodologia desenvolvida neste trabalho poderá ser estendida aos termocicladores quantitativos. Porém, além de adaptações para a medição de temperatura, será necessário o estudo sobre medição de intensidade de fluorescência, porque, nesse tipo de termociclador, a quantificação do produto amplificado é realizada por meio de monitoramento de emissão de fluorescência e visualizada em tempo real na tela do computador.

8 CONCLUSÃO

A avaliação da efetividade do programa de monitoramento de temperatura de termocicladores demonstrou que a intervenção foi efetiva para reduzir a recomendação de repetição de exames indeterminados e pôde expressar uma economia de custos para o laboratório do CEMO. As estimativas de número de exames repetidos e de custo operacional de repetição, para os demais contextos do estudo, revelaram o impacto potencial que o mau funcionamento do termociclador pode representar em termos de gastos.

Essas evidências alertam sobre a necessidade de verificação sistemática de temperatura do termociclador para a otimização da PCR. Questão às vezes negligenciada, não somente devido à confiança excessiva no equipamento, mas também em vista das dificuldades em prover as condições adequadas para a medição de temperatura do termociclador.

REFERÊNCIAS

- ABHH. Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. MB. Leucemia Mieloide Crônica. 2012. Disponível em: http://amb.org.br/diretrizes/_DIRETRIZES/leucemia_mieloide_cronica/files/assets/common/downloads/publication.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2016.
- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT NBR ISO 14971:2009 Produtos para a saúde - Aplicação de gerenciamento de risco a produtos para a saúde. 2009.
- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT NBR ISO 15189:2015 Laboratórios clínicos - Requisitos de qualidade e competência. 2015.
- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 Versão Corrigida 2:2006. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. 2010.
- ALTSHULER., M. L. **PCR troubleshooting: The essential guide**. 1 Ed. Norfolk: Caister Academic Press, 2006. 80 p.
- AMB. Associação Médica Brasileira. Classificação brasileira hierarquizada de procedimentos médicos - CBHPM. 2016.
- ANDRADE, G. V. Papel da P190 BCR-ABL como parâmetro de recaída na leucemia mielóide crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 4, 297-302 p. 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v30n4/v30n4a13.pdf>>. Acesso em: 02 abr. 2019.
- BARBOZA, L. P.; SOUZA, J. M.; SIMÕES, F. V.; BRAGANÇA, I. C.; ABDELHAY, E. Análise dos transcritos da translocação t(9;22) em Leucemia Mieloide Crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 2, 89-98 p. 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v22n2/13423.pdf>>. Acesso em: 18 dez. 2016.
- BEST, D.H.; DAMES, S.A.; SUMMER, K.L.; FARKAS, D.H. Molecular Pathology Methods. **Molecular Pathology in Clinical Practice**. 2016; 19-52 p. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19674-9_2.
- BIOTECH, Q. TAS 96. Temperature Acquisition Systems for Thermal Cycler Analysis. User Manual. 3. Ed. United Kingdom. 2006.

- BLOW, N. PCR's next wave. **Biotechniques**. 2017;62(4): 149-152 p. <https://doi.org/10.2144/000114531>.
- BODIN, A.; PRIEL, M.; FRAISSE, P. O.; COUTURE, C.; FALENTIN, C. Methods for testing the accuracy and thermal reliability of a pcr thermal cycler, and a means for implementing said methods. Patent Application Publication: Pub. No.: US 2012/0015365 A1, jan. 2012.
- BONACCORSO, N. S. Aplicação do exame de dna na elucidação de crimes. Dissertação de mestrado. São Paulo: Universidade de São Paulo. Departamento de Direito Penal, 2005. 156 p.
- BOMMER, D.; SCHLAUBITZ, T. Thermocycling device having a thermocycler module with a thermal switch, method of cooling a heating block in a thermocycler module of a thermocycling device and analytical apparatus. EP 2 123 360 A1. Patent Application Publication: Pub. No.: US 2010/0081191 A1, nov. 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 50 de 21 de fevereiro de 2002. 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual para Regularização de Equipamentos Médicos. 2009a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Rede nacional de câncer familiar: Manual operacional. Rio de Janeiro: Coordenação de Educação, Serviço de Edição e Informação Técnico-Científica, 2009b. 229 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em oncologia. Brasília: Coordenação-Geral de Documentação e Informação, Editora MS, 2014. 354 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde. Avanços, desafios e oportunidades no complexo industrial da saúde em serviços tecnológicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. 308 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Orientações integradas de vigilância e atenção à saúde no âmbito da emergência de saúde pública de importância nacional: procedimentos para o monitoramento das alterações no crescimento e desenvolvimento a partir da gestação até a primeira

infância, relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas dentro da capacidade operacional do SUS. Brasília: Coordenação-Geral de Documentação e Informação, Editora MS, 2017a. 158 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral C e coinfeções. Brasília: Coordenação-Geral de Documentação e Informação, Editora MS, 2011a. 144 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite B e coinfeções. Brasília: Coordenação-Geral de Documentação e Informação, Editora MS, 2016a. 131 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. Brasília: Coordenação-Geral de Documentação e Informação, Editora MS, 2013. 225 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Febre de Chikungunya: manejo clínico. Brasília: Coordenação-Geral de Documentação e Informação, Editora MS, 2015a. 28 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança. Brasília: Coordenação-Geral de Documentação e Informação, Editora MS, 2016b. 58 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Brasília: Coordenação-Geral de Documentação e Informação, Editora MS, 2011b. 284 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.531GM/MS de 26 de janeiro de 2017, publicada no DOU nº 20, de 27/01/2017b. Define a lista de produtos estratégicos para o Sistema Único de Saúde (SUS).

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1.219 SAS/MS de 4 de novembro de 2013, retificada no DOU nº 4, de 07/01/2015b. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Leucemia Mieloide Crônica do Adulto.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1 SCTE/MS de 4 de janeiro de 2017, publicada no DOU nº 4, de 05/01/2017c. Torna pública a decisão de incorporar o certolizumabe pegol para o tratamento da doença de Crohn moderada a grave, conforme Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Ministério da Saúde, no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 6 SCTE/MS de 31 de janeiro de 2017, publicada no DOU nº 23, de 01/02/2017d. Torna pública a decisão de não incorporar o bevacizumabe para o tratamento de câncer de colo de útero persistente, recorrente ou metastático no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 8 SCTE/MS de 1 de fevereiro de 2017, publicada no DOU nº 24, de 02/02/2017e. Torna pública a decisão de incorporar o citrato de tofacitinibe para o tratamento de pacientes adultos com artrite reumatoide ativa moderada a grave no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 29 SCTE/MS de 2 de agosto de 2017, publicada no DOU nº 148, de 03/08/2017f. Torna pública a decisão de incorporar o trastuzumabe para o tratamento do câncer de mama HER2-positivo metastático em primeira linha de tratamento, conforme Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Ministério da Saúde, no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informações Ambulatoriais do SUS (SIA/SUS). Sistema de Gerenciamento da Tabela de Procedimentos, Medicamentos e OPM do SUS (SIGTAB). 2017g. Disponível em: <<http://sigtap.datasus.gov.br/tabela-unificada/app/sec/inicio.jsp>>. Acesso em: 20 abr. 2017.

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. 2. Ed. Brasília: Embrapa, 2015. 453 p.

CAP. College of American Pathologists. **Molecular Pathology Checklist**. 2012. Disponível em: <<http://www.cap.org/apps/docs/education/OnlineCourseContent/2012/LAP/Resources/Checklists/MOL09252012.pdf>>. Acesso em: 08 mai. 2015.

- BRUNO, A. N. **Biotecnologia II: aplicações e tecnologias**. 1. Ed. Porto Alegre: Atrmed, 2017. 238 p.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Good laboratory practices for molecular genetic testing for heritable diseases and conditions**. Department of Health and Human Services, Public Health Service, CDC. 2009. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr5806.pdf>>. Acesso em: 08 mai. 2015.
- DEGEN, H. J.; DEUFEL, A.; EISEL, D.; GRUNEWALD-JANHO, S.; KEESEY, J. **PCR applications manual**. 3. Ed. Germany: Roche Mannheim, 2006. 339 p.
- ECRI. ECRI INSTITUTE. Healthcare product comparison system. Disponível em: <www.ecri.org>. Acesso em: 12 ago. 2013.
- ELLISON, S. L. R.; WILLIAMS, A. Eurachem/CITAC guide: Quantifying uncertainty in analytical measurement. 3. Ed., 2012 Disponível em: <www.eurachem.org/index.php/publications/guides/quam#translations>. Acesso em: 29 mai. 2015.
- EPA. United States Environmental Protection Agency. **Quality Assurance/Quality Control Guidance for Laboratories Performing PCR Analyses on Environmental Samples**. 2004. Disponível em: <<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/epa-qaqc-pcr.pdf>>. Acesso em: 12 mai. 2015.
- FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. 1. Ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. Ed. Brasília: Embrapa, 1998. 220 p.
- INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Avaliação de dados de medição. Guia para a Expressão de Incerteza de Medição GUM 2008. 1 Ed. Duque de Caxias, RJ: INMETRO/CICMA/SEPIN, 2012a. 141 p.
- INMETRO. Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2012). 3a ed. Duque de Caxias, RJ: INMETRO, 2012b. 94 p.

- INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J. **PCR Strategies**. 1. Ed. California: Academic Press, 1995. 373 p.
- ISHIKAWA, K. **Introduction to Quality Control**. 3. Ed. Tokio. 1989. 435 p.
- JCI. Joint Commission International. Joint commission international accreditation standards for clinical laboratories. 2010. Disponível em: <http://www.jointcommissioninternational.org/assets/1/14/jcil09_sample_pages.pdf>. Acesso em: 27 abr. 2015.
- KIM, Y. H.; YANG, S.B.; PARK, S.R. Performance evaluation of thermal cyclers for PCR in a rapid cycling condition. **BioTechniques**, v. 44, n. 4, p. 495-505, apr. 2008. Disponível em: <http://www.biotechniques.com/multimedia/archive/00003/BTN_A_000112705_O_3605a.pdf>. Acesso em: 08 ago. 2017.
- KENNEDY, S.; OSWALD, N. **PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide**. Wymondham: Caister Academic Press, 2011. 235 p.
- MCINERNEY, P.; ADAMS, P.; HAIDI, M.Z. Error rate comparison during polymerase chain reaction by DNA polymerase. Hindawi Publishing Corporation. **Molecular Biology International**. 2014. 8 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/287430>.
- MCPHERSON, M. J.; MØLLER., S. G. **PCR**. 2. Ed. New York: Taylor & Francis Group, 2006. 290 p.
- MSAC. Medical Service Advisory Committee. Polymerase chain reaction in the diagnosis and monitoring of chronic myeloid leukaemia: Assessment report. MSAC reference 9a (i). 2004. Disponível em: <<http://www.msac.gov.au/internet/msac/publishing.nsf/Content/ref09a-2>> Acesso em: 26 ago. 2015.
- NHS. National Health Service. UK Standards for Microbiology Investigations: Good Laboratory Practice when performing molecular Amplification assays. 2013. Disponível em: <https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/344076/Q_4i4.4.pdf>. Acesso em: 08 mai. 2015.

- NIH. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Good Clinical Laboratory Practice Standards. 2013. Disponível em: <<https://www.niaid.nih.gov/sites/default/files/gclp.pdf>>. Acesso em: 07 mai. 2015.
- NOLAN, T.; BUSTIN, S. A. **PCR Technology: Current Innovations**. 3 Ed. CRC press. 2013. 436 p.
- OLIVEIRA, A. E. P.C. **Controlo e Garantia de Qualidade da Técnica de PCR**. Tese de Mestrado. Universidade do Porto. Faculdade de Farmácia. Porto, 2008.
- OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD Guidelines for Quality Assurance in Molecular Genetic Testing. 2007. Disponível em: <<https://www.oecd.org/sti/biotech/38839788.pdf>>. Acesso em: 08 mai. 2015.
- PINTO, A.J.; RASKIN, L. PCR Biases Distort Bacterial and Archaeal Community in Pyrosequencing Datasets. **PLoS ONE**. 2012;7(8). 14 p. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043093>.
- POTAPOV, V.; ONG, J.L. Examining sources of error in PCR by single-molecule sequencing. **PLoS ONE**. 2017;12(1). 19 p. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169774>.
- RCPATH. The Royal College of Pathologists. Code of Practice for Genetics Laboratories. 2006. Acesso em: 08 mai. 2015.
- REIS, A. L. O.; VASCONCELOS, J. S.; SILVA, L. C. A; AREDES, L. H. S.; NANTES, M. C.; GUEDES, R. A.; JÚNIOR, A. J. B.; SANTOS, J. L.; PARO, M. O. Expression of the bcr-abl hybrid gene resulting from the translocation between chromosomes 9 and 22 in the occurrence of chronic myeloid leukemia. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 26, n. 1, 35-41 p., mar. 2019. Disponível em: <https://www.mastereditora.com.br/periodico/20190306_115032.pdf> Acesso em: 02 abr. 2019.
- SANTOS, E. A.; STERNBERG, C.; ALMEIDA, R. T. Influência da temperatura ambiente na análise do termociclador. **XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica CBEB 2014**; out. 13-17 2014. Centro de Convenção de Uberlândia, MG; 2014.

- SAUNDERS, G. C.; DUKES, J.; PARKES, H. C.; CORNETT, J. H. Interlaboratory Study on Thermal Cycler Performance in Controlled PCR and Random Amplified Polymorphic DNA Analyses. **Clinical Chemistry**, v. 47, n. 1, 47-55 p., jan. 2001. Disponível em: <<http://clinchem.aaccjnl.org/content/clinchem/47/1/47.full.pdf>> Acesso em: 08 ago. 2017.
- SBI. Sociedade Brasileira de Infectologia. Guia de manejo Zica. Disponível em: <http://www.sierj.org.br/artigos/guia_manejo_zika_sbi.pdf>. Acesso em: 09 ago. 2017.
- SBPC. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica. Lista de Orientação em Diagnóstico Molecular - Segunda versão - 2018. Disponível em: <<http://www.sbpc.org.br/wp-content/uploads/2018/09/ListaDeOrientacaoEmDiagnosticoMolecular2018.pdf>>. Acesso em: 02 abr. 2019.
- SCHODER, D.; SCHMALWIESER, A.; SCHAUBERGER, G.; HOORFAR, J.; KUHN, M.; WAGNER, M. Novel approach for assessing performance of PCR cyclers used for diagnostic testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, 2724-2728 p, jun. 2005. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/43/6/2724.full.pdf+html>>. Acesso em: 08 ago. 2017.
- SCHODER, D.; SCHMALWIESER, A.; SCHAUBERGER, G.; KUHN, M.; HOORFAR, J.; WAGNER, M. Physical Characteristics of Six New Thermocyclers. **Clinical Chemistry**, v. 49, n. 6, 960-963 p., jun. 2003. Disponível em: <<http://clinchem.aaccjnl.org/content/clinchem/49/6/960.full.pdf>>. Acesso em: 08 ago. 2017.
- SOUZA, P.A. **Desenvolvimento e aplicação de método para avaliação da qualidade de termocicladores**. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. Florianópolis, 2017.
- SPAN, M.; VERBLAKT, M.; HENDRIKX, T. **Measurement uncertainty in calibration and compliancy testing of PCR and qPCR thermal cyclers**. 18th International Congress of Metrology; September 19-21, 2017. Paris, France; 2017. <https://doi.org/10.1051/metrology/201705003>.

- TEIXEIRA, P.; VALLE, S. **Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar**. 2. Ed. São Paulo: Editora Fiocruz, 2010. 442 p.
- VIERSTRAETE, A. Homepage of Andy Vierstraete. University of Gent. Department of Biology. Belgium. 2012. Disponível em: <<https://users.ugent.be/~avierstr/tif.html>>. Acesso em: 08 ago. 2017.
- WEISSEINSTEINER, T; GRIFFIN, H.G; GRIFFIN, A; **Pcr technology: current innovations**. 2. Ed. Florida: CRC Press. 2004. 392 p.
- WATSON, J. D., BAKER, T. A., BELL, S. P., GANN, A., LEVINE, M., & LOSICKE, R. **Biologia molecular do gene**. 7. Ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2015. 846p.
- WHO. World Health Organization. Handbook: good laboratory practice (GLP): quality practices for regulated non-clinical research and development. 2 Ed. 2009. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/documents/glp-handbook.pdf>>. Acesso em: 29 mai. 2015.
- WILLIAMS, J. G.K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n. 22, 6531-6535 p., nov. 1990.
- WOODS, M. C. Anisotropic heat spreader for use with a thermoelectric device. Patent Application Publication: Pub. No.: EP 08009215.8, abr. 2010.

APÊNDICE A: Trabalho Publicado

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA AMBIENTE NA ANÁLISE DO TERMOCICLADOR

E. A. Santos*, C. Sternberg*, R. T. Almeida**

*Instituto Nacional de Câncer José Gomes Alencar da Silva, Rio de Janeiro, Brasil

**PEB/COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

e-mail: easantos@inca.gov.br

Resumo: Este trabalho objetiva avaliar a influência das condições ambientais de temperatura no processo de análise de termocicladores, visando aprimorar o método de verificação desses equipamentos nos laboratórios do Instituto Nacional de Câncer José Gomes Alencar da Silva. Foram realizadas adaptações nos sensores do equipamento de análise da temperatura, de modo a reproduzir às condições sob as quais o termociclador é usado. Foram realizados 3 tipos de experimentos: com tampa aberta, parcialmente fechada e fechada. Os experimentos foram feitos em 37 termocicladores programados com protocolo de variação nas temperaturas de 55°C, 72°C e 95°C. As estimativas de intervalos de confiança das médias das medidas obtidas nos experimentos foram comparadas aos valores de temperatura preconizados pelos fabricantes. Os resultados apontam o melhor desempenho dos experimentos com tampa fechada, no qual ocorreu menor influência da temperatura ambiente. Assim ficou claro a necessidade de efetuar adaptações no atual processo de análise dos termocicladores de forma a obter a correta operação desses equipamentos.

Palavras-chave: Avaliação de Tecnologias em Saúde, Engenharia Clínica, Técnicas de Diagnóstico Molecular.

Abstract: *This work aims to evaluate the influence of room temperature on the monitoring process of the operating temperatures of thermocyclers in the José Alencar Gomes da Silva National Cancer Institute. Adaptations were made in the temperature sensors of the thermocycler analysis equipment in order to reduce the influence of room temperature. Three experiments were carried out with the equipment lid open, partially closed and closed. A sample of 37 thermocyclers were analysed at the following temperatures: 55°C, 72°C and 95°C. The 95% confidence intervals of the precision temperature means and uniformity means were compared with the manufacturer's standard values for each experiment. The findings indicated that the closed lid experiments performed better than the others, since they presented the least influence of room temperature. Thus it became clear that adjustments need to be made in the current monitoring process of the thermocyclers to obtain their correct operating temperature.*

Keywords: *Healthcare Technology Assessment, Clinical Engineering, Molecular Diagnostic Techniques.*

Introdução

Um termociclador é equipamento concebido para prover protocolos de variação de temperatura em bloco térmico capaz de receber tubos com material genético preparado para ser submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) e operacionalizar a amplificação de fragmentos de DNA. Este procedimento é responsável por impulsionar pesquisas biológicas em diversas áreas, tais como: agricultura e medicina humana, veterinária e forense. Na área da saúde está presente em testes diagnósticos para identificação de doenças, por exemplo: HIV/AIDS, Tuberculose, Leishmaniose, Hepatite e Leucemia; e em prognósticos moleculares nas síndromes de predisposição hereditária ao câncer, e ainda na pesquisa clínica de novos medicamentos e controle da terapêutica oncológica. O termociclador é reconhecido e destacado como tecnologia estável e amplamente utilizada, quando comparada a outras tecnologias de diagnóstico molecular [1].

O processo da PCR é considerado uma técnica bem estabelecida se executado de forma criteriosa. A literatura relata vários fatores que podem fazer com que o produto PCR resulte falso ou falho [2] e [3]. Muitos desses fatores estão relacionados com as condições dos elementos incluídos na reação PCR, os quais são submetidos à repetição de ciclos de temperatura no equipamento termociclador, em temperaturas que variam nos valores aproximados de 95°C, 55°C e 72°C, para que sejam obtidas as fases de desnaturação, anelamento e extensão do DNA. São elementos da reação PCR: a) fragmento de DNA amostra para a amplificação; b) conjunto de bases nitrogenadas, os nucleotídeos; c) primers iniciadores do processo; d) e a enzima termoestável, Taq Polimerase, catalisadora da reação. No entanto, nem sempre considerado, o desempenho do termociclador é fundamental na obtenção de resultado válido no processo da PCR, devido a este fornecer a correta temperatura para cada uma das etapas, sob o risco de introduzir razão para falha ou falso resultado da PCR, as quais ocorrem especialmente devido a problemas nas fases de desnaturação e anelamento. Alguns trabalhos sobre avaliação de desempenho do termociclador relataram a possibilidade de uso inapropriado deste equipamento, especialmente quando usado em aplicações com protocolos PCR de ciclos rápidos [4] e [5].

No contexto da implantação de Núcleo de Engenharia Clínica voltado à gestão de equipamentos

medico-hospitalares dedicados às áreas de Transplante de Medula Óssea e Pesquisa do INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva) foi identificada a carência de rotina para a avaliação do uso seguro do termociclador. Desta forma, foi adquirido um equipamento de teste para verificar as condições de funcionamento dos termocicladores. Contudo ao executar o protocolo de verificação da temperatura recomendado pelo fabricante, observou-se que a placa que suporta os sensores de teste não permitia o fechamento da tampa do termociclador. Considerando que em condições normais de funcionamento o equipamento é mantido com a tampa fechada, surgiu o questionamento quanto à possibilidade de a temperatura ambiente prejudicar no processo de verificação das temperaturas nas condições operacionais dos termocicladores. No intuito de identificar o melhor processo de análise das temperaturas do termociclador, usando o equipamento de teste, foram realizados três experimentos. Foi comparada a análise de tampa aberta, com as alternativas de tampa fechada parcialmente e totalmente fechada. Assim, este trabalho tem por objetivo avaliar a interferência da temperatura ambiente no processo de verificação da exatidão e uniformidade (linearidade) das temperaturas do termociclador. Os resultados poderão apoiar o desenvolvimento de um protocolo para o monitoramento de termocicladores.

Materiais e métodos

Foi usado para a aquisição dinâmica de dados o equipamento de teste comercial, analisador de termociclador, marca Hain Lifescience, modelo TAS e respectivo software TAS2.exe V2.8.0, com resolução de 0,0076°C e exatidão de +/- 0,1°C. Os sensores de temperatura, do analisador TAS, tipo PT100, usados nos experimentos, foram calibrados e certificados no laboratório do fabricante, com tempo de resposta < 200ms, erros de 0,1°C a 0,4°C; assim como o sensor de referência de calibração com erro de +/- 0,01°C. As calibrações foram realizadas de acordo com a ISO/IEC 17025 e padrões de referência primária do National Institute of Standards and Technology.

Para a avaliação das condições de funcionamento foram obtidas amostras de 37 termocicladores, de blocos térmicos de 96 poços e diferentes intensidades de uso, tais como os modelos: Veriti e System 9700, marca Applied Biosystems; My Cycler, marca Biorad; Master Cycler marca Eppendorf e PT100 marca MJResearch.

O primeiro experimento, Tampa Aberta (TA), foi realizado atendendo a recomendação do fabricante do analisador TAS, com os sensores de temperaturas posicionados no bloco térmico do termociclador, e conectados diretamente à placa do analisador TAS. O experimento TA utilizou 48 sensores, distribuídos no bloco térmico do termociclador, conforme esquema na Figura 1. A montagem da placa para a realização do experimento é ilustrada na Figura 2.

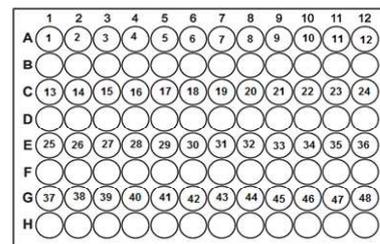


Figura 1: Esquema das posições dos 48 sensores.



Figura 2: Experimento TA com os 48 sensores.

O segundo experimento, Tampa Fechada Parcialmente (TFP), foi realizado com os sensores posicionados nos poços do bloco do termociclador, e ligados à placa do analisador TAS por cabo extensor. Isto permitiu o fechamento parcial da tampa do termociclador, pois, a altura destes sensores não permitiu o fechamento total da tampa do termociclador. Os sensores usados neste experimento foram fornecidos pelo fabricante do equipamento analisador TAS. Foram utilizados 15 sensores distribuídos no bloco térmico do termociclador, nas posições: A1, A4, A7, A10, A12, D1, D7, D12, E4, E10, H1, H4, H7, H10 e H12.

O terceiro experimento, Tampa Totalmente Fechada (TTF), foi realizado com os sensores com os cabos extensores, adaptados no laboratório do Núcleo de Engenharia Clínica do INCA. A adaptação consistiu na redução da altura do sensor, de forma a permitir o fechamento total da tampa do termociclador. Foram utilizados três sensores distribuídos no bloco térmico do termociclador, nas posições: A1, D7 e E10.

Todos os sensores usados nas medições foram posicionados nos poços dos blocos térmicos dos termocicladores e conectados à placa do equipamento de teste TAS, que se liga ao seu módulo e a seguir a um microcomputador. As montagens TFP e TTF usaram sensores com cabos extensores de 0,75m de comprimento para a conexão dos sensores à placa.

A Figura 3 ilustra exemplo dos sensores conectados ao bloco térmico de termociclador em conexão por cabo à placa, nas montagens dos experimentos TTF (1-cabo vermelho) e TFP (2-cabo cinza), e conexão dos sensores diretos à placa do equipamento TAS, montagem do experimento TA (3-placa). Notar a altura dos sensores nas montagens TFP e TA que se apresentam superiores a altura da montagem TTF.

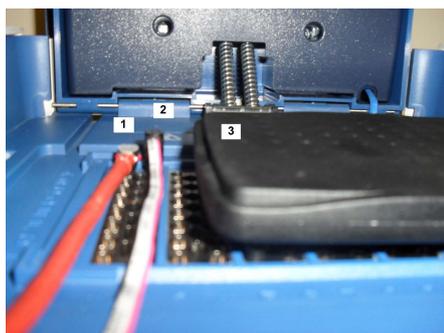


Figura 3: Exemplo de conexão de sensores ao bloco térmico do termociclador, nos três experimentos: sensor experimento TTF (1), sensor experimento TFP (2) e placa com sensores do experimento TA (3).

A Figura 4 ilustra sensores na montagem TTF posicionados ao bloco térmico com a tampa do termociclador fechada e ligados por cabos à placa.



Figura 4: Experimento TTF com os 3 sensores.

Os experimentos foram realizados com a temperatura ambiente aproximada de 22°C. Foi programado o mesmo protocolo de variação de temperatura nos 37 termocicladores, em todos os experimentos, conforme recomendado pelo fabricante do analisador TAS, obedecendo a seguinte sequência: 1min 95°C; 2min 4°C; 1min 95°C; 1min 30°C; 1min 95°C; 1min 55°C; 1min 72°C; 30s 95°C; 30s 72°C; 2min 4°C. As amostras de temperatura foram obtidas pelo equipamento TAS. Em cada experimento, foram adquiridos dados de temperaturas de todos os sensores usados em cada um dos 37 termocicladores. O analisador TAS calculou a média dos valores obtidos de exatidão e uniformidade (linearidade entre poços) nas temperaturas 55°C, 72°C e 95°C, em cada termociclador. Cada experimento gerou 37 valores médios de exatidão para as três temperaturas, totalizando 111 valores; de modo similar foi gerado o total de 111 valores médios de uniformidade por experimento.

A análise dos dados foi feita no software IBM SPSS Statistics, v.22. Foram estimados os valores de p para o Teste t de Student para uma amostra, com nível de significância de 0,05, e os intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para as médias dos valores de exatidão e uniformidade dos 37 equipamentos nas três temperaturas, por experimento. As estimativas de

IC95% foram analisadas com relação aos valores de referência preconizados pelos fabricantes de termocicladores com tolerância de +/- 0,25°C para a exatidão e variação máxima de 0,5°C para a uniformidade.

Resultados

A Tabela 1 mostra as estimativas de média, desvio padrão, intervalo de confiança de 95% para os valores de exatidão da temperatura nos três experimentos (TA, TFP e TTF) nas três temperaturas (55°C, 72°C e 95°C), juntamente com os valores p do teste da média da amostra (N=37) e o valor padrão dado pelo fabricante. Esses valores indicam que há diferença significativa em todos os experimentos, exceto o TTF à 95°C. Isto indica que na condição TTF à 95°C, o experimento foi realizado em conformidade com o padrão do fabricante.

Tabela 1: Temperatura Padrão (TP), Média, Desvio Padrão (DP), Intervalo de Confiança (IC95%) e Valor p para a exatidão nos três experimentos (TA, TFP e TTF).

	TP	Média	DP	IC 95%	Valor p
TA	55°C	54,69	0,40	54,56 a 54,83	0,000
TFP	55°C	55,56	0,55	55,38 a 55,75	0,000
TTF	55°C	55,73	0,72	55,49 a 55,97	0,000
TA	72°C	70,25	0,56	70,22 a 70,28	0,000
TFP	72°C	71,79	0,49	71,62 a 71,95	0,015
TTF	72°C	72,31	0,55	72,13 a 72,50	0,001
TA	95°C	92,47	0,74	92,23 a 92,72	0,000
TFP	95°C	94,37	0,53	94,19 a 94,55	0,000
TTF	95°C	95,00	0,63	94,79 a 95,21	0,934

A Tabela 2 reproduz os mesmos valores da Tabela 1 para a uniformidade. Diferenças significativas foram obtidas, exceto para os experimentos TTF.

Tabela 2: Temperatura Padrão (TP), Média, Desvio Padrão (DP), Intervalo de Confiança (IC95%) e Valor p para a uniformidade nos três experimentos.

	TP	Média	DP	IC 95%	Valor p
TA	55°C	1,48	0,60	1,28 a 1,68	0,000
TFP	55°C	1,53	0,63	1,32 a 1,74	0,000
TTF	55°C	0,54	0,36	0,42 a 0,66	0,425
TA	72°C	3,77	1,10	3,40 a 4,14	0,000
TFP	72°C	1,28	0,54	1,10 a 1,46	0,000
TTF	72°C	0,48	0,36	0,36 a 0,60	0,759
TA	95°C	5,60	1,30	5,16 a 6,03	0,000
TFP	95°C	1,85	0,92	1,54 a 2,16	0,000
TTF	95°C	0,74	0,87	0,45 a 1,04	0,092

Para a uniformidade, os experimentos TTF apresentaram resultados em conformidade com o indicado pelo fabricante nas três temperaturas.

A Figura 5 apresenta o diagrama de caixa para as medidas de uniformidade obtidas para os

três experimentos nas três temperaturas. Ilustra que às adaptações realizadas nos sensores usados no experimento TTF, além de apresentarem valores mais próximos ao padrão do fabricante quando comparados aos outros experimentos, permitem melhor visualização de equipamentos com valores discrepantes de uniformidade (Figura 4 – TTF), não identificados nos experimentos TA e TFP, por exemplo, equipamentos: 20, 11, 34 e 10.

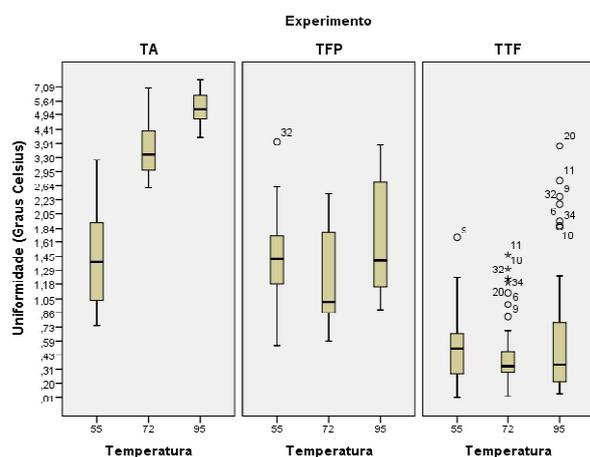


Figura 5: Diagrama de caixa das medidas de uniformidade para os três experimentos por temperatura.

Discussão

A Política Nacional de Gestão de Tecnologias em Saúde [6] ressalta que o monitoramento de tecnologias após sua incorporação é fundamental para garantir a efetividade esperada da tecnologia. No caso dos termocicladores é essencial garantir que os equipamentos estejam sendo operados em boas condições de uso. Desta forma, é necessário que se tenha meios adequados de verificar o seu bom funcionamento.

Os resultados mostram que foi possível melhorar as condições de teste dos termocicladores com a adaptação sugerida (TTF), em especial para a temperatura de 95°C. Para as demais temperaturas, ainda existe a necessidade de mais estudos e ajustes, buscando identificar outros fatores que possam estar influenciando no processo de verificação das temperaturas. Cabe investigar se existem condições internas ao conjunto térmico do termociclador que impliquem em alteração nas temperaturas próximas a 55°C, e se tais condições causariam impacto no desempenho da PCR.

Este trabalho não tem por finalidade abordar a questão da calibração do termociclador, mas efetuar a verificação das temperaturas dos termocicladores em comparação a um padrão de controle - o equipamento TAS, realizando a análise estatística dos experimentos.

Neste sentido os resultados do estudo demonstraram que é recomendável verificar a temperatura dos termocicladores com a tampa totalmente fechada, sem

influência do ambiente. Os sensores modificados para as análises de temperatura com TTF foram capazes de medir a temperatura com exatidão aceitável. Em síntese, a condição TTF demonstrou resultados melhores do que os obtidos nas condições TA e TFP; e com capacidade para reconhecer equipamentos com necessidades de correção.

Ficou claro que as análises de temperaturas na condição TA, obtiveram temperaturas discrepantes em relação ao padrão dos fabricantes, nas medições de uniformidade (linearidade) de temperatura entre poços de um termociclador. Este resultado mostra que com a análise de temperaturas com a tampa aberta é inviável realizar os diagnósticos sobre as condições seguras de funcionamento dos termocicladores.

Porém, este estudo tem como limitação utilizar apenas três sensores no experimento TTF, restringindo a coleta de dados nos blocos térmicos. Isto também pode ter reduzido a variação observada entre as medições quando comparado aos demais experimentos. Uma perspectiva de melhoria é realizar novos experimentos usando 15 sensores.

Apesar das limitações apontadas, as adaptações realizadas parecem promissoras e permitem melhor identificação dos equipamentos com necessidade de ajustes. Estes resultados indicam a importância em aperfeiçoar o monitoramento das condições de uso dos termocicladores, de forma a garantir que os exames sejam realizados de forma adequada, sem prejuízo ao paciente e ao sistema de saúde.

Agradecimentos

Agradecimentos ao INCA, em especial ao apoio da Dra. Eliana Abdelhay e do Dr. Miguel Moreira e a colaboração de Joyce Luana, Carlos Fontoura, Paulo Wesley e Vinícius Apolinaro.

Referências

- [1] ECRI Institute. Healthcare Product Comparison System. 2013 Ago. Available from: www.ecri.org.
- [2] Mcpherson, M. J.; Møller., S. G. PCR. New York.: Taylor & Francis Group. 2006.
- [3] Altshuler., M. L. PCR Troubleshooting: The essential guide.: Caister Academic Press. 2006.
- [4] Schoder, D. et al. Physical characteristics of six thermalcycler. Clinical Chemistry. 49: 960-963p. 2003.
- [5] Kim, Y. H.; Yang, I.; Performance evaluation of thermal cyclers for PCR in a rapid cycling condition. BioTechniques. 44: 495-505p. 2008.
- [6] Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Política Nacional de Gestão de Tecnologias em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

APÊNDICE B: Estimativas de Incerteza de Medição Expandida

As estimativas de Incerteza de Medição Expandida para os 18 sensores usados no ensaio de três medidas repetidas são apresentadas nas Tabelas de 1 a 3, para a temperatura de 55° C (Tabela 1), para a temperatura de 72° C (Tabela 2) e para a temperatura de 95° C (Tabela 3); considerando a Equação:

$$u_c(y) = \sqrt{u(A)^2 + u(B_1)^2 + u(B_2)^2}$$

onde:

u_c : incerteza combinada

$u(A)$: incerteza devido a repetição de medidas

$u(B_1)$: incerteza devido a certificado de calibração

$u(B_2)$: incerteza devido a resolução do instrumento de medição

As incertezas expandidas de medições declaradas no certificado de calibração, emitido por laboratório da Rede Brasileira de Calibração, para $k = 2$, foram: 0,10° C para 55° C; 0,10° C para 72° C; e 0,22° C para 95° C. O valor usado para a incerteza devido à resolução do instrumento de medição foi $B_2 = 0,01° C$. O número de medidas foi três, $n = 3$. O fator de abrangência foi determinado para o nível de confiança de 95,45%, $k = 2$.

Tabela 1. Estimativa da Incerteza de Medição Expandida para a Temperatura de 55° C.

Posição	Sensor	Média (° C) $n = 3$	Desvio Padrão (° C)	A (° C)	B_1 (° C)	Incerteza Expandida (° C) $K = 2$
A1	1	55,50	0,04	0,02	0,05	0,11
A4	2	55,28	0,05	0,03	0,05	0,11
A7	3	54,99	0,04	0,02	0,05	0,11
A10	4	55,47	0,02	0,01	0,05	0,10
A12	5	55,23	0,02	0,01	0,05	0,10
D1	6	55,50	0,04	0,02	0,05	0,11
D7	7	55,79	0,04	0,02	0,05	0,11
D12	8	55,12	0,04	0,03	0,05	0,11
E4	9	55,58	0,07	0,04	0,05	0,13
E6	10	55,31	0,03	0,02	0,05	0,11
E10	11	55,40	0,06	0,03	0,05	0,12
H1	12	54,56	0,02	0,01	0,05	0,10
H4	13	54,69	0,02	0,01	0,05	0,10
H7	14	55,50	0,02	0,01	0,05	0,10
H10	15	54,56	0,02	0,01	0,05	0,10
H12	16	54,49	0,02	0,01	0,05	0,10
C5	17	54,89	0,01	0,01	0,05	0,10
G5	18	55,02	0,02	0,01	0,05	0,10

Tabela 2. Cálculo da Incerteza de Medição Expandida para a Temperatura de 72° C.

Posição	Sensor	Média (° C) <i>n</i> = 3	Desvio Padrão (° C)	<i>A</i> (° C)	<i>B</i> ₁ (° C)	Incerteza Expandida (° C) <i>k</i> = 2
A1	1	72,33	0,01	0,01	0,05	0,10
A4	2	72,84	0,07	0,04	0,05	0,13
A7	3	71,32	0,03	0,02	0,05	0,11
A10	4	72,07	0,04	0,02	0,05	0,11
A12	5	72,50	0,07	0,04	0,05	0,13
D1	6	72,06	0,01	0,00	0,05	0,10
D7	7	72,48	0,04	0,03	0,05	0,11
D12	8	72,41	0,02	0,01	0,05	0,10
E4	9	71,84	0,04	0,02	0,05	0,11
E6	10	72,96	0,03	0,02	0,05	0,11
E10	11	72,35	0,06	0,04	0,05	0,12
H1	12	71,18	0,01	0,01	0,05	0,10
H4	13	71,66	0,01	0,00	0,05	0,10
H7	14	71,44	0,03	0,02	0,05	0,11
H10	15	72,33	0,02	0,01	0,05	0,10
H12	16	71,71	0,02	0,01	0,05	0,10
C5	17	72,03	0,02	0,01	0,05	0,10
G5	18	71,88	0,01	0,00	0,05	0,10

Tabela 3. Cálculo da Incerteza de Medição Expandida para a Temperatura de 95° C.

Posição	Sensor	Média (° C) <i>n</i> = 3	Desvio Padrão (° C)	<i>A</i> (° C)	<i>B</i> ₁ (° C)	Incerteza Expandida (° C) <i>k</i> = 2
A1	1	94,32	0,16	0,09	0,11	0,29
A4	2	95,58	0,07	0,04	0,11	0,23
A7	3	95,60	0,16	0,09	0,11	0,29
A10	4	94,07	0,13	0,08	0,11	0,27
A12	5	94,27	0,05	0,03	0,11	0,23
D1	6	95,44	0,03	0,02	0,11	0,22
D7	7	94,46	0,05	0,03	0,11	0,23
D12	8	95,01	0,05	0,03	0,11	0,23
E4	9	94,80	0,08	0,05	0,11	0,24
E6	10	95,14	0,03	0,02	0,11	0,22
E10	11	94,37	0,06	0,03	0,11	0,23
H1	12	92,98	0,06	0,04	0,11	0,23
H4	13	94,40	0,09	0,05	0,11	0,24
H7	14	94,40	0,03	0,02	0,11	0,22
H10	15	94,21	0,03	0,02	0,11	0,22
H12	16	94,93	0,13	0,08	0,11	0,27
C5	17	94,37	0,07	0,04	0,11	0,23
G5	18	94,00	0,04	0,02	0,11	0,22

APÊNDICE C: Conceitos Básicos para Avaliar a Incerteza de Medição

Serão abordados os conceitos para a avaliação e a expressão da incerteza em medição que foram utilizados nas medições de temperatura do termociclador, fundamentados no *Guia para a Expressão de Incerteza de Medição – GUM* (INMETRO, 2012a). O GUM é uma tradução do INMETRO autorizada pelo Birô Internacional de Pesos e Medidas (BIPM) da sua publicação “Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement”, conhecida como GUM 2008. Este guia representa um consenso internacional usado para nortear trabalhos relacionados à medição de parâmetros. É adotado na maioria dos países e traduzido em quase todas as línguas modernas (INMETRO, 2012a).

As regras estabelecidas no GUM (INMETRO, 2012a) foram preparadas por um grupo de trabalho conjunto formado por especialistas com o suporte das seguintes organizações: Birô Internacional de Pesos e Medidas (BIPM), Comissão Eletrotécnica Internacional (IEC), Organização Internacional de Normalização (ISO), Organização Internacional de Metrologia Legal (OIML), Federação Internacional de Química Clínica (IFCC), União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), e União Internacional de Física Pura e Aplicada (IUPAP).

Avaliar e expressar a incerteza de medição consiste em quantificar a qualidade de um resultado de medição de uma grandeza física. O GUM (INMETRO, 2012a) fornece regras gerais para avaliar e expressar a incerteza de medição, e a define como “*o parâmetro, associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mensurando*”. O Vocabulário Internacional de Metrologia - VIM (INMETRO, 2012b) define a incerteza de medição como “*o parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas*”.

O parâmetro que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos ao mensurando pode ser entendido em função de um desvio padrão ou de um intervalo de confiança. Os componentes da incerteza de medição podem ser estimados com base na distribuição estatística dos resultados das séries de medições, denominados *Avaliação Tipo A da Incerteza Padrão*; ou estimados por meio de distribuição de probabilidades assumidas para diferentes casos, como por exemplo, um certificado de calibração ou uma recomendação de um manual, denominados *Avaliação Tipo B da Incerteza Padrão*. Ambos os tipos de avaliação da incerteza de medição são baseados em distribuições de probabilidade e os componentes de incerteza resultantes de cada tipo são quantificados por variâncias ou desvios-padrão (INMETRO, 2012a).

Segundo o GUM (INMETRO, 2012a) “*A incerteza do resultado de uma medição reflete a falta de conhecimento exato do valor do mensurando*”. Assim, mesmo com uma incerteza grande, o resultado de uma medição poderá estar muito próximo do valor do mensurando. Determinar o valor do mensurando, ou o valor de uma grandeza física a ser medida, é o objetivo de uma medição. O resultado de uma medição deve ser representado pela estimativa do valor do mensurando e acompanhado pela declaração da incerteza dessa estimativa.

Identificação das fontes de incertezas de medição

A identificação das fontes de incerteza é etapa fundamental para a expressão das incertezas de medição. O GUM (INMETRO, 2012a) recomenda identificar as possíveis fontes de incerteza de medição para que sejam avaliadas, após conhecidas às informações sobre o grau de contribuição da incerteza no processo de medição.

O Diagrama de Causa e Efeito (DCE), proposto por ISHIKAWA (1989), tem sido recomendado pelo Guia Eurachem (ELLISON *et al.*, 2012) para identificar as fontes de incertezas de medição. O DCE constitui ferramenta do Sistema da Qualidade muito usada na área industrial para determinar a relação de causa e efeito de um processo. Tem por objetivo organizar nos ramos de um diagrama, as causas que conduzem a determinado efeito, ou neste caso, organizar os fatores que contribuem para as incertezas de determinada medição.

Estimativa de incertezas de medição

Para realizar a estimativa de incertezas de medição é necessário avaliar a natureza das contribuições das incertezas, de modo a obter as incertezas padrão, e, a seguir, a incerteza combinada.

A *Incerteza Padrão* consiste no desvio padrão estimado associado a cada estimativa de entrada, ou a cada estimativa de fonte de incerteza. Poderá ser categorizada em *Avaliação Tipo A da Incerteza Padrão*, quando a incerteza for caracterizada pela experimentação, por meio de medições diretas ou indiretas das grandezas físicas. Será categorizada em *Avaliação Tipo B da Incerteza Padrão*, quando for avaliada pelo conhecimento de informações sobre a medição, expressas em manuais técnicos de fabricantes, livros, normas, artigos de congresso, relatórios e regulamentos técnicos, dentre outras fontes (INMETRO, 2012a).

A combinação de incertezas padrão irá determinar a *Incerteza Padrão Combinada*. Após será necessário determinar a *Incerteza Expandida*, que representa o

intervalo sobre o qual estará contido o valor da medição, com dado nível de confiança. Esta seção apresentará os passos do procedimento para a avaliação e a expressão da incerteza de medição definidos no GUM, complementados com alguns procedimentos descritos pelo Guia Eurachem (ELLISON *et al.*, 2012). Os passos do procedimento para a avaliação e a expressão da incerteza de medição, considerando grandezas de entrada não correlacionadas, são apresentados a seguir:

a) Determinação do mensurando

O mensurando Y pode ser determinado em função de N grandezas de entrada X_1, X_2, \dots, X_N , como na equação (1):

$$Y = f(X_1, X_2, \dots, X_N) \quad (1)$$

onde: X_1, X_2, \dots, X_N são grandezas de entrada com uma incerteza associada.

b) Identificação e determinação das contribuições das fontes de incertezas de medição

Aplicação do Diagrama de Causa e Efeito

c) Avaliação da Incerteza Padrão das estimativas de entrada

Avaliação Tipo A da Incerteza Padrão.

As estimativas das contribuições das fontes de incertezas obtidas por meio de observações repetidas independentes são associadas às distribuições de frequência, e aproximadas a uma distribuição de probabilidade. Para estes casos os componentes da incerteza são referidos como incerteza padrão Tipo A, e expressos pelos desvios padrão da média, representados na equação (2).

$$u(X_i) = u(\bar{X}_i) = \frac{S(X_i)}{\sqrt{n}} \quad (2)$$

onde $S(X_i)$ é o desvio padrão das observações repetidas de entrada e n o número de repetições.

Avaliação Tipo B da Incerteza Padrão.

As contribuições das fontes de incertezas não obtidas por meio de observações repetidas são associadas a distribuições *a priori*, em geral são aproximadas às distribuições retangulares, triangulares ou normais, a depender da possibilidade de variabilidade destas fontes de incertezas, declaradas nas informações disponíveis, tais

como: dados de medidas prévias, conhecimento do comportamento e das propriedades de instrumento e materiais relevantes, especificações dos fabricantes, dados fornecidos em certificados de calibração e outros certificados, incertezas atribuídas a dados de referência extraídos de manuais. Para estes casos os componentes da incerteza são referidos como incerteza padrão Tipo B, e expressos pelos desvios padrão representados nas equações (3) a (5).

$$u(X_i) = \frac{a}{\sqrt{3}} \quad (3)$$

onde: $u(X_i)$ é a estimativa de incerteza para distribuições retangulares com intervalos de “ $\pm a$ ”.

$$u(X_i) = \frac{a}{\sqrt{6}} \quad (4)$$

onde: $u(X_i)$ é a estimativa de incerteza para distribuições triangulares com intervalos de “ $\pm a$ ”.

$$u(X_i) = \frac{U(\text{declarado no certificado})}{k} \quad (5)$$

onde: $u(X_i)$ é a estimativa de incerteza para distribuições t-Student com incerteza herdada da calibração de equipamentos, com o valor de U (incerteza expandida) e k (fator de abrangência) declarados no certificado de calibração.

d) Determinação da Incerteza Padrão Combinada

A expressão geral para a Incerteza Padrão Combinada é dada pela equação (6).

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1,N} c_i^2 u(x_i)^2} \quad (6)$$

onde: c_i é o coeficiente de sensibilidade.

O coeficiente de sensibilidade é descrito na equação (7) e descreve como o valor de y varia com a mudança nas grandezas de entrada (ELLISON *et al.*, 2012).

$$c_i = \frac{\partial y}{\partial x_i} \quad (7)$$

Admite-se que quando uma contribuição de incerteza está associada ao procedimento como um todo, é em geral expressa como um efeito no resultado final.

Nesses casos, ou quando a incerteza sobre um parâmetro é expressa diretamente em termos do seu efeito sobre Y , o coeficiente de sensibilidade $c_i = \frac{\partial y}{\partial x_i}$ é igual a 1 (ELLISON, 2012).

e) Determinação da Incerteza Expandida

A Incerteza Expandida U é obtida, multiplicando-se a Incerteza Padrão Combinada $u_c(y)$ por um fator de abrangência k , conforme equação (8).

$$U = k u_c(y) \quad (8)$$

O fator de abrangência k é determinado com base no nível de confiança escolhido, em geral 95%, e no número de Graus de Liberdade Efetivo (GLE) calculado pela equação (9) (INMETRO, 2012a).

$$GLE = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1, N} \frac{u_i^4(y)}{v_i}} \quad (9)$$

onde: v_i é o número de graus de liberdade da variável i .

Uma vez calculado o número de graus de liberdade efetivo, e definido o nível de confiança, consulta-se o valor de k na tabela t-Student.

f) Apresentação dos Resultados

Quando se relata o resultado de uma medição em termos da Incerteza Expandida, $U = k u_c(y)$, deve-se fornecer:

- uma descrição completa de como o mensurando Y é definido;
- o resultado de medição como $Y = y \pm U$;
- as unidades de y e U ;
- o valor de k usado para obter U ;
- o nível de confiança associado ao resultado;
- o valor de U com apenas 2 algarismos significativos.