

**Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmácia**

Paula Alves de Souza

**Desenvolvimento e aplicação de método para avaliação da qualidade
de termocicladores**

Florianópolis

2017

Paula Alves de Souza

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MÉTODO PARA
AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE TERMOCICLADORES**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza
Bazzo

Co-orientadora: Profa. Dra. Flávia
Martinello

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Souza, Paula Alves de
Desenvolvimento e aplicação de método para avaliação da
qualidade de termocicladores / Paula Alves de Souza ;
orientador, Maria Luiza Bazzo ; coorientador, Flávia
Martinello . - Florianópolis, SC, 2017.
126 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Controle de Qualidade. 3.
Termociclador. 4. PCR. 5. Temperatura. I. , Maria Luiza
Bazzo. II. , Flávia Martinello. III. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.
IV. Título.

Paula Alves de Souza

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MÉTODO PARA
AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE TERMOCICLADORES**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Farmácia”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Florianópolis, ____ de ____ de _____.

Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa,
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Profª. Dra. Maria Cláudia Santos Silva
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Marcos José Machado
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Amir Antônio Martins de Oliveira Junior
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e meus avós pelo imenso apoio, incentivo e suporte durante os anos necessários para realizar meus estudos. Também devo gratidão por todos os ensinamentos que recebi e moldaram meu caráter como ser humano e profissional.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo, pela oportunidade, paciência, dedicação e ensinamentos.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Flávia Martinello, pelo apoio e conhecimento compartilhado, fundamentais em todas as etapas.

Ao meu namorado João Victor pelo amor, carinho, companheirismo e apoio em todos os momentos desta caminhada.

Aos meus colegas do LBMMS pelo companheirismo e que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Ao grande amigo Geison Vicente por sempre estar disponível para ajudar nas dificuldades, compartilhar bons momentos e cobrar resultados.

Às amigas Bruna e Débora pela amizade, apoio e incentivo.

À estudante Camila pela dedicação.

À Bioquímica Elayne pelo incentivo em iniciar esta etapa.

Aos professores, técnicos e profissionais que participaram de alguma forma no meu processo de ensino-aprendizagem.

Ao PPGFar pela oportunidade de estudar numa instituição de ensino pública de qualidade.

À parceria com o LabCET, nas pessoas do Prof. Dr. Edson Bazzo e do doutorando Marcos Vinicio Oro, sem o qual este estudo não seria viável.

Aos laboratórios que demonstraram disponibilidade e participaram do estudo.

Muito obrigada.

RESUMO

A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que utiliza equipamentos termocicladores para sua execução, vem sendo amplamente utilizada em laboratórios e é um método acurado se realizado de forma criteriosa. Considerando a importância do desempenho dos termocicladores para a execução da técnica, este estudo pretende contribuir para a garantia da qualidade e confiança dos resultados obtidos por técnicas de PCR. Assim, os objetivos deste estudo foram verificar a homogeneidade térmica do bloco térmico do termociclador, a temperatura e a duração efetivamente executadas em cada ciclo da reação, bem como avaliar a eficiência de amplificação dos termocicladores por meio de uma PCR-controle, e avaliar a relação entre o desempenho dos termocicladores e suas condições de uso. A avaliação da temperatura foi realizada por meio de um protocolo de verificação da temperatura estática e por meio de um protocolo que mimetiza os ciclos térmicos de uma PCR, utilizando-se micro-termopares. A maioria dos termocicladores verificados apresentou algum tipo de distorção no seu perfil de temperatura, demonstrando perfil curvo ou com *overshooting*. Variações significativas de temperatura entre as posições verificadas nos blocos térmicos também foram observadas. As temperaturas efetivamente executadas desviaram pelo menos 0,5°C das programadas em todas as etapas avaliadas. A duração efetiva das etapas foi consideravelmente diminuída, chegando a não haver um platô na temperatura programada em alguns casos. Tais alterações não foram desprezíveis, pois resultaram em falhas nos resultados da PCR-controle pela maioria dos termocicladores. Portanto, não há posições melhores ou piores no bloco térmico, há termociclador com funcionamento adequado ou inadequado. Por fim, ressalta-se a importância de os usuários realizarem a verificação da qualidade dos seus termocicladores a fim de conhecerem melhor o desempenho dos equipamentos, contribuindo para maior reprodutibilidade das PCR principalmente nos laboratórios que utilizam diferentes modelos de termocicladores.

Palavras-chave: Termociclador, controle da qualidade, reação em cadeia da polimerase, PCR, termopar, temperatura.

ABSTRACT

Polymerase Chain Reaction (PCR) has been widely used in clinical laboratories and in scientific research, being considered a well-established technique if carefully performed. Thermocyclers are essential equipments for PCR execution, which must show good performance. Considering the importance of thermocycler quality control, this research aims to contribute to quality assurance and reliability of the results obtained through PCR. In order to evaluate the quality of thermocyclers at UFSC laboratories, the research aimed to verify the thermal homogeneity in the thermal block, the temperature and duration obtained for each reaction cycle, as well as to evaluate the thermocycler amplification efficiency by means of a PCR control and the relationship between thermocycler performance and its maintenance conditions. Temperature evaluation was done using a protocol for verification of static temperature and another protocol that mimics PCR cycles, all of them using micro thermocouples. Most of the thermocyclers verified presented some type of distortion in their temperature profile, showing a curved profile or overshooting. Significant temperature variations among the positions verified in the thermal blocks were also observed. The effective temperatures deviated at least 0.5°C from those programmed in all stages evaluated. The actual duration of the stages was considerably reduced, not even reading a stable plateau at the programmed temperature in some cases. Such changes were not negligible, as they resulted in flaws in the control-PCR in the majority of the thermocyclers. Finally, it is emphasized the importance of users to verify the quality of their thermocyclers in order to know the performance of the equipment, contributing to a greater reproducibility of the PCR, especially among the laboratories that use different models of thermocyclers.

Keywords: Thermocycler, quality control, polymerase chain reaction, PCR, thermocouple, temperature.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo de termociclador.....	25
Figura 2 – Exemplo de painel de controle de termociclador.	26
Figura 3 – Vista lateral de um corte transversal de um bloco térmico com microtubos contendo amostra.	26
Figura 4 – Desenho esquemático de microtubo com sensor de temperatura (micro-termopar).....	36
Figura 5 – Desenho esquemático da distribuição dos microtubos com micro-termopares no bloco térmico de um termociclador com 96 posições.	37
Figura 6 – Representação das posições externas e internas no bloco térmico do termociclador.	39
Figura 7 – Desenho esquemático de um gel de agarose após eletroforese com os padrões de bandas esperados do kit comercial.....	42
Figura 8 – Fotografia do microtubo com sensor de temperatura.	50
Figura 9 – Fotografia dos microtubos acoplados aos sensores de temperatura posicionados em 18 poços no bloco térmico de um termociclador.	52
Figura 10 – Representação esquemática das 3 (três) posições avaliadas do bloco térmico durante a padronização.	53
Figura 11 – Reprodutibilidade das medidas de temperatura em diferentes posições do bloco térmico em temperaturas que mimetizam uma PCR.	54
Figura 12 – Uniformidade da temperatura do bloco térmico verificada (UBver°C) e desvio da temperatura programada ($Dv \pm ^\circ C$) 300 s após o início do <i>timing</i>	55
Figura 13 – Influência temporal sobre a uniformidade do bloco verificada (UBver).	59
Figura 14 – Representação dos perfis de temperatura.	62
Figura 15 – Desvio da temperatura programada.	65
Figura 16 – Resultado da PCR-controle em um termociclador com bom desempenho.....	71
Figura 17 – Resultado da PCR-controle em um termociclador com desempenho ruim.	72
Figura 18 – Perfis de temperatura e resultados da PCR-controle.	79
Figura 19 – Representação em 3D da temperatura efetiva nas diferentes posições do bloco térmico dos termocicladores em cada uma das etapas da PCR durante os 31 ciclos programados.	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características de uso dos termocicladores.....	48
Tabela 2 – Massa dos microtubos adaptados antes e após o ensaio para análise da vedação (30 minutos a 95°C).....	51
Tabela 3 – Perfil de temperatura, temperatura e duração efetivas nas etapas da PCR nos 18 termocicladores.....	63
Tabela 4 – Especificações técnicas dos termocicladores e desempenho da PCR-controle.....	67
Tabela 5 – Variação da temperatura efetiva média intraposição no bloco térmico.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
POP	Procedimentos Operacionais Padrão
FOR	Formulários de controle de uso, de verificação e de manutenção
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementar
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
MS	Ministério da Saúde
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
BPLC	Boas Práticas Laboratoriais
ISO 9001	<i>International Organization for Standardization</i> 9001
ISO 17025	<i>International Organization for Standardization</i> 17025
PALC 2013	Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CTC	Centro Tecnológico
HU/UFSC	Hospital Universitário Prof. Polidoro Ernani de São Thiago – Universidade Federal de Santa Catarina
LabCET	Laboratório de Combustão e Engenharia de Sistemas Térmicos
MIP	Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
UBfab	Uniformidade do bloco
T_{pro}°C	Temperatura programada
T_{display}°C	Temperatura no <i>display</i>
T_x	Instante de verificação após x segundos do início do <i>timing</i>
T_{máx}°C	Temperatura máxima
T_{mín}°C	Temperatura mínima
T_{méd}°C	Temperatura média
UBver	Uniformidade do bloco verificada
Dv	Desvio
t_{0s}	Tempo zero
µL	Microlitros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral.....	32
3.2 Objetivos Específicos.....	32
4. METODOLOGIA.....	34
4.1 Características dos termocicladores avaliados.....	34
4.2 Desenvolvimento do método.....	35
4.2.1 Avaliação da temperatura dos termoblocos dos termocicladores.....	35
4.2.1.1 Preparo dos microtubos para avaliação das temperaturas.....	35
4.2.1.2 Calibração dos termopares.....	36
4.2.1.3 Protocolo de verificação da temperatura estática.....	36
4.2.1.3.1 Influência espacial.....	38
4.2.1.3.2 Influência temporal.....	39
4.2.1.4 Protocolo que mimetiza os ciclos térmicos de uma PCR.....	39
4.2.1.4.1 Verificação da temperatura efetivamente executada em cada etapa da reação.....	40
4.2.1.4.2 Verificação da duração efetiva de cada etapa da reação.....	41
4.2.1.4.3 Variação (SD) da temperatura intraposição.....	41
4.3 Verificação do termociclador por meio de uma PCR-controlada realizada com <i>kit</i> -comercial.....	41
4.4 Avaliação da relação entre as características do termociclador e a eficiência de amplificação.....	42
4.5 Avaliação da relação entre os resultados da verificação de temperatura do termociclador e a eficiência de amplificação.....	43
4.6 Análise estatística.....	43
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	46
5.1 Características dos termocicladores avaliados.....	46
5.2 Avaliação da temperatura dos termoblocos dos termocicladores.....	49
5.2.1 Preparo dos microtubos para avaliação das temperaturas.....	49
5.2.2 Calibração dos termopares (sensores).....	52
5.2.3 Análise da reprodutibilidade nos experimentos.....	53

5.2.4 Aplicação do método.....	54
5.2.4.1 Protocolo de verificação da temperatura estática.....	54
5.2.4.1.1 Influência espacial.....	54
5.2.4.1.2 Influência temporal na temperatura de 95°C.....	58
5.2.4.2 Protocolo que mimetiza os ciclos térmicos de uma PCR.....	60
5.3 Verificação do termociclador por meio de uma PCR-controlada realizada com <i>kit</i> comercial.....	70
5.4 Avaliação da relação entre as características do termociclador e sua eficiência de amplificação (desempenho).....	73
5.5 Avaliação da relação entre os resultados da verificação de temperatura do termociclador e a eficiência de amplificação (desempenho).....	77
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
7. PERSPECTIVAS.....	90
REFERÊNCIAS.....	92
APÊNDICES.....	104
APÊNDICE A – Questionário referente às características e condições de uso de termocicladores.....	104
APÊNDICE B – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	111
APÊNDICE C – Declaração de autorização de uso de equipamento.....	114
APÊNDICE D – Mapa para protocolos de avaliação da temperatura dos termoblocos dos termocicladores.....	115
APÊNDICE E – Especificações técnicas dos termocicladores em avaliação.....	116
APÊNDICE F – Condições de uso dos termocicladores em avaliação.....	119
ANEXOS.....	124
ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP.....	124

1. INTRODUÇÃO

As técnicas de biologia molecular vêm sendo amplamente utilizadas porque seu desenvolvimento atendeu às expectativas de melhorar a abrangência investigativa em pesquisa e diagnóstico. A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é amplamente utilizada em pesquisa e diagnóstico, como por exemplo, para identificar doenças infecciosas e genéticas, para determinar suscetibilidade aos antimicrobianos, prever doenças infectocontagiosas e câncer, e para prever respostas a fármacos. Para sua execução, são fundamentais os equipamentos termocicladores, que devem apresentar bom desempenho.

A homogeneidade térmica deve ser garantida em todo o bloco, pois a temperatura absoluta que cada microtubo de reação atinge durante cada etapa do protocolo é crítica para o rendimento do produto. Distorções significativas nos perfis de temperatura dos termocicladores podem resultar em falhas na PCR. O desempenho de cada equipamento deve ser conhecido para que possam ser realizados ajustes às condições de reação. Assim, os usuários de termocicladores podem ser capazes de evitar inesperados maus resultados da PCR por meio do planejamento de seus protocolos considerando também o perfil do equipamento.

A validação, manutenção e verificação dos equipamentos têm por finalidade estabelecer características que forneçam testes moleculares com resultados consistentes e de confiança. A calibração/verificação de termocicladores é crucial, pois, qualquer alteração no desempenho desses equipamentos tem impacto direto na sensibilidade e na acurácia das análises moleculares (ROSSETTI, 2006; PALC, 2008). No entanto, no contexto do controle da qualidade voltado a equipamentos laboratoriais dedicados às áreas de pesquisa e clínica foi identificada carência de rotina para a avaliação dos termocicladores.

Considerando que protocolos de PCR gerados em um laboratório são dificilmente reproduzíveis por outro, mesmo em ensaios executados sob condições idênticas, surgiu o questionamento quanto à possibilidade da falha encontrar-se nas condições operacionais dos termocicladores, envolvendo seu desempenho e suas condições de uso.

Além disso, a recente tendência de se utilizar protocolos de PCR de ciclos rápidos, com volumes de reação reduzidos, apresenta uma demanda ainda mais desafiadora no desempenho de um termociclador. Isso pode resultar em mais falhas em ensaios se não

desenhados e padronizados cuidadosamente. Para garantir que os equipamentos estejam sendo operados em boas condições é essencial ter meios para verificar o seu funcionamento.

Neste contexto, considerando a importância do controle da qualidade dos termocicladores, o presente estudo avaliou o desempenho de termocicladores utilizados na Universidade Federal de Santa Catarina e desenvolveu um método para o monitoramento desses equipamentos, contribuindo para a garantia da qualidade e confiança dos resultados obtidos por técnicas de PCR.

Julgamos importante a descrição das marcas dos equipamentos para que os usuários conheçam o desempenho dos equipamentos disponíveis no mercado e tenham mais informações para a escolha no momento da aquisição.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Os métodos moleculares começaram a avançar no início dos anos 1970. Desde então, diversas técnicas de obtenção de informações a partir do DNA foram surgindo, contudo, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) foi a técnica revolucionária, tornando-se um elemento fundamental das análises genéticas e moleculares (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Com surgimento no final dos anos 1980, teve sua aplicação amplamente difundida e para ser empregada em diversas áreas vem sofrendo modificações, como a PCR em tempo real, a *nested* PCR, a multiplex PCR, entre outras (MARKOULATOS; SIAFAKAS; MONCANY, 2002; HUGGETT et al., 2005; FAKRUDDIN et al., 2013). Como prova da relevância desta técnica, cerca de 10 anos após apresentá-la, Kary B. Mullis foi agraciado, em 1993, com o Prêmio Nobel de Química pela invenção da PCR (MULLIS, 2016).

Em resumo, a PCR é um método de amplificação *in vitro* de regiões específicas de ácidos nucleicos (DNA ou cDNA) em ciclos térmicos repetidos (STRACHAN; READ, 2003). Os elementos essenciais da PCR consistem na amostra com material genético para a amplificação, no conjunto de bases nitrogenadas, nos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e na enzima polimerase termoestável (SAMBROOK & RUSSEL, 2001; BURTIS; ASHWOOD; BRUNS, 2012). Durante os ciclos, as temperaturas são progressivamente ajustadas nos valores típicos de 95°C, 55°C e 72°C, para que sejam realizadas as etapas de desnaturação da dupla fita de DNA pelo aquecimento, de hibridização dos *primers* às fitas simples do DNA-alvo e de extensão do DNA pela polimerase termoestável, respectivamente (SAMBROOK & RUSSEL, 2001; STRACHAN; READ, 2003). A temperatura de hibridização é a que mais sofre variações dependendo do conteúdo de pares de guanina e citosina no *primer*, basicamente pelo fato da hibridização destas bases ocorrer por meio de três pontes de hidrogênio, enquanto a adenina e a timina são unidas apenas por duas (KLUG et al., 2009). A temperatura de hibridização pode afetar a estringência da reação (amplitude na qual a hibridização entre ácidos nucleicos com sequências incompatíveis pode ocorrer – *mismatch*) o que afeta a eficiência dos *primers*, e conseqüentemente a especificidade da PCR (SIPOS et al., 2007). Já a temperatura de desnaturação pode afetar a atividade da enzima DNA polimerase, que possui meia-vida de 40 minutos a 95°C, e tem sua meia-vida reduzida para cinco (5) minutos

a 97,5°C (WEISSENSTEINER; GRIFFIN; GRIFFIN, 2003). As etapas da reação ocorrem em termocicladores, equipamentos que possibilitam as ciclagens térmicas necessárias. A cada ciclo os produtos amplificados se acumulam de forma exponencial, conseqüentemente, após cerca de 30 ciclos uma molécula é amplificada aproximadamente 2^{30} vezes, isto é, mais de um bilhão de vezes (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). O produto da amplificação contendo o ácido nucleico de interesse é definido como *amplicon* (FORBES; SAHM; WEISSFELD, 2007). Após a amplificação, espera-se *amplicons* com determinado tamanho, isto é, com determinado número de pares de bases (pb), que dependem do segmento do genoma selecionado pelos *primers* (FORBES; SAHM; WEISSFELD, 2007).

Através dessa técnica, é possível obter uma grande quantidade de DNA de uma região específica a partir de quantidades extremamente pequenas de um DNA-molde. Assim, os testes que se baseiam na análise de ácidos nucleicos são, sem dúvida, métodos fundamentais no diagnóstico das doenças humanas (BOROVNIK et al., 2011).

A PCR tem ampla aplicação em várias áreas, incluindo identificação de resistência a antimicrobianos (SCHEFFER et al., 2010; LAWUNG; CHERDTRAKULKIAT; PRACHAYASITTIKUL, 2012; CAMPOS-PENA et al., 2014; PRIM et al., 2015; CASSU-CORSI et al., 2015), genotipagem de espécies bacterianas e virais associadas a outros métodos moleculares (SCHEFFER et al., 2010) e identificação de fatores prognósticos como genes ou expressão proteica (MORAES et al., 2013). Podem confirmar uma desordem genética ou prever o risco de uma futura desordem, como uma predisposição hereditária ao câncer, e influenciar nas decisões terapêuticas, bem como em aplicações na farmacogenética para prever respostas a um fármaco (SERTIC, 2004; BERWOUTS et al., 2012; HOMAYOUNI; SALEHI; KAZEMI, 2014; STRAMBU et al., 2014; CASCELLA et al., 2015).

Outro segmento no qual a PCR tem aplicação bastante difundida é o de diagnóstico de doenças infecciosas, com estimativa que compreende quase 70% de todo o mercado para testes moleculares diagnósticos (NGAN et al., 2011; ZAULI; MENEZES; OLIVEIRA, 2013; LEVEN; FINCH; VAN BELKUM, 2013; LAU et al., 2014; MOREL et al., 2014). Da mesma forma, no Brasil a área da biologia molecular teve grande expansão, principalmente para a detecção de microrganismos, por exemplo *Chlamydia trachomatis* e *Mycobacterium*

tuberculosis (NOGUEIRA et al., 2012; SCHORNER, 2014; GOLFETTO, 2014; WILDNER et al., 2014).

Tendo sido submetida a melhorias e modificações contínuas, a PCR é agora rotineiramente aplicada na maioria dos laboratórios clínicos como ferramenta básica para grande parte dos exames moleculares realizados, bem como em áreas básicas de pesquisa, sendo responsável por impulsionar diversas áreas, tais como: agricultura e tecnologia de alimentos, medicina humana, veterinária e análises forenses (FIORENTINI et al., 2009; BOROVIK et al., 2011; KAMINIWA et al., 2013; COOK et al., 2015).

Suas características mais relevantes são a sensibilidade, a especificidade e a rapidez (LEVEN; FINCH; VAN BELKUM, 2013). Além disto, diversos tipos de amostras biológicas podem ser utilizados, como sangue, urina, líquido cefalorraquidiano, escarro, entre outros (MELO et al., 2010).

A PCR é considerada uma técnica confiável, quando executada de forma criteriosa. Fundamentalmente, são necessários reagentes de boa qualidade e um termociclador que apresente bom desempenho. Segundo a Resolução nº 302 da ANVISA/MS, de 13 de outubro de 2005, os laboratórios devem utilizar amostras controle comerciais, registradas na ANVISA/MS em atenção à legislação vigente. Entretanto, formas alternativas descritas na literatura também podem ser utilizadas. Para isto, o laboratório que utilizar metodologias próprias - *in house*, deve documentá-las incluindo, no mínimo a descrição das etapas do processo, a especificação e sistemática de aprovação de insumos, reagentes, equipamentos e instrumentos, e a sistemática de validação. O laboratório também deve manter registro de todo o processo e especificar no laudo que o teste é preparado e validado pelo próprio laboratório.

Diversos fatores podem influenciar a validade dos resultados obtidos por PCR. Sutis alterações nas condições da reação podem levar a variações significativas nos resultados devido à natureza exponencial de amplificação. Estes fatores incluem: a qualidade das amostras de DNA; ausência de inibidores da DNA polimerase; a concentração dos componentes da reação; as condições dos ciclos térmicos; e o correto desempenho do termociclador, que, talvez menos amplamente conhecido, também atribui variações nos resultados da PCR. (SAUNDERS et al., 2001; KIM et al., 2008; SANTOS; STERNBERG; ALMEIDA, 2014). Domingo e colaboradores (2012) e Escadafal e

colaboradores (2012) fazem referência ao termociclador como um dos fatores que podem influenciar o desempenho do ensaio.

Contudo, se os principais fatores que afetam a reprodutibilidade e a comparabilidade da PCR forem considerados e controlados, é possível estabelecer confiança nos resultados.

Considerando que resultados falsos positivos e falsos negativos são as principais desvantagens da maior parte dos resultados laboratoriais (KESSLER; RAGGAM, 2012) é de extrema importância avaliar os testes por meio de um rigoroso controle de qualidade para poder informar resultados precisos e exatos (BERWOUTS *et al.*, 2012; LEVEN; FINCH; VAN BELKUM, 2013).

A qualidade dos testes moleculares foi recentemente redefinida pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), nos Estados Unidos, no documento MM19, intitulado (em tradução livre) "Estabelecendo testes moleculares em ambientes de laboratório clínico" (CLSI, 2011). O alcance e a precisão dos diagnósticos moleculares trazem responsabilidades clínicas, éticas e legais sem precedentes (BOROVIK *et al.*, 2011). Neste sentido, verifica-se a importância do diagnóstico molecular para a sociedade moderna e a necessidade da validação desses métodos. Comparada com outras áreas laboratoriais, as técnicas de controle da qualidade para testes de diagnóstico molecular têm ficado para trás. Os principais desafios são: tecnologias novas e em rápida evolução, grandes expectativas de precisão, falta de materiais de controle da qualidade e o aparecimento quase diário de novos alvos. Em face dessas questões, laboratórios clínicos estão se esforçando para desenvolver programas de garantia da qualidade para testes de diagnóstico molecular (RUNDELL, 2008).

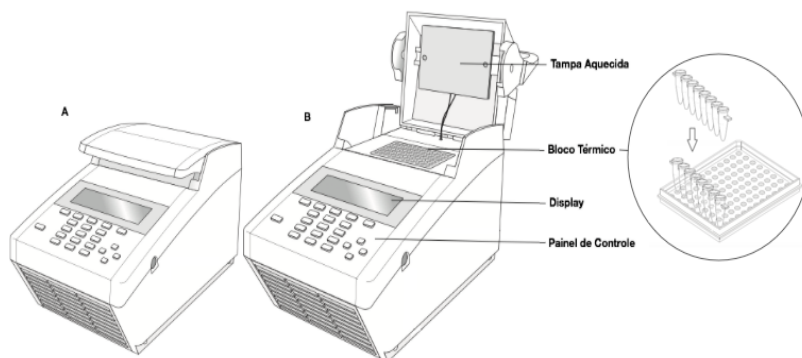
Laboratórios que desenvolvem as suas atividades de acordo com as Boas Práticas Laboratoriais (BPLC) ou que possuem sistemas de Garantia da Qualidade ISO 9001 ou ISO 17025 necessitam verificar periodicamente e rigorosamente, a conformidade de seus equipamentos e instrumentos de medição às especificações requeridas (CONTROL LAB, 2005). Os procedimentos de calibração de equipamentos utilizados em biologia molecular, conforme normas técnicas, são requerimentos importantes para a qualidade dos resultados. A calibração de termocicladores é crucial, pois qualquer alteração no desempenho desses aparelhos tem um impacto direto na sensibilidade e na especificidade das análises moleculares (ROSSETTI; SILVA; RODRIGUES, 2006). Parâmetros como a temperatura e a duração dos

ciclos devem ser avaliados quanto ao desempenho esperado. Segundo a Norma PALC 2013, devem ser realizados os registros da validação do desempenho dos equipamentos que confirmem sua adequação ao uso pretendido. A manutenção dos equipamentos deve seguir critérios internos com a finalidade de se estabelecer características que forneçam testes moleculares com resultados consistentes e de confiança. Assim, a manutenção e as verificações devem ser realizadas periodicamente e registradas.

Desde a publicação do primeiro artigo descrevendo a PCR, termocicladores tornaram-se básicos em laboratórios. A transferência rápida de calor do bloco de aquecimento para a amostra líquida dentro do microtubo garante uma alta eficiência de formação de *amplicons*. Contudo, o sistema deve garantir a uniformidade de temperatura, taxa de aquecimento, e temperatura e a duração dos platôs pelo tempo desejado para todas as amostras dentro de um ensaio, bem como reprodutibilidade ensaio após ensaio (SCHODER et al., 2003; SCHODER et al., 2005). Aoyagi (2001) sugere verificar se o campo de temperatura está compatível em cada posição no bloco de aquecimento do termociclador.

O termociclador é um equipamento projetado para executar as alterações cíclicas de temperatura requeridas para a amplificação enzimática de sequências específicas de DNA *in vitro*, utilizando a PCR. Composto basicamente por uma tampa aquecida, um bloco térmico que dá suporte aos microtubos da reação, um dispositivo termoelétrico e um microprocessador, o funcionamento do termociclador é realizado basicamente pela transferência de calor do bloco térmico para a reação (WEIER; GRAY, 1988). A Figura 1 ilustra o desenho de um modelo típico de termociclador.

Figura 1 - Modelo de termociclador.



(A) Termociclador com a tampa fechada; (B) Termociclador com a tampa aberta e com indicação de alguns componentes. Ampliação do bloco térmico onde se acomodam os microtubos com as amostras. Adaptado de APPLIED BIOSYSTEMS, 2010.

O sistema de aquecimento do termociclador pode ser executado de dois modos: sistema para microtubo ou sistema para bloco. Quando é utilizado o primeiro sistema, deve ser considerado o volume de amostra (ex.: 50 μL ou 100 μL) para alcançar a temperatura programada. O segundo sistema não leva em consideração o volume da amostra e o bloco térmico simplesmente aquece até a temperatura programada.

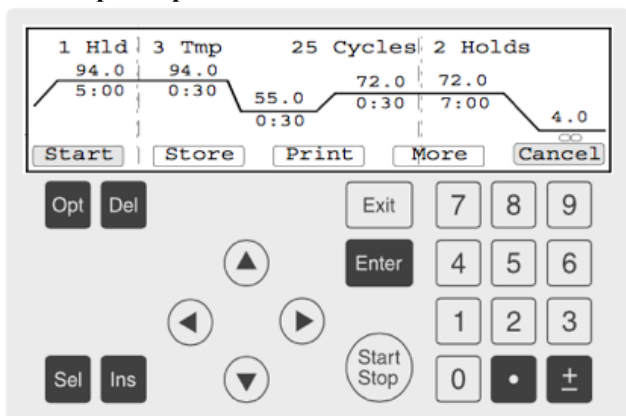
O equipamento possui uma unidade de aquecimento/resfriamento integrada que é utilizada para elevar e baixar a temperatura do bloco térmico de forma controlada. Para isso, um algoritmo de controle manipula a corrente fornecida para refrigeradores termoelétricos de tal modo que o perfil térmico pré-definido de temperatura possa ser executado.

A tampa aquecida aplica pressão sob os microtubos para garantir que se mantenham firmemente fechados, para assegurar que o líquido da reação não condense na tampa do microtubo e, em vez disso, permaneça no fundo, onde ocorre a reação, e para reduzir a resistência térmica de contato entre a parede do microtubo e o bloco térmico.

Para alcançar uma excelente transferência de calor entre o bloco térmico e as amostras em si, os blocos térmicos são constituídos de materiais com alta condutividade térmica, normalmente de prata ou de alumínio, ou ainda banhados com uma camada de ouro. As Figuras 2 e 3 ilustram um modelo de *display* de termociclador com ciclo térmico

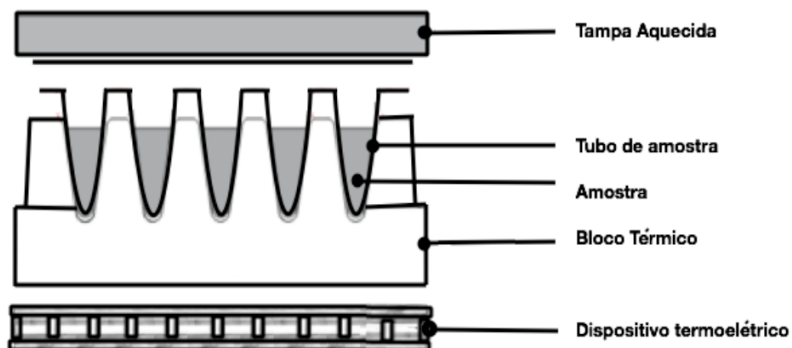
programado e um modelo de bloco térmico visto lateralmente junto a tampa aquecida, respectivamente.

Figura 2 - Exemplo de painel de controle de termociclador.



Exemplo de painel de controle de termociclador com um exemplo de ciclo térmico programado. Adaptado de EPPENDORF, 2004.

Figura 3 - Vista lateral de um corte transversal de um bloco térmico com microtubos contendo amostra¹.



Fonte: Autora.

¹ Nos termocicladores Applied Biosystems Veriti os microtubos não são dispostos diretamente no termobloco conforme a figura 3. Os microtubos são dispostos em um suporte, fornecido pelo fabricante, que é posicionado sobre o bloco térmico.

Quando comparada a outras tecnologias de diagnóstico molecular, o termociclador é reconhecido e destacado como tecnologia estável e largamente utilizada. Contudo, nem sempre considerado, o desempenho do termociclador é crucial na obtenção de resultado válido da PCR, por viabilizar a temperatura correta para cada uma das etapas, sob o risco de inserir chance para falhas, as quais ocorrem principalmente em virtude de problemas nas fases de desnaturação e hibridização (SANTOS; STERNBERG; ALMEIDA, 2014).

Protocolos de PCR gerados por um laboratório, dificilmente são reprodutíveis por outro laboratório. Mesmo sob condições de ensaio idênticas, pode haver dificuldades na reprodução de resultados (SCHODER et al., 2005). Se nas reações forem utilizados reagentes de igual qualidade e DNA sem presença de inibidores, uma possível explicação para a falta de reprodutibilidade encontra-se nas diferenças entre as temperaturas realizadas pelos diferentes termocicladores. Escadafal e colaboradores (2013) abordam em um estudo de avaliação externa da qualidade, que utilizando a mesma técnica e protocolo, porém termocicladores diferentes, os laboratórios obtiveram resultados distintos, com falso-negativos.

A confiança de ensaios baseados em PCR tem sido discutida sob várias perspectivas (CHEN et al., 2011; RAYMAEKERS et al., 2011; WALLACE; MACKAY, 2012). Holden e colaboradores (2011) discutiram amplamente os fundamentos para garantia da qualidade de métodos de PCR em diagnóstico clínico. Vários estudos interlaboratoriais têm sido desenvolvidos para avaliar os fatores que afetam a reprodutibilidade e comparabilidade da PCR como técnica de detecção molecular (DOMINGO et al., 2010; ESCADAFAL et al., 2012; ESCADAFAL et al., 2013; FITZGERALD; OLSEN; SPEER, 2013; NIKISIN et al., 2015). Uma das razões da falta de reprodutibilidade pode ser a influência do termociclador na eficiência de amplificação. Alguns trabalhos sobre avaliação de desempenho do termociclador relataram a possibilidade de uso inapropriado deste equipamento, especialmente quando utilizado em protocolos de PCR de ciclos rápidos (SCHODER et al., 2003; KIM et al., 2008).

Com relação à notável importância da PCR, a literatura referente ao controle de qualidade de termocicladores ainda é escassa. Alguns estudos foram publicados sobre a primeira geração de termocicladores (PEREZ; SALDANA, 1990; TWEED; WHITNEY; BLOCH, 1991; MAC PHERSON et al., 1993; PENNER et al., 1993;

HE; VILJANEN; MERTSOLA, 1994; SCHAUBERGER; WAGNER, 1998). Saunders e colaboradores (2001) não avaliaram as características físicas dos termocicladores, mas determinaram a eficiência de amplificação demonstrando a importância da calibração de termocicladores na reprodutibilidade da PCR entre laboratórios, constatando que os termocicladores que produziam os piores resultados tinham mais de 4 anos de uso e não estavam calibrados. Alguns termocicladores demonstraram desempenho insuficiente para alguns protocolos, o que suportaria a especulação de falha em comparabilidade interlaboratorial de ensaios, parcialmente devido ao uso de termocicladores em estado de manutenção inadequado.

Um estudo examinando os perfis de temperatura, entre microtubos de termocicladores permitiu distingui-los entre precisos e menos precisos. Nesse estudo, dois dos seis termocicladores testados apresentaram perfis de temperatura que desviaram de seu protocolo e, além disso, mostraram fases de *overshooting* e *undershooting* em seus perfis de temperatura, o que também pode prejudicar a comparabilidade de ensaios. No caso de um termociclador específico, as amostras não atingiram a temperatura programada, ficando 20°C abaixo daquela definida (SCHODER et al., 2005). Kim e colaboradores (2008) obtiveram resultados semelhantes e demonstraram também as consequências das falhas no desempenho de termocicladores nos resultados da PCR.

Na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) os termocicladores são utilizados principalmente para fins de pesquisa em diversos laboratórios de centros de ensino distintos, como o Centro de Ciências da Saúde (CCS), o Centro de Ciências Biológicas (CCB), o Centro de Ciências Agrárias (CCA) e o Centro Tecnológico (CTC), bem como para fins de diagnóstico clínico no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC).

Assim, este estudo avaliou as características de desempenho dos termocicladores e sua influência na eficiência de amplificação, utilizando ensaios sensíveis para reagir a temperaturas incorretas, não homogeneidade térmica do bloco e duração das etapas da PCR, tendo como objetivo geral desenvolver e aplicar um método para avaliação da qualidade de termocicladores utilizados em diferentes laboratórios da UFSC.

Esse estudo, além de fornecer dados sobre a qualidade dos termocicladores avaliados, contribui para completar uma lacuna na

literatura referente ao controle de qualidade de ensaios que utilizam PCR. Ressalta-se que os procedimentos desenvolvidos são inéditos, no conhecimento da autora, e que resultaram em um pedido de patente.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver e aplicar um método para avaliação da qualidade de termocicladores.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar a temperatura e a duração efetivamente executadas pelo termociclador em cada uma das etapas da PCR.

- Verificar a variação da temperatura nos poços e a homogeneidade térmica em todo o termobloco.

- Avaliar a qualidade dos termocicladores por meio da utilização de uma PCR-controle realizada com *kit*-comercial.

- Relacionar o desempenho dos termocicladores verificados com as características técnicas e as condições de uso.

4. METODOLOGIA

4.1 Características dos termocicladores avaliados

O levantamento do número e da localização dos termocicladores da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) foi realizado primeiramente por meio de contato com o setor de patrimônio da universidade através do qual foram identificados os termocicladores do Campus Reitor João David Ferreira Lima - Trindade. Posteriormente, foram convidados os laboratórios de pesquisa da UFSC para participar do projeto, objetivando-se avaliar o maior número possível de termocicladores, incluindo também aqueles adquiridos com recursos de pesquisa e não patrimoniados pela UFSC.

A fim de se obter as características referentes aos equipamentos da pesquisa, um questionário (Apêndice A) foi aplicado aos usuários dos termocicladores de cada laboratório.

A validação deste questionário foi realizada em dois laboratórios, e a partir dos resultados foi verificada a necessidade de reformulação de questões para melhor compreensão dos participantes. Uma vez validado, o questionário foi aplicado aos usuários dos demais termocicladores avaliados. O presente trabalho teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina em 18 de fevereiro de 2016, sob número 1.414.989 (Anexo A).

Todo o procedimento envolvido foi explicado verbalmente para o participante e no caso de interesse em participar do estudo, uma carta explicativa detalhada foi fornecida juntamente com o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice B). Do pesquisador responsável pelo laboratório de pesquisa foi solicitada assinatura em uma declaração de autorização para realização dos experimentos (Apêndice C). A entrega das respostas do questionário pôde ser realizada de duas maneiras: impressa, por contato direto com o participante ou por e-mail.

4.2 Desenvolvimento do método

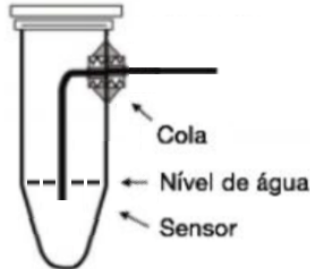
4.2.1 Avaliação da temperatura dos termoblocos

Os experimentos de medição da temperatura dos blocos térmicos dos termocicladores foi viabilizada pela parceria estabelecida com o Laboratório de Combustão e Engenharia de Sistemas Térmicos – LabCET - do Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC, por meio do Prof. Dr. Edson Bazzo, que disponibilizou o sistema de medição utilizado.

4.2.1.1 Preparo dos microtubos para avaliação das temperaturas

Os sensores de temperatura foram preparados utilizando-se micro-termopares tipo T (Omega™, EUA), com isolamento de tetrafluoretileno (teflon). Os termopares foram implantados em microtubos de parede fina de 0,2 mL (Axygen®, EUA). O volume de água utilizado foi de 100µL. O fio condutor do sensor foi disposto de forma a atravessar a parede do microtubo por um pequeno orifício, que foi selado com cola (Henkel Loctite™, EUA), conforme mostra a Figura 4. Primeiramente, a vedação foi considerada satisfatória, pois não houve perda da solução contida no microtubo após deixar o sistema por 30 minutos a 95°C. Além disto, antes e depois de cada ensaio cada microtubo com sensor foi pesado.

Figura 4 - Desenho esquemático de microtubo com sensor de temperatura (micro-termopar).



Microtubo com sensor de temperatura (micro-termopar) preparado para verificação da temperatura. Adaptado de KIM et al., 2008.

Os sensores foram conectados a um sistema de aquisição/comutação de dados contido no módulo 34901A (Agilent™, EUA) que adquiriu dados da temperatura em intervalos de um segundo. Os dados de temperatura do sistema de aquisição foram transferidos para um computador pessoal via cabo RS232 e processados com o software Agilent BenchLink Data Logger em tempo real.

4.2.1.2 Calibração dos termopares

O sistema de verificação da temperatura dos termocicladores foi calibrado em um Laboratório de Calibração Acreditado na Rede Brasileira de Calibração (RBC) pelo Inmetro de acordo com especificações estabelecidas pela metrologia legal. A calibração foi realizada em três pontos dentro da faixa de uso da temperatura do termociclador, entre 50°C e 95°C, que corresponde a faixa de temperatura na qual os testes foram executados.

4.2.1.3 Protocolo de verificação da temperatura estática

Para verificar a temperatura estática, os termocicladores foram programados em três temperaturas que se mantiveram estáticas por cinco minutos conforme o protocolo 1:

Protocolo 1:

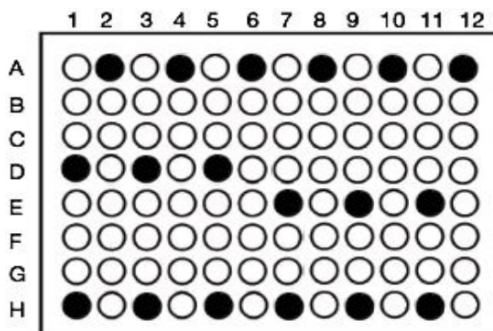
55°C por 300 segundos.

72°C por 300 segundos.

95°C por 300 segundos.

A temperatura da tampa dos termocicladores foi ajustada para 105°C. Foram colocados no bloco térmico 18 microtubos com os respectivos sensores de temperatura em diferentes posições simultaneamente, conforme a Figura 5.

Figura 5 - Desenho esquemático da distribuição dos microtubos com micro-termopares no bloco térmico de um termociclador com 96 posições.



De A a H identificação horizontal do local de inserção de cada microtubo no termobloco e de 1 a 12 identificação vertical de cada posição. A posição de cada microtubo é identificada pela combinação de letra e número (ex.: A2, A4, D1, etc). Os círculos preenchidos em preto destacam as posições dos blocos térmicos em que as temperaturas foram verificadas. Fonte: Autora.

Durante a execução do protocolo uma planilha (Apêndice D) foi utilizada para auxiliar na anotação de dados.

Para analisar os dados obtidos durante as verificações, os seguintes termos foram utilizados:

- (i) UBfab; uniformidade da temperatura do bloco conforme informada pelo fabricante. Refere-se à homogeneidade esperada para a temperatura entre os 96 poços do bloco.
- (ii) Tpro°C; temperatura programada. Corresponde a temperatura programada para ser executada pelo termociclador.
- (iii) txs; é o instante de verificação após x segundos do início do *timing* (ex.: t30s, t60s, t150s).
- (iv) Tmáx°C; temperatura máxima. Descreve o valor máximo de temperatura atingido pelo bloco térmico no instante t300s.
- (v) Tmín°C; temperatura mínima. Descreve o valor mínimo de temperatura atingido pelo bloco térmico no instante t300s.

(vi) UBver; uniformidade da temperatura do bloco verificada. Descreve a diferença entre $T_{\text{máx}}^{\circ\text{C}}$ e $T_{\text{mín}}^{\circ\text{C}}$ entre as posições avaliadas no instante $t_{300\text{s}}$.

(vii) Dv; desvio. Se refere à diferença entre a temperatura verificada e a $T_{\text{pro}}^{\circ\text{C}}$, ou seja, quanto variou da temperatura programada no instante $t_{300\text{s}}$ ($D_{\text{valto}} = T_{\text{máx}}^{\circ\text{C}} - T_{\text{pro}}^{\circ\text{C}}$; $D_{\text{baixo}} = T_{\text{mín}}^{\circ\text{C}} - T_{\text{pro}}^{\circ\text{C}}$). O desvio indica a tendência para temperatura mais alta que a temperatura programada (valores positivos de Dv) ou para temperatura mais baixa que a temperatura programada (valores negativos de Dv).

(viii) $t_0\text{s}$; tempo zero. Descreve a temperatura no tempo zero ou instante zero, ou seja, é o instante em que a $T_{\text{display}}^{\circ\text{C}}$ é igual a $T_{\text{pro}}^{\circ\text{C}}$.

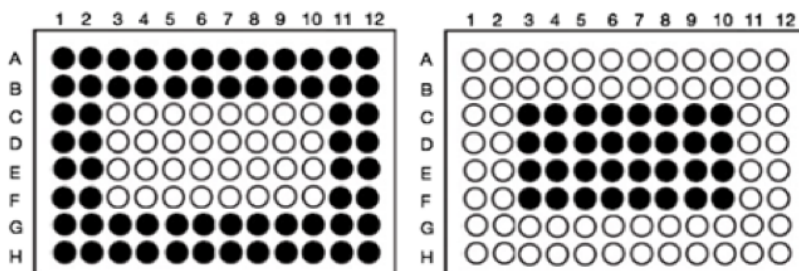
4.2.1.3.1 Influência espacial

A temperatura dos termocicladores foi monitorada por 300 segundos. No instante $t_{300\text{s}}$, a UBver foi calculada e comparada à uniformidade do bloco informada pelo fabricante (UBfab).

Para avaliação da tendência dos termocicladores de executar uma temperatura acima ou abaixo da programada foram analisados os valores de Dv com relação às temperaturas programadas no protocolo estático.

Em relação à influência da distribuição espacial, foi avaliado se as irregularidades da UBver seguem o padrão de distribuição das amostras, por meio da análise dos valores de $T_{\text{máx}}^{\circ\text{C}}$ e $T_{\text{mín}}^{\circ\text{C}}$ dos microtubos colocados em posições interiores e em posições exteriores do bloco térmico (Figura 6).

Figura 6 - Representação das posições externas e internas no bloco térmico do termociclador.



Linhas externas superiores A e B e inferiores G e H. Colunas internas 3 a 10 e externas 1, 2, 11 e 12. Fonte: Autora.

4.2.1.3.2 Influência temporal

A temperatura dos termocicladores também foi avaliada através da influência temporal por determinação da UBver (°C) e pelos Dv nos instantes t_{30s} , t_{60s} , t_{150s} e t_{300s} após o início do *timing* a 95°C. A uniformidade do bloco (UBver) em cada instante programado foi calculada pela diferença entre a $T_{máx}^{\circ C}$ e $T_{mín}^{\circ C}$, e o desvio (Dv) pela diferença entre as temperaturas verificadas ($T_{máx}^{\circ C}$ e $T_{mín}^{\circ C}$) e as $T_{pro}^{\circ C}$.

4.2.1.4 Protocolo que mimetiza os ciclos térmicos de uma PCR

No protocolo de ciclos térmicos (Protocolo 2) os termocicladores foram programados para variações de tempo e temperatura definidos que correspondem a um típico ensaio de PCR:

Protocolo 2:

Fase inicial: 95°C por 5 minutos.

Ciclos térmicos: 31 ciclos.

95°C por 30 segundos.

66°C por 1 minuto.

72°C por 1 minuto.

Foram denominadas etapas de hibridização, desnaturação e extensão, as temperaturas de 95°C, 66°C e 72°C, respectivamente, para fins de elucidação, pois o teste foi realizado utilizando-se apenas água tipo I (100 µl), sem material genético para ser amplificado. Durante o

ensaio foi aplicada a taxa máxima de aquecimento/resfriamento disponível e a temperatura da tampa dos termocicladores foi ajustada para 105°C. Foram colocados no bloco térmico dezoito sensores de temperatura, conforme a Figura 5. Foi realizada a média da temperatura de cada etapa dos 31 ciclos e posteriormente a comparação entre os diferentes poços.

Para analisar os dados obtidos durante as verificações do protocolo 2, os seguintes termos foram utilizados:

- (i) $T_{pro}^{\circ C}$; temperatura programada. Corresponde a temperatura programada para ser executada pelo termociclador.
- (ii) $T_{display}^{\circ C}$; temperatura no *display*. Corresponde a temperatura indicada no *display* do termociclador.
- (iii) t_x s; é o instante de verificação após x segundos do início do *timing* (ex.: t_{30} s, t_{60} s, t_{150} s).
- (iv) t_0 s; tempo zero. Descreve a temperatura no tempo zero ou instante zero, ou seja, é o instante em que a $T_{display}^{\circ C}$ é igual a $T_{pro}^{\circ C}$.

4.2.1.4.1 Verificação da temperatura efetivamente executada em cada etapa da reação

Com os dados de temperatura adquiridos em intervalos de um segundo foram realizadas as médias para 60 segundos nas etapas de hibridização e de extensão, e para 30 segundos na etapa de desnaturação para indicar a temperatura efetivamente executada em cada etapa da reação. Foi considerada como temperatura efetiva da etapa a temperatura média efetivamente executada pelo termociclador a partir do instante t_0 s, no qual a $T_{display}^{\circ C}$ é igual a $T_{pro}^{\circ C}$, até o t_{30} s (para a etapa de desnaturação) ou t_{60} s (para as etapas de hibridização e extensão) em cada ciclo da reação.

Com as temperaturas efetivas dos dezoito sensores foi realizado teste estatístico para avaliar a significância entre as diferenças das temperaturas nas diferentes posições. Em seguida, a temperatura média dos dezoito poços, foi comparada à programada, demonstrando a magnitude do desvio.

4.2.1.4.2 Verificação da duração efetiva de cada etapa da reação

A duração efetiva das etapas foi determinada a partir dos períodos de tempo em que as temperaturas verificadas estiveram dentro de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ das temperaturas programadas para cada etapa da reação, fornecendo também o tempo para o estabelecimento da temperatura.

Com os dados obtidos dos dezoito sensores, foram realizadas as médias para calcular a duração efetiva desempenhada em cada etapa da reação, mostrando a magnitude do desvio no tempo de reação programado.

4.2.1.4.3 Variação (SD) da temperatura intraposição

A variação da temperatura intraposição foi verificada pelo desvio padrão (SD) em relação a medida das temperaturas efetivas de cada uma das 18 posições no bloco térmico, em cada etapa da reação.

4.3 Verificação do termociclador por meio de uma *PCR*-controle realizada com *kit*-comercial

Uma amostra controle comercial (Microzone[®], Reino Unido) foi utilizada para avaliar cada termociclador.

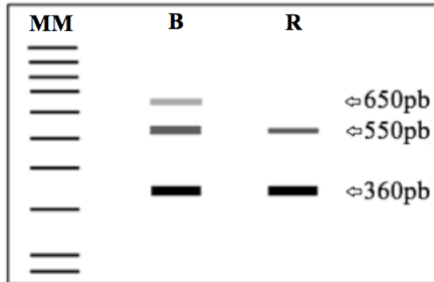
Foram amplificados produtos de 650, 550 e 360 pares de base (pb). A PCR foi realizada em 20 μL de volume final contendo 10 μL do *mix* de DNA-molde e iniciadores e 10 μL do *mix* de amplificação.

As condições da amplificação foram: uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de 31 ciclos a 95°C por 30 segundos, 66°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto.

Após os ciclos, alíquotas de 10 μL dos produtos da PCR foram analisadas por eletroforese em gel de agarose (1,7%) contendo brometo de etídio, e visualizadas através de iluminação ultravioleta.

A análise dos produtos da PCR e a interpretação dos dados foram realizadas por comparação dos padrões de bandas observando a presença ou ausência dos produtos de amplificação com o tamanho esperado e intensidade, conforme Figura 7.

Figura 7 - Desenho esquemático de um gel de agarose após eletroforese com os padrões de bandas esperados do kit comercial.



MM: Marcador de peso molecular; B: Padrão de bandas de um termociclador com bom desempenho; R: Padrão de bandas de um termociclador com desempenho ruim. Banda superior (650pb), banda intermediária (550pb) e banda inferior (360pb). Fonte: Autora.

Quando as três bandas estiverem presentes, mas em diferentes intensidades (banda superior apenas visível), isto indica que o termociclador está funcionando corretamente. Quando a banda intermediária estiver com fraca intensidade e a banda superior ainda mais fraca (ou nem visível), indica que o termociclador não está funcionando corretamente (não atingem a temperatura de hibridização necessária).

4.4 Avaliação da relação entre as características do termociclador e a eficiência de amplificação

Foi pesquisada a existência de relação estatisticamente significativa entre o desempenho do termociclador com as informações das especificações técnicas, como taxas de aquecimento/resfriamento e uniformidade térmica do bloco, obtidas por meio do questionário.

Foi verificado estatisticamente se existe relação entre o desempenho do termociclador e as informações a respeito das condições de uso do equipamento, como o tempo total de uso, tempo de uso semanal, estado de manutenção e limpeza do termociclador, também obtidas por meio do questionário.

Também foi investigado se há relação significativa entre os modelos de termocicladores e os dados referentes: à uniformidade da temperatura do bloco verificada (UBver); à influência espacial e temporal das temperaturas; às taxas de aquecimento e resfriamento

verificadas; aos valores de temperatura e duração efetivamente executadas em cada etapa da reação; à variação de temperatura entre os poços do bloco térmico, obtidas por meio dos protocolos de verificações das temperaturas, e à eficiência de amplificação, obtida por meio da PCR-controle.

4.5 Avaliação da relação entre os resultados da verificação de temperatura do termociclador e a eficiência de amplificação

Foi avaliada a relação entre os resultados referentes à eficiência de amplificação apresentada pelos termocicladores com os resultados referentes à verificação de temperatura do termociclador, como; os valores de temperatura e duração efetivamente executados em cada etapa da reação, a diferença de temperatura entre os poços do bloco térmico, a uniformidade da temperatura do bloco verificada (UBver), a influência espacial e temporal das temperaturas, as taxas de aquecimento e resfriamento verificadas.

4.6 Análise estatística

Para a análise estatística da comparação das variáveis numéricas foi utilizado Anova e o teste complementar de Tukey. A análise estatística das variáveis categóricas foi realizada utilizando-se os testes de Qui Quadrado e o teste exato de Fischer. Foram consideradas significativas as diferenças quando p foi menor que 0,05.

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1 Características dos termocicladores avaliados

Ao total foram analisados 18 termocicladores identificados neste estudo de A a R, os quais pertencem a seis (6) fabricantes distintos, com uma variedade de oito (8) modelos. Os usuários dos termocicladores participaram da etapa de caracterização dos seus equipamentos respondendo ao questionário validado (Apêndice A). A Tabela 1 e os Apêndices E e F resumem as características avaliadas dos termocicladores, como as especificações técnicas, as condições de uso e o estado de manutenção.

Entre os 18 termocicladores, 12 possuíam sistema de aquecimento tanto por bloco térmico quanto por volume de amostra, e seis (6) somente sistema de aquecimento por volume de amostra. O fato de 1/3 dos termocicladores verificados possuírem somente o sistema de aquecimento por volume de amostra demonstra que as verificações de temperatura não devem ser realizadas diretamente no bloco térmico, como descrito no manual de equipamentos comercialmente disponíveis, e sim no líquido contido nos microtubos, como realizado por Kim e colaboradores (2008) e Schoder e colaboradores (2005 e 2013), ajustando no próprio equipamento o volume utilizado.

Dezessete termocicladores possuíam capacidade para 96 microtubos e um para 25 microtubos, conseqüentemente um bloco térmico menor. No entanto, o comportamento e resultados do termobloco para 25 microtubos foram semelhantes aos demais.

Todos os termocicladores possuíam capacidade para microtubos de 0,2 mL, e cinco (5) capacidade também para microtubos de 0,5 mL. Todos os termocicladores verificados possuíam sistema de aquecimento da tampa, para evitar a condensação de água nas tampas dos tubos onde ocorre a reação. A avaliação das temperaturas dos termocicladores ocorreu com a tampa totalmente fechada, de forma a mimetizar as condições em que a PCR ocorre e diminuir a interferência da temperatura ambiente durante as análises, conforme recomendado no estudo de Santos (2014). Entretanto, não foi possível realizar a verificação da temperatura em termocicladores *real-time*, os quais normalmente apresentam o bloco térmico disposto na forma de gaveta, juntamente com a tampa aquecida, o que danificaria os sensores de temperatura ao ser completamente fechado.

De acordo com a Tabela 1, dos 18 termocicladores avaliados por meio do questionário, apenas sete (7) passaram por processos de calibração e/ou manutenção. Desses, apenas três (3) por motivo de manutenção preventiva e quatro (4) devido à manutenção corretiva. Dentre os equipamentos que passaram por manutenção preventiva, as mesmas foram realizadas a mais de dois anos, mesmo sendo utilizados por mais de 10 horas semanais (Tabela 1). Porém, recomendações sobre a frequência com que processos de calibração e/ou manutenção devem ser executados, não são fornecidas pelos fabricantes. A única recomendação fornecida por um fabricante é que após o período de garantia (12 meses) é necessário efetuar anualmente uma inspeção técnica pelo serviço autorizado pelo fabricante (BYOCLER).

Com relação às condições de uso dos termocicladores, a maioria (doze) possui entre 1 a 5 anos de uso (Tabela 1). Também a maioria (onze) são utilizados semanalmente por mais de 10 horas, dois (2) termocicladores são utilizados entre cinco (5) e dez (10) horas, e cinco (5) termocicladores são utilizados por menos de 5 horas durante o período de uma semana (Tabela 1).

Acerca da frequência de limpeza dos termocicladores, a maioria (dezessete) nunca passou por este procedimento e 1 (um) têm a limpeza realizada mensalmente (Tabela 1). Além disso, muitos usuários desconheciam tal necessidade, bem como a forma de realizar a limpeza. Todavia, todos os fabricantes dos termocicladores verificados, descrevem como a limpeza deve ser realizada em seus manuais. Porém, não há consenso em relação à frequência com que a limpeza deve ser executada, variando entre recomendações como regularmente, uma vez ao mês ou quando necessário (BIOER, 2013; APPLIED BIOSYSTEMS, 2016).

A maior parte (onze) dos termocicladores não são utilizados *overnight* e em geral (doze) possuem registro de uso no laboratório (Apêndice F).

Quanto à preferência pela utilização de determinadas posições do bloco térmico há uma paridade, com oito (8) usuários manifestando preferência entre posições centrais, alternadas e simétricas, e 10 usuários sem preferência. Percebeu-se que as escolhas pelas posições ocorreram mesmo os usuários desconhecendo o perfil de temperatura ou mesmo a variação de temperatura entre os poços dos seus termocicladores.

Tabela 1 - Características de uso dos termocicladores.

Termociclador	Tempo total de uso (anos)	Tempo de uso semanal (horas)	Nº de calibrações/manutenções	Motivo	Frequência de limpeza
A	1-5	>10	0	-	Nunca
B	1-5	>10	0	-	Nunca
C	1-5	>10	0	-	Nunca
D	<1	>10	0	-	Nunca
E	1-5	5-10	0	-	Nunca
F	1-5	>10	0	-	Nunca
G	1-5	>10	0	-	Nunca
H	1-5	>10	0	-	Nunca
I	1-5	>10	1	Rotina	Nunca
J	1-5	>10	1	Rotina	Nunca
K	1-5	>10	1	Rotina	Nunca
L	>5	5-10	1	Falha no <i>display</i> devido à bateria	Nunca
M	>5	>10	0	-	Mensalmente
N	>5	<5	0	-	Nunca
O	1-5	<5	0	-	Nunca
P	>5	<5	1-5	Super aquecimento no bloco térmico	Nunca
Q	>5	<5	1-5	Não aquecia	Nunca
R	1-5	<5	1	Não ligava	Nunca

Fonte: Autora.

O número de usuários por equipamento variou de 1 (um) a 20 por termociclador. Sendo que a maioria (dez) dos termocicladores é utilizada por mais de 10 usuários. Acerca do perfil de usuários, de modo geral, os termocicladores são mais utilizados por estudantes de pós-graduação, seguido por estudantes de graduação e técnicos de laboratório. O perfil de usuários neste estudo justifica-se pelo fato de os termocicladores pertencerem a laboratórios de pesquisa da Universidade, e por isso ser composto principalmente por estudantes de

pós-graduação, seguido por estudantes de graduação e por último, técnicos de laboratório e bioquímicos.

5.2 Avaliação da temperatura dos termoblocos dos termocicladores

Inicialmente foram realizados ensaios com o objetivo de padronização dos protocolos. Primeiramente foram executados ensaios verificando-se apenas três posições do bloco térmico, ensaios com diferentes volumes de solução no microtubo adaptado, ensaios com e sem estabilizador acoplado ao termociclador, com diferentes sensores de temperatura e ensaios de reprodutibilidade (em dias diferentes). Após a etapa de padronização, seguiu-se para os ensaios de avaliação da temperatura dos termoblocos dos termocicladores (resultados não apresentados, mas discutidos durante o exame de qualificação).

Todos os termocicladores foram avaliados por meio de dois protocolos distintos, a saber: protocolo de verificação da temperatura estática (protocolo 1) e protocolo que mimetiza os ciclos térmicos de uma PCR (protocolo 2). De cada termociclador foram avaliadas dezoito posições do bloco térmico.

5.2.1 Preparo dos microtubos para avaliação das temperaturas

Os sensores utilizados para realizar as verificações de temperatura foram micro-termopares de resposta rápida do tipo T (cobre/constantan), com isolamento de Neoflon PFA para alto desempenho e exatidão do fio com limites especiais de erros, que medem na faixa de temperatura de 0 a 350°C.

Algumas dificuldades foram encontradas durante o processo de adaptação dos sensores aos microtubos. Primeiramente ocorria o fenômeno de capilaridade no micro-termopar, e após algumas tentativas foi solucionado com a vedação com resina sintética.

Em um segundo momento, houve problema com a vedação do orifício realizado para inserir o micro-termopar no microtubo de PCR, devido ao fato do tubo ser composto de polipropileno e a maioria das colas para plástico não serem eficazes para esse material. Inclusive, a cola utilizada por Kim e colaboradores (2008) não vedou o orifício nos nossos microtubos. Estudos semelhantes na literatura não informam se a vedação foi realizada ou a cola utilizada (SCHODER, 2005; 2013).

Após algumas tentativas com diferentes tipos de silicones e colas para plástico, tal dificuldade foi solucionada através da importação de uma cola para todos os tipos de plástico, inclusive polipropileno.

Resolvidas as limitações, os microtubos de PCR de 0,2 mL foram adaptados de forma que o fio condutor do sensor atravessasse a parede do microtubo por um pequeno orifício, e posteriormente foi selado com cola, conforme mostra a Figura 8. Além disto, a extremidade do sensor foi disposta mantendo distância do fundo e da parede do microtubo, com o intuito de verificar a temperatura no líquido contido no microtubo e não nas suas paredes.

Figura 8 - Fotografia do microtubo com sensor de temperatura.



Fotografia do microtubo com sensor de temperatura (micro-termopar) adaptado para verificação da temperatura em cada posição do termobloco dos termocicladores. Fonte: Autora.

A vedação foi considerada satisfatória, pois não houve perda da solução contida no microtubo inclusive após o sistema permanecer por 30 minutos a 95°C, verificada pelo resultado das pesagens de cada microtubo adaptado ao sensor antes e depois de cada ensaio (Tabela 2).

Tabela 2 - Massa dos microtubos adaptados antes e após o ensaio para análise da vedação (30 minutos a 95°C).

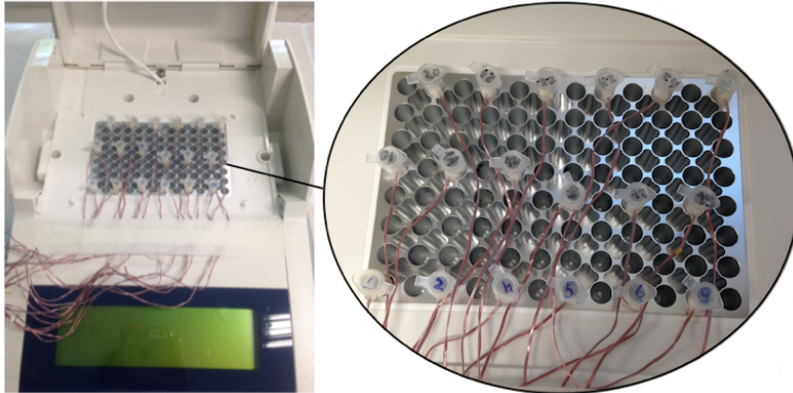
Microtubo adaptado	Massa Antes (g)	Massa Depois (g)	Microtubo adaptado	Massa Antes (g)	Massa Depois (g)
1	6,65645	6,65644	14	6,69723	6,69723
2	6,65668	6,65665	15	6,61661	6,61661
3	6,63029	6,63029	16	6,65975	6,65971
4	6,69598	6,69591	17	6,68437	6,68433
5	6,67657	6,67651	18	6,65347	6,65347
6	6,65965	6,65965	19	6,66127	6,66121
7	6,69136	6,69136	20	6,67742	6,67742
8	6,69031	6,69031	21	6,69618	6,69615
9	6,49857	6,49852	22	6,69556	6,69551
10	6,68462	6,68460	23	6,68616	6,68612
11	6,67045	6,67041	24	6,67326	6,67322
12	6,71082	6,71080	25	6,66117	6,66111
13	6,65093	6,65091			

Fonte: Autora.

Kim e colaboradores (2008) também avaliaram a vedação do microtubo, no entanto, apenas observando visualmente a ocorrência de perda notável de água no recipiente.

A Figura 9 apresenta uma foto de um experimento realizado em 18 posições (poços) de um termociclador com os respectivos microtubos acoplados aos sensores. Outros estudos realizaram a verificação da temperatura em no máximo 13 posições do bloco térmico (KIM, 2008; SCHODER, 2003; 2005).

Figura 9 - Fotografia dos microtubos acoplados aos sensores de temperatura posicionados em 18 poços no bloco térmico de um termociclador.



Fonte: Autora.

Alguns fabricantes de termocicladores desenvolveram equipamentos para verificação de temperatura (Sistema de Verificação de Temperatura da *Applied Biosystems*TM e Sistema de Validação de Temperatura da *Eppendorf*TM). No entanto, esses equipamentos disponíveis comercialmente possuem um único sensor de temperatura e executam a verificação da temperatura somente por meio de protocolos estáticos, sem analisar o perfil de temperatura do termociclador. Além disso, realizam a verificação da temperatura diretamente nos poços do bloco térmico, fornecendo informações da temperatura do termobloco e não da temperatura na amostra contida no microtubo da reação. Ou ainda, os modelos que realizam a verificação de temperatura com maior número de sensores, não permitem o fechamento da tampa dos termocicladores durante a verificação.

5.2.2 Calibração dos termopares (sensores)

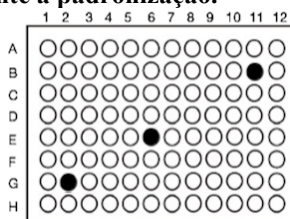
Conforme as exigências metrológicas (CONTROL LAB, 2005), os sensores utilizados para verificação de temperatura nos experimentos foram calibrados e certificados como demonstração da rastreabilidade a padrões nacionais ou internacionais. Dentre os 25 sensores que foram submetidos à calibração, os 18 que apresentaram a menor incerteza de medição foram selecionados para utilização nos protocolos propostos. Os sensores utilizados apresentaram incertezas de medição entre $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$

a $\pm 1,0^{\circ}\text{C}$. Os sensores utilizados por Schoder e colaboradores (2003; 2005) apresentaram incertezas de medição de $\pm 0,3^{\circ}\text{C}$. Em nosso estudo, todos os resultados dos ensaios foram apresentados com a correção dos valores de medição.

5.2.3 Análise da reprodutibilidade nos experimentos

Inicialmente a verificação de temperatura foi realizada em apenas três posições do bloco térmico, conforme a Figura 10.

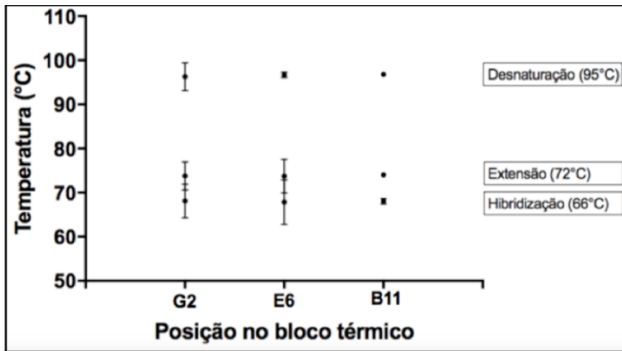
Figura 10 - Representação esquemática das 3 (três) posições avaliadas do bloco térmico durante a padronização.



Os círculos preenchidos em preto destacam as posições do bloco térmico que receberam os microtubos adaptados. Fonte: Autora.

O ensaio referente ao protocolo que mimetiza os ciclos térmicos de uma PCR foi realizado em dois dias consecutivos. Durante os dois ensaios foram utilizados os mesmos microtubos adaptados com os mesmos sensores, o mesmo volume de reação, o mesmo termociclador e as mesmas posições do bloco térmico foram verificadas. Os resultados estão resumidos na Figura 11.

Figura 11 - Reprodutibilidade das medidas de temperatura em diferentes posições do bloco térmico em temperaturas que mimetizam uma PCR.



Os resultados são expressos como temperatura média \pm desvio padrão durante os 31 ciclos do protocolo na posição e etapa em questão. Fonte: Autora.

Na etapa de desnaturação (95°C) a posição B11 apresentou como temperatura média 96,8°C, tanto no 1° quanto no 2° dia de ensaio. A posição E6 apresentou como temperatura efetiva 96,6°C. E a posição G2 apresentou como temperatura efetiva 96,2 \pm 0,3°C.

A etapa da PCR que apresentou os maiores desvios padrão (SD) foi a 66°C (etapa de hibridização) com SD de 0,6°C e 0,4°C nas posições E6 e G2, respectivamente.

Na etapa de extensão (72°C) a posição B11 apresentou como temperatura média 74,0°C, tanto no 1° quanto no 2° dia de ensaio. As posições E6 e apresentaram SD de 0,4°C e 0,4°C, respectivamente.

A posição B11 apresentou os menores valores de SD em todas as fases (desnaturação, hibridização e extensão) da PCR, comparada às demais posições verificadas no bloco térmico (E6 e G2).

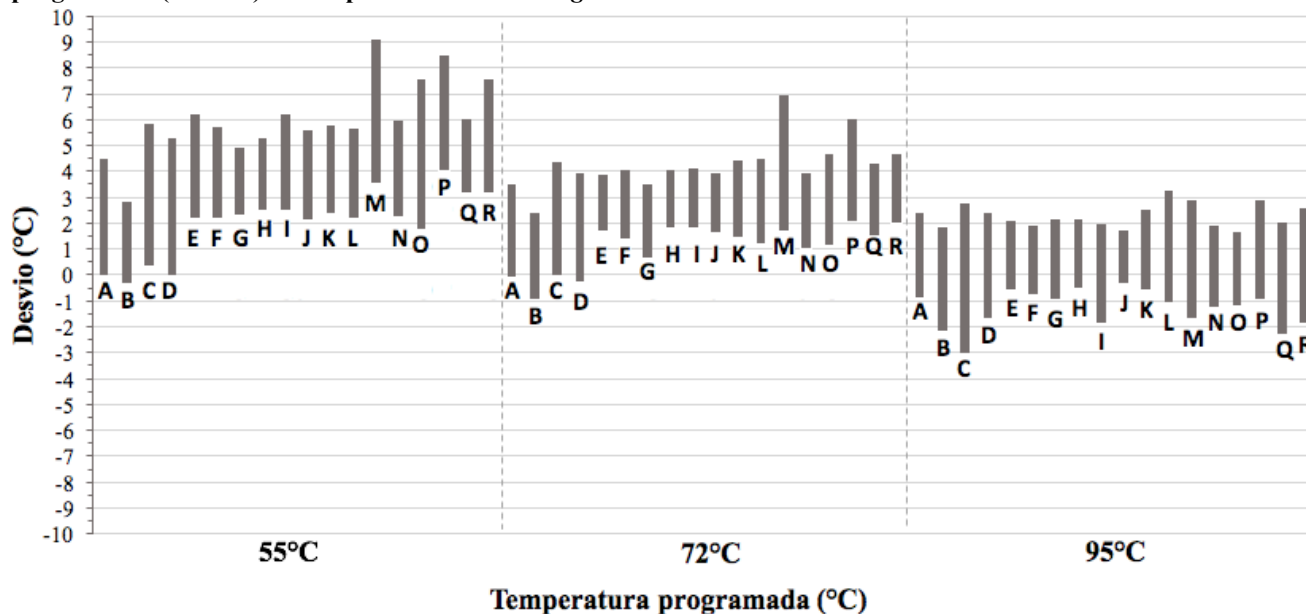
5.2.4 Aplicação do método

5.2.4.1 Protocolo de verificação da temperatura estática

5.2.4.1.1 Influência espacial

Os termocicladores dispuseram de 300 segundos para estabelecer a uniformidade de temperatura. No instante t_{300s} , a UBver foi calculada e comparada à uniformidade do bloco informada pelo fabricante (Figura 12 e Apêndice E).

Figura 12 - Uniformidade da temperatura do bloco térmico verificada (UBver°C) e desvio da temperatura programada (Dv ±°C) 300 s após o início do *timing*.



A UBver°C descreve a diferença entre Tmáx°C e Tmín°C (comprimento da barra). O desvio da temperatura programada (Dv ±°C) é a diferença entre a Tver°C e a Tpro°C ($D_{valto} = T_{máx}°C - T_{pro}°C$, representado pelo lado superior da barra; $D_{vbaixo} = T_{mín}°C - T_{pro}°C$, o lado inferior da barra). Fonte: Autora.

A uniformidade térmica avalia a homogeneidade da temperatura no bloco térmico. A uniformidade de temperatura do bloco térmico, informada pelo fabricante, variou de $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ a $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, após determinado período de tempo (10 a 30 s) a 95°C . Todos os 18 termocicladores verificados apresentaram um valor de UBver que excedeu o fornecido pelo fabricante, ou seja, apresentaram uniformidade térmica no termobloco pior que a declarada.

A melhor UBver foi apresentada pelo termociclador J ($2,0^{\circ}\text{C}$) durante a etapa com temperatura programada de 95°C . A melhor UBver em outro estudo que comparou 6 termocicladores nesta mesma temperatura foi de $0,3^{\circ}\text{C}$ em um termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) (SCHODER et al., 2005). Por outro lado, a pior UBver foi apresentada pelo termociclador O ($5,7^{\circ}\text{C}$) durante a etapa com temperatura programada de 55°C . O estudo de Schoder e colaboradores (2005) encontrou, nesta mesma temperatura, a pior UBver de $0,75^{\circ}\text{C}$ em um termociclador Primus 96 (Biotech). Contudo, os termocicladores avaliados por Schoder e colaboradores (2005) foram todos recém adquiridos, ou seja, eram equipamentos novos.

Assim como no estudo de Schoder e colaboradores (2005), as irregularidades de temperatura observadas com a UBver seguiram um padrão com relação a distribuição espacial das posições verificadas no bloco térmico.

Em todos os termocicladores houve uma tendência a temperaturas acima da programada, mesmo 300 segundos após o início do platô, quando temperaturas mais baixas foram utilizadas no bloco térmico (55° e 72°C), apresentando valores positivos de desvio (Dv). Os valores de *Dvalto* foram mais altos em todos os termocicladores a 55°C , conforme representado na Figura 12. Essa tendência à temperatura acima da programada ficou mais evidente no termociclador M (posição A8 do termobloco) que apresentou *Dvalto* de $9,1^{\circ}\text{C}$. Resultados semelhantes foram observados por Schoder e colaboradores (2005), no mesmo instante. No entanto, o *Dvalto* máximo observado naquele estudo foi de $1,25^{\circ}\text{C}$ em um termociclador Eppendorf Mastercycler. Em nosso estudo, o termociclador (N), desta mesma marca, apresentou *Dvalto* de $5,9^{\circ}\text{C}$.

Ao contrário, valores de *Dvbaixo* foram negativos em todos os termocicladores verificados quando temperaturas altas foram utilizadas no bloco térmico (95°C). Este resultado foi mais evidente no

termociclador C (posição H1 do termobloco), com *Dvbaixo* de $-3,0^{\circ}\text{C}$. Estes resultados corroboram os encontrados por Schoder e colaboradores (2005) cujo *Dvbaixo* mais evidente foi de $-1,6^{\circ}\text{C}$. O termociclador Eppendorf Mastercycler (N) apresentou *Dvbaixo* de $-1,3^{\circ}\text{C}$ em nosso estudo e $-0,75^{\circ}\text{C}$ naquele.

As temperaturas das posições internas e posições externas do bloco térmico foram comparadas, conforme indicado na Figura 6. As posições A2, A4, A6, A8, A10, A12, H1, H3, H5, H7, H9 e H11 foram consideradas linhas externas no bloco térmico, e as posições D1, D3, D5, E7, E9 e E11 como linhas internas do bloco térmico. Em 14 dos 18 termocicladores avaliados, a temperatura efetiva média das posições internas (linhas D e E) apresentou-se mais elevada que aquelas das posições externas (linhas A e H). Para todos os termocicladores avaliados a temperatura efetiva média nos poços localizados na linha H do bloco térmico apresentou-se sempre menor que as demais linhas. Somente em 4 (quatro) dos termocicladores avaliados (L, N, P e Q) a temperatura efetiva média entre os poços localizados na linha A do bloco térmico apresentou-se maior que as demais.

Em se tratando da $T_{\text{mín}}^{\circ}\text{C}$, tanto a 95°C quanto a 72°C , todos os termocicladores verificados apresentaram a temperatura mínima na linha inferior do bloco térmico. Entretanto, quando a 55°C , dez (10) termocicladores apresentaram a temperatura mínima na linha inferior, enquanto os demais (oito) na linha superior (termocicladores E, F, G, H, I, J, K, L). Schoder e colaboradores (2005) relataram que as temperaturas mínimas foram encontradas nas posições externas do termobloco, no entanto, não especificam se nas linhas (superior e/ou inferior) e/ou colunas (1ª e/ou 12ª coluna) externas.

Quando a 95°C , a $T_{\text{máx}}^{\circ}\text{C}$ foi observada na linha central em 15 termocicladores, e na linha superior em apenas três (3) equipamentos (termocicladores G, M e R). E quando a 72°C e a 55°C , a $T_{\text{máx}}^{\circ}\text{C}$ foi observada na linha central em 14 termocicladores, e na linha superior em apenas quatro (4) equipamentos (termocicladores L, M, N e O). Da mesma forma, Schoder e colaboradores (2005) relataram que as temperaturas máximas foram encontradas nas posições centrais do termobloco, no entanto, não especificam as posições.

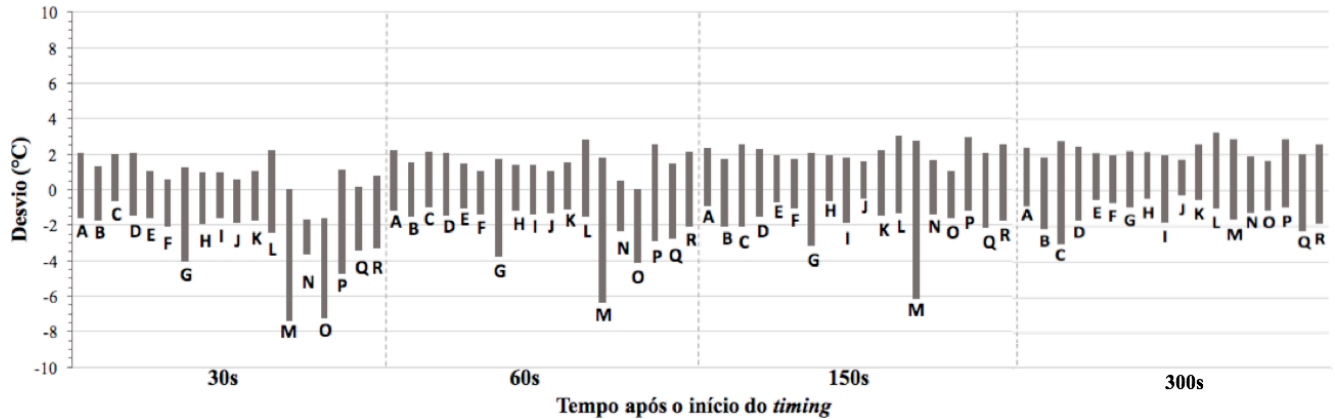
5.2.4.1.2 Influência temporal na temperatura de 95°C

Em oito (8) termocicladores foi observada melhora na UBver no platô de t_{30s} a t_{300s} (termocicladores A, G, H, J, M, O e P). A UBver melhorou entre $0,3^{\circ}\text{C}$ (H) a 3°C (M). Destaca-se o termociclador M que apresentou melhora na uniformidade térmica do bloco de 3°C entre o instante t_{30s} , com UBver de $7,5^{\circ}\text{C}$, e o instante t_{300s} , com UBver de $4,5^{\circ}\text{C}$ (Figura 13). Entretanto, este valor de UBver continuou discrepante da UBfab que é de $0,4^{\circ}\text{C}$ (Apêndice E).

Cinco termocicladores mantiveram a UBver (termocicladores D, E, F, K e R) e cinco (5) equipamentos tiveram a uniformidade do bloco térmico diminuída no decorrer do platô (termocicladores B, C, I, N e Q).

Schoder e colaboradores (2005) consideraram uma melhora na uniformidade térmica do bloco entre os instantes zero e 60 segundo após o início do *timing*. Em nosso estudo, não foi considerado o instante zero, pois oito (8) termocicladores apresentaram *overshooting*, fenômeno comumente ocorrido em equipamentos termoreguláveis.

Figura 13 - Influência temporal sobre a uniformidade do bloco verificada (UBVer).



Influência temporal sobre a uniformidade do bloco verificada (UBVer) e desvio da temperatura programada ($Dv \pm ^\circ\text{C}$) nos instantes de 30 (t_{30s}), 60 (t_{60s}), 150 (t_{150s}) e 300 (t_{300s}) segundos após o início do *timing* a 95°C . A uniformidade do bloco verificada (UBVer) descreve a diferença entre $T_{\text{máx}}^\circ\text{C}$ e $T_{\text{mín}}^\circ\text{C}$ (comprimento da barra). O desvio da temperatura programada ($Dv \pm ^\circ\text{C}$) é a diferença entre a $T_{\text{ver}}^\circ\text{C}$ e a $T_{\text{pro}}^\circ\text{C}$ ($D_{\text{valto}} = T_{\text{máx}}^\circ\text{C} - T_{\text{pro}}^\circ\text{C}$, representado pelo lado superior da barra; $D_{\text{vbaiço}} = T_{\text{mín}}^\circ\text{C} - T_{\text{pro}}^\circ\text{C}$, lado inferior da barra). Fonte: Autora.

5.2.4.2 Protocolo que mimetiza os ciclos térmicos de uma PCR

Para avaliar o perfil dos ciclos térmicos dos termocicladores foi realizado o protocolo que mimetiza uma PCR. O perfil de temperatura dos termocicladores analisados foi classificado em normal, com *overshooting* e curvo (Tabela 3 e Figura 14).

A duração efetiva das etapas foi considerada como o período de tempo (em segundos) em que a temperatura foi mantida pelo termociclador entre $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ da temperatura programada. Esse parâmetro demonstra a razoabilidade da fidelidade de cada equipamento em atingir a temperatura específica da etapa e estabilizar, bem como a precisão.

Embora tenham sido utilizados os termos *overshooting* e *undershooting* para classificar os termocicladores com diferentes perfis de temperatura, não há consenso na literatura sobre as definições. Kim e colaboradores (2008) definem como momentâneas flutuações acima (*overshooting*) ou abaixo (*undershooting*) das temperaturas programadas no início de uma nova etapa da PCR. Enquanto Schoder e colaboradores (2005) consideram como tendência a *overshooting* e *undershooting* quando existe desvio acima ou abaixo da temperatura programada, respectivamente. Em nosso estudo utilizamos a definição de Kim e colaboradores (2008).

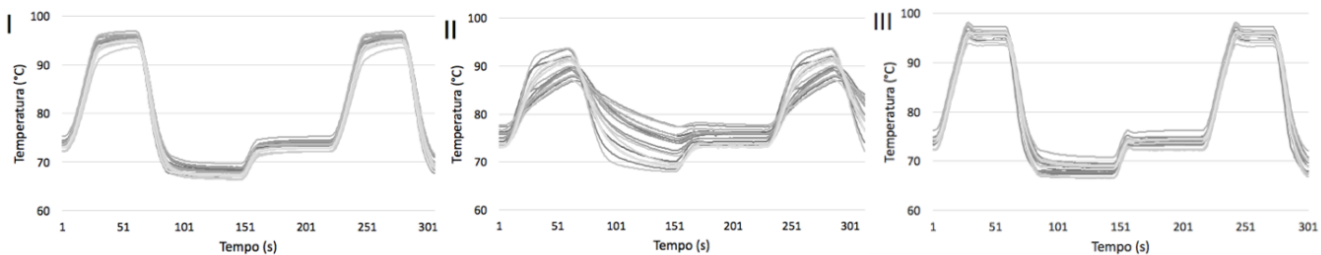
Idealmente, os termocicladores deveriam apresentar o perfil normal de temperatura (Figura 14-I) no qual a temperatura muda de forma linear até atingir a etapa específica da PCR e permanece constante durante toda a etapa. Contudo, dos 18 termocicladores, a maioria (14) apresentou algum tipo de distorção no seu perfil de temperatura. Da mesma forma, no estudo de Kim e colaboradores (2008) 16 de 19 termocicladores apresentaram distorções nos perfis de temperatura.

Dos 18 termocicladores avaliados somente quatro (4) apresentaram perfil normal (Tabela 3). No entanto, os 18 termocicladores apresentaram alterações de temperatura em algum momento dos ciclos, ou seja, durante os platôs ou durante o aquecimento e/ou resfriamento. Esses resultados também foram encontrados por Kim e colaboradores (2008).

Seis (6), dos 18 termocicladores avaliados, apresentaram uma mudança lenta de temperatura até o início de uma nova etapa da PCR, encurtando consideravelmente a duração efetiva da etapa ou até mesmo não produzindo platô (perfil curvo) (Figura 14-II). Enquanto em nosso

estudo 1/3 dos termocicladores apresentaram perfil curvo, no estudo de kim e colaboradores (2008) este perfil foi observado em 2/3 dos equipamentos. Dois termocicladores que apresentaram perfil curvo de temperatura no estudo de Kim e colaboradores (2008) demonstraram o mesmo perfil no presente estudo (N).

Figura 14 - Representação dos perfis de temperatura.



(I) Perfil normal. (II) Perfil curvo. (III) Perfil com *overshooting*. Os perfis são representativos dos termocicladores A, O e D, respectivamente. Fonte: Autora.

Tabela 3 - Perfil de temperatura, temperatura e duração efetivas nas etapas da PCR nos 18 termocicladores.

Termociclador	Perfil*	Desnaturação (95°C por 30 s)		Hibridização (66°C por 60 s)		Extensão (72°C por 60 s)	
		Temperatura efetiva (°C)±SD	Duração da etapa (s)±SD	Temperatura efetiva (°C)±SD	Duração da etapa (s)±SD	Temperatura efetiva (°C)±SD	Duração da etapa (s)±SD
A	n	95,0±0,9	13,7±9,1	68,1±0,9	6,2±7,3	73,3±0,8	12,0±20,0
B	n	94,8±0,9	14,3±9,6	67,7±0,9	6,2±16,8	73,0±0,7	10,6±18,0
C	o	95,3±1,2	9,5±10,8	69,0±1,5	7,5±18,1	74,0±1,1	9,9±22,4
D	o	95,4±1,1	8,1±10,0	68,5±1,2	6,2±14,5	73,7±1,0	10,0±22,9
E	n/o	94,5±0,6	13,4±8,0	70,2±0,9	0,0±0,0	74,6±0,6	0,0±0,1
F	n/o	94,1±0,7	11,0±9,6	70,2±1,0	0,0±0,0	74,5±0,7	0,1±0,1
G	n/o	94,1±1,0	8,6±9,0	70,4±2,1	0,0±0,0	74,7±1,6	0,2±0,4
H	n/o	94,5±0,8	11,1±8,5	70,3±1,0	0,0±0,0	74,8±0,8	0,0±0,0
I	n/o	94,3±0,8	10,5±8,8	70,0±0,9	0,0±0,0	74,5±0,7	0,0±0,1
J	n/o	94,4±0,7	10,7±7,7	70,1±0,9	0,0±0,0	74,6±0,7	0,0±0,0
K	n	94,1±0,7	9,7±7,8	69,9±0,9	0,0±0,0	74,3±0,6	0,9±1,6
L	n	95,4±1,1	6,8±7,6	69,9±1,2	0,0±0,0	74,7±1,0	0,7±2,6
M	c	90,7±1,2	0,9±1,6	75,3±1,9	0,0±0,0	76,2±1,2	0,0±0,1
N	c	88,7±0,7	0,3±0,4	73,2±1,4	0,0±0,0	73,8±0,6	4,7±1,6
O	c	87,7±2,6	0,3±0,5	75,2±3,7	0,0±0,0	75,0±1,6	0,3±0,7
P	c	92,1±1,2	3,6±3,6	73,7±1,3	0,0±0,0	75,3±1,0	1,0±1,5
Q	c	91,3±1,5	2,1±3,1	72,2±1,8	0,0±0,0	74,3±0,9	3,0±2,0
R	c	90,2±0,2	2,0±3,2	73,6±1,7	0,0±0,0	74,3±0,7	3,6±2,2

A temperatura efetiva e a duração de cada etapa são apresentadas como média ± SD dos 31 ciclos avaliados nas 18 posições. *Perfil de temperatura: n, normal; c, curvo; o, com *overshooting*; n/o, normal com algumas posições do termociclador com *overshooting*.

Em nosso estudo, por exemplo, na etapa de hibridização, programada para ocorrer a 66°C por 60 segundos, nenhum dos termocicladores com perfil curvo de temperatura produziu platô (identificado pelo valor zero na coluna duração na Tabela 3). Já nas etapas de desnaturação e extensão, programadas para ocorrer a 95°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos, respectivamente, houve formação do platô, porém de forma reduzida.

Dois, dentre os 18 termocicladores avaliados, apresentaram perfil com *overshooting* nas etapas da PCR que necessitam de aumento da temperatura (desnaturação e extensão). Ou seja, antes de estabilizar na etapa de desnaturação ou extensão, o termociclador atinge uma temperatura superior à programada (termocicladores C e D, Tabela 3 e Figura 14-III). Kim e colaboradores (2008) também encontraram um, dos 19 termocicladores, com perfil de temperatura com *overshooting*.

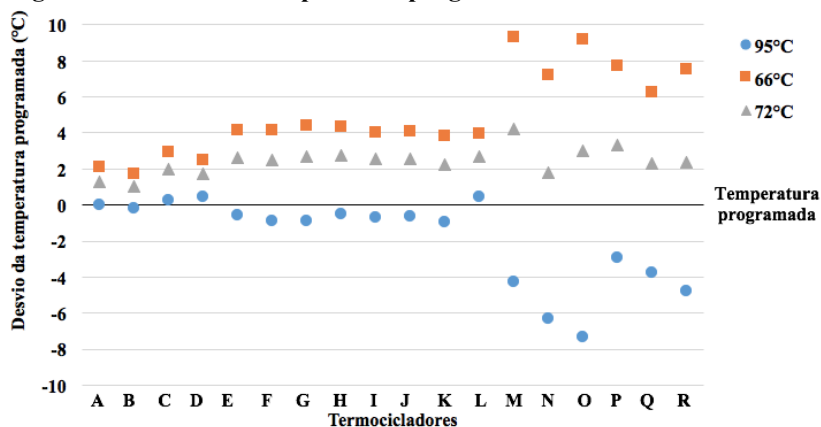
Seis (6) termocicladores avaliados demonstraram perfil normal de temperatura em todas as posições verificadas, exceto as posições A4 e A8 que apresentaram *overshooting* (termocicladores E, F, G, H, I e J, Tabela 3).

Uma vez que todos os termocicladores apresentaram temperatura média efetiva acima da programada na etapa de hibridização (Tabela 3), a única etapa da PCR que necessita de resfriamento de temperatura, nenhum termociclador apresentou o perfil *undershooting*. Todavia, Kim e colaboradores (2008) encontraram um termociclador com perfil de temperatura com *undershooting*.

Contudo, o sistema de resfriamento dos termocicladores avaliados em nosso estudo provavelmente não foi suficiente, pois a temperatura efetiva executada não alcançou a programada na etapa de hibridização, e conseqüentemente não houve *undershooting*.

Na Figura 15 é possível observar, de outra forma e mais claramente, os desvios em °C da temperatura programada, ou seja, quanto a temperatura efetiva média dos termocicladores diferiu da temperatura programada em cada etapa da PCR. Assim, ficou evidente que quando se trata da etapa de desnaturação (95°C - em azul) os equipamentos apresentaram temperaturas efetivas mais próximas da programada (termocicladores A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K e L) ou abaixo desta (termocicladores M, N, O, P, Q e R). Esses resultados corroboram os de Kim e colaboradores (2008).

Figura 15 - Desvio da temperatura programada.



Representação da diferença em °C entre a temperatura efetiva média e a temperatura programada em cada etapa da PCR dos 18 termocicladores (A a R). Desnaturação a 95 °C (azul), Hibridização a 66 °C (alaranjado) e extensão a 72 °C (cinza). Fonte: Autora.

Em se tratando das etapas de hibridização (66°C - em alaranjado) e de extensão (72°C - em cinza), as temperaturas efetivas dos termocicladores ultrapassam a temperatura programada, sobretudo na etapa de hibridização (66 °C). Nesta etapa, 10 dos 19 termocicladores avaliados por Kim e colaboradores (2008) apresentaram temperaturas efetivas acima da programada (60 °C).

Os termocicladores podem ser agrupados entre os que apresentaram desvio (diferença entre a temperatura efetiva e a temperatura programada) de até 3°C (termocicladores A, B, C e D), entre 3,1 e 4,4°C (termocicladores E, F, G, H, I, J, K e L) em entre 4,5 e 9,3°C (termocicladores M, N, O, P, Q e R). No estudo de Kim e colaboradores (2008) o maior desvio foi de 7,2°C da temperatura programada.

Na etapa de hibridização, cuja duração programada foi de 60 s, quatro (4) termocicladores apresentaram duração efetiva máxima de 7,5 s, ou seja, a temperatura foi mantida entre $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ da temperatura programada pelo tempo máximo de 7,5 s. Para os demais 14 termocicladores a duração efetiva da etapa de hibridização foi de zero segundos, pois não mantiveram a temperatura entre $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ da

temperatura programada ou não resfriaram o suficiente para atingir tal temperatura ou simplesmente não formaram platô. Em um estudo anterior, a duração efetiva desta etapa variou de um (1) a 17,5 s quando programados 20 s (KIM et al., 2008).

Na etapa de desnaturação, cuja duração programada foi de 30 s, 11 termocicladores apresentaram duração efetiva de no máximo 10 s. No estudo de Kim e colaboradores (2008), cuja etapa foi programada para 20 s, a duração máxima observada foi de 18,2 s e a mínima de zero s.

Na etapa de extensão, cuja duração programada foi de 60 s, 15 termocicladores apresentaram duração efetiva de no máximo 10 s. Contrastando, no estudo de Kim e colaboradores (2008) apenas três (3) apresentaram duração efetiva máxima de 10 s quando a programada era de 20 s.

Entre os termocicladores com perfil normal de temperatura, o melhor e o pior desempenho apresentado foi executar, respectivamente, 48% (termociclador B) e 23% (termociclador L) da duração programada na etapa de desnaturação, 10% (termocicladores A e B) e 0% (termocicladores K e L) na etapa de hibridização, e 20% (termociclador A) e 1% (termociclador L) na etapa de extensão.

O melhor e o pior desempenho apresentado pelos termocicladores com perfil curvo de temperatura foi executar, respectivamente, 12% (termociclador P) e 1% (termocicladores N e O) da duração programada na etapa de desnaturação, e 8% (termociclador N) e 0% (termociclador M) da etapa de extensão. Nenhum dos termocicladores executou a temperatura de hibridização.

Entre os termocicladores com perfil com *overshooting*, o melhor e o pior desempenho apresentado foi executar, respectivamente, 48% (termociclador E) e 27% (termociclador D) da duração programada na etapa de desnaturação, 13% (termociclador C) e 0% (termocicladores E, F, G, H, I e J) na etapa de hibridização, e 17% (termociclador D) e 0% (termocicladores E, F, G, H, I e J) na etapa de extensão.

Embora os termocicladores A, B, C e D sejam do mesmo fabricante e também do mesmo modelo (Tabela 4), apresentaram perfis diferentes de temperatura. Os termocicladores A e B apresentaram perfil normal, enquanto os termocicladores C e D apresentaram perfil com *overshooting*.

Tabela 4 - Especificações técnicas dos termocicladores e desempenho da PCR-controle.

Termociclador	Perfil*	Desempenho	Fabricante/ Modelo	Taxa máxima de aquecimento/ resfriamento (°C/s)**
A	n	Bom	Applied/2720	2,6/2,6
B	n	Bom		
C	o	Bom		
D	o	Bom		
E	n/o	Ruim	Applied/Veriti	3,35/2,8
F	n/o	Ruim		
G	n/o	Ruim		
H	n/o	Ruim		
I	n/o	Ruim		
J	n/o	Ruim		
K	n	Ruim		
L	n	Ruim	Thermo Hybaid/Px2	3,0/2,0
M	c	Ruim	Bio Rad/C1000	5,0/5,0
N	c	Ruim	Eppendorf/Martercycler	3,0/2,0
O	c	Ruim	Bioer/Life Eco	2,0/1,7
P	c	Ruim	Biocycler/MJ96+/MJ96G	3,0/2,0
Q	c	Ruim		
R	c	Ruim		

Especificações técnicas dos termocicladores e desempenho da PCR-controle. *Perfil de temperatura: n, normal; c, curvo; o, com *overshooting*; n/o, normal com algumas posições do termociclador com *overshooting*. **Valores fornecidos pelos fabricantes. Fonte: Autora.

No entanto, perfis curvos de temperatura foram observados em todos os termocicladores do fabricante Biocycler modelo MJ96+/MJ96G (termocicladores P, Q e R, Tabela 4). Assim como todos os termocicladores do modelo Veriti (fabricante Applied Biosystems) apresentaram perfil com *overshooting* de temperatura em determinada

posição (A4 e/ou A8) e perfil normal de temperatura nas demais posições verificadas.

Assim como encontrado por Kim e colaboradores (2008), o perfil curvo de temperatura foi observado principalmente em modelos com taxas baixas de aquecimento/resfriamento declaradas pelos fabricantes (modelo Life Eco, 2.0/1.7°C/s e modelos Mastercycler e MJ96+/MJ96G, 3.0/2.0 °C/s, Tabela 4).

A variação na temperatura entre as posições dentro de um bloco térmico é outro parâmetro importante do desempenho de um termociclador, pois pode influenciar a homogeneidade dos resultados dos ensaios de PCR.

Com relação à variação de temperatura entre as posições no bloco térmico, todos os termocicladores avaliados apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$; Anova) entre todas as posições verificadas em todas as etapas da reação. A maior variação entre as posições do bloco térmico foi de 8,9°C no termociclador M. Esses resultados reforçam os de Kim e colaboradores (2008) que relataram diferenças de até 5°C entre as posições de um mesmo termociclador. O termociclador A, por exemplo, apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$; Anova) entre todas as posições verificadas na etapa de hibridização, com poucas exceções como a indiferença entre as posições E7 e A2 e D1, H9 e A12 e H11, A10 e H5, bem como entre as posições A8 e D5. Essas exceções não são facilmente interpretadas e podem explicar porque outros autores (KIM et al., 2008; SCHODER et al., 2003; 2005) não realizaram, ou pelo menos não mencionaram, análises estatística desses dados.

Agrupando termocicladores do mesmo modelo, os mesmos diferiram quanto a temperatura efetiva executada em 18 das 18 posições do bloco térmico ($p < 0,05$; Anova). Tais diferenças mostraram-se maiores durante a etapa de hibridização. Nesta etapa, os equipamentos J e F do modelo Veriti (Applied Biosystems) apresentaram uma variação de até 1,8°C entre a mesma posição do bloco térmico (posição A4), enquanto os equipamentos B e C do modelo 2720 (Applied Biosystems) apresentaram uma variação de até 3°C entre a mesma posição do bloco térmico (posição E9), e os equipamentos Q e R do modelo MJ96+/MJ96G (Biocycler) apresentaram uma variação de até 4,6°C entre a mesma posição do bloco térmico (posição H3). Kim e colaboradores (2008) também relataram diferenças entre equipamentos da mesma marca/modelo, em mesma posição, de até 5°C.

Em relação às variações de temperatura intraposição, observou-se que o desvio padrão da temperatura efetiva intraposição foi de 0,01 a 2,93°C entre os diferentes modelos de termociclador (Tabela 5).

Tabela 5 - Variação da temperatura efetiva média intraposição no bloco térmico.

Termociclador	Variação mínima intraposição (°C)	Variação máxima intraposição (°C)
A	0,03	0,25
B	0,05	0,28
C	0,04	0,48
D	0,04	0,44
E	0,01	0,65
F	0,04	0,50
G	0,03	0,47
H	0,02	0,73
I	0,02	0,48
J	0,03	0,67
K	0,03	0,89
L	0,03	0,82
M	0,02	1,28
N	0,05	1,96
O	0,03	2,00
P	0,04	2,93
Q	0,04	1,39
R	0,05	1,79

Fonte: Autora.

Houve discrepância entre as taxas de aquecimento e resfriamento fornecidas pelos fabricantes e as efetivamente verificadas. Todas as taxas de aquecimento observadas foram mais baixas que as declaradas pelos fabricantes (Tabela 4). Durante a etapa de desnaturação, os termocicladores C, D, E, F, G, H, I e J apresentaram taxa de aquecimento de 0,8 a 1,0°C/s. Os termocicladores A, B, L e M apresentaram uma taxa de aquecimento de 0,6 a 0,7°C/s, e os termocicladores N, O, P, Q e R de 0,3 a 0,5°C/s. De acordo com as taxas de aquecimento verificadas, os termocicladores levariam em média de

23 a 77 segundos para atingir a temperatura programada da etapa de desnaturação (95°C) ao finalizar a etapa de extensão (72°C). Todas as taxas de resfriamento observadas também foram mais baixas que as declaradas pelos fabricantes. Durante a etapa de hibridização, os termocicladores E, F, G, H, I e J apresentaram taxa de resfriamento de 1,0 a 1,1°C/s. Os termocicladores A, B, C e D apresentaram uma taxa de resfriamento de 0,8 a 0,9°C/s, e os termocicladores L, N, O, P, Q e R de 0,3 a 0,5°C/s. De acordo com as taxas de resfriamento verificadas, os termocicladores levariam em média de 26 a 97 segundos para atingir a temperatura programada da etapa de hibridização (66°C) ao finalizar a etapa de desnaturação (95°C). Contudo, as taxas de aquecimento e resfriamento fornecidas pelos fabricantes representam os limites máximos e não necessariamente as taxas efetivamente executadas por estes. Logo estes valores não podem ser exigidos dos fabricantes, pois os mesmos não definem a taxa mínima de aquecimento e resfriamento.

5.3 Verificação do termociclador por meio de uma *PCR*-controle realizada com *kit* comercial

A *PCR*-controle foi realizada com o *kit* controle comercial Microzone[®] (Reino Unido). Esta *PCR* foi desenvolvida de forma a reagir ao controle incorreto da temperatura. A amplificação é alterada e indicada com padrão de banda diferente para as diferenças de temperatura de mais de 2°C.

Para a realização desta *PCR* multiplex executou-se o protocolo estabelecido pelo fabricante. Todas as etapas da *PCR*-controle foram realizadas pelo mesmo pesquisador no mesmo laboratório, com os mesmos instrumentos e reagentes para revelação. A única diferença entre as *PCR*-controle era o termociclador.

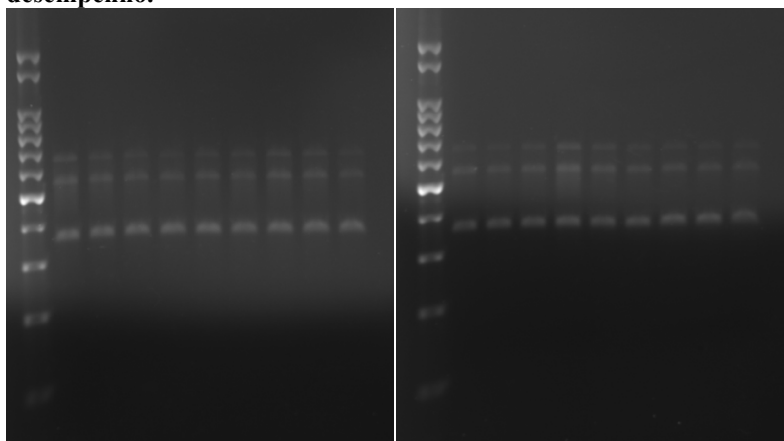
A análise dos produtos da *PCR* e a interpretação dos dados foram realizadas por comparação dos padrões de bandas observando-se a presença ou ausência dos produtos de amplificação com o tamanho esperado e intensidade, conforme esquematizado na Figura 7.

Os resultados da *PCR*-controle foram classificados, de acordo com o padrão de bandas apresentado em desempenho bom e ruim. Dos 18 termocicladores verificados, somente quatro (4) apresentaram bom desempenho na *PCR*-controle (termocicladores A, B, C e D). Os 14

termocicladores restantes apresentaram desempenho ruim na PCR-controle.

A Figura 16 demonstra o resultado do padrão de bandas apresentado pelo termociclador D, representativo dos termocicladores com bom desempenho na PCR-controle. Todas as canaletas apresentaram as três bandas visíveis em diferentes intensidades; banda superior (650pb), banda intermediária (550bp) e banda inferior (360pb).

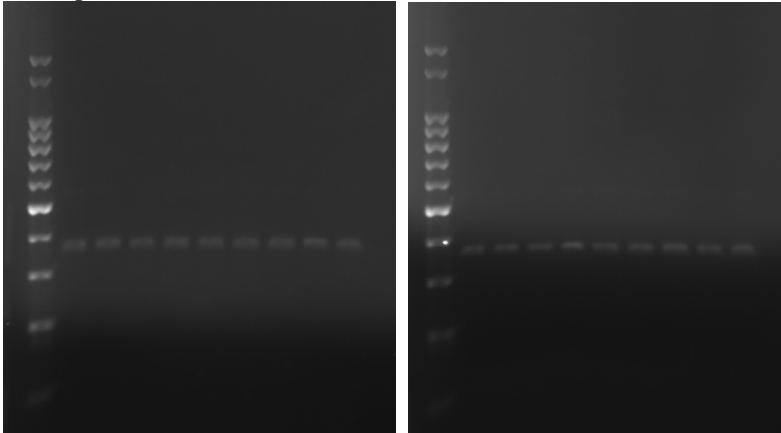
Figura 16 - Resultado da PCR-controle em um termociclador com bom desempenho.



M A2 A4 A6 A8 A10 A12 D1 D3 D5 M E7 E9 E11 H1 H3 H5 H7 H9 H11
A avaliação do desempenho dos termocicladores foi realizada nas 18 posições pré-estabelecidas utilizando-se a PCR-controle. M = marcador de tamanho molecular de 100pb (Ludwig Biotec[®]), A2 a H11 = bandas da PCR-controle. Gel ilustrativo obtido com o termociclador D (representativo dos termocicladores com bom desempenho). Fonte: Autora.

A Figura 17 demonstra o resultado do padrão de bandas apresentado pelo termociclador O, representativo dos termocicladores com desempenho ruim na PCR-controle, que apresentaram somente a banda inferior (360pb). Indicação de que o termociclador não atingiu a temperatura de hibridização, pois não resfriou o suficiente. Esse resultado indica equipamento com funcionamento inadequado.

Figura 17 - Resultado da PCR-control em um termociclador com desempenho ruim.



M A2 A4 A6 A8 A10 A12 D1 D3 D5 M E7 E9 E11 H1 H3 H5 H7 H9 H11

A avaliação do desempenho dos termocicladores foi realizada nas 18 posições pré-estabelecidas utilizando-se a PCR-control. M = marcador de tamanho molecular de 100pb (Ludwig Biotec[®]), A2 a H11 = bandas da PCR-control. Gel ilustrativo obtido com o termociclador O (representativo dos termocicladores com desempenho ruim). Fonte: Autora.

Enquanto em nosso estudo aproximadamente 80% dos termocicladores apresentaram desempenho ruim na eficiência de amplificação, este número foi de 63% e 33%, respectivamente, no estudo de Kim e colaboradores (2008) e Schoder e colaboradores (2005).

O modelo do termociclador N (Mastercycler - Eppendorf) apresentou desempenho ruim tanto em nosso estudo quanto no de Kim e colaboradores (2008). Entretanto, o mesmo modelo apresentou bom desempenho no estudo de Schoder e colaboradores (2005). Contudo, os três controles utilizados nos três estudos são diferentes. No estudo de kim e colaboradores (2008) foi utilizado um outro kit desenvolvido pelo próprio grupo em estudo anterior e no de Schoder e colaboradores (2005) foi utilizada uma PCR-control produzida *in house*.

5.4 Avaliação da relação entre as características do termociclador e sua eficiência de amplificação (desempenho)

Para avaliar se um modelo ou outro se destaca em relação ao desempenho frente à eficiência de amplificação foi avaliada estatisticamente essa relação. Foi observada relação significativa ($p < 0,05$; exato de Fischer) entre os modelos de termociclador e o desempenho apresentado na PCR-controle. Todos os equipamentos do modelo 2720 (Applied Biosystems) demonstraram bom desempenho no resultado da PCR-controle, enquanto os demais apresentaram desempenho ruim.

Quando observadas as taxas máximas de aquecimento e resfriamento fornecidos pelos fabricantes, supunha-se que aqueles com maiores taxas poderiam apresentar os melhores resultados por atingirem as temperaturas programadas mais rapidamente e dessa forma poderiam permanecer mais tempo em cada etapa da reação da PCR. Contudo, foi verificada relação inversa significativa ($p = 0,0487$; Qui Quadrado) entre as taxas máximas de aquecimento fornecidas pelos fabricantes e o desempenho apresentado pelos termocicladores na PCR-controle (Tabela 4). Os termocicladores com taxa máxima de aquecimento fornecida pelo fabricante abaixo de 3°C/s apresentaram bom desempenho na PCR-controle. Exceto o termociclador O que apresentou desempenho ruim, com taxa máxima de aquecimento fornecida pelo fabricante de $2,0^{\circ}\text{C/s}$.

As taxas de resfriamento verificadas apresentaram relação com o desempenho da PCR-controle. Os termocicladores com taxa de resfriamento verificada de $0,8$ a $0,9^{\circ}\text{C/s}$ apresentaram bom desempenho na PCR-controle.

Por outro lado, as taxas de aquecimento e resfriamento verificadas apresentaram relação direta com o perfil de temperatura dos termocicladores. Os equipamentos com perfil curvo de temperatura apresentaram as menores taxas de resfriamento e aquecimento. Esses dados também foram relatados por Kim e colaboradores (2008), no entanto sem análise estatística para confirmação.

Afim de avaliar se a uniformidade do bloco térmico poderia ter influência sobre a eficiência de amplificação foi avaliada estatisticamente essa relação. Por sua vez, a uniformidade do bloco

térmico, fornecida pelos fabricantes ou verificada, não apresentou relação significativa com o desempenho na PCR-controle ou com os modelos de termociclador. Mesmo o termociclador com a melhor UBver (2°C) não apresentou bom desempenho na PCR-controle, pois independentemente de ter apresentado a melhor uniformidade térmica no termobloco, as temperaturas efetivamente executadas foram distintas das programadas e atingir a temperatura programada é mais relevante.

Conforme apresentado anteriormente, as irregularidades de temperatura observadas com a UBver seguiram um padrão com relação a distribuição espacial das posições verificadas no bloco térmico. Sendo assim, foi verificado se há relação significativa entre a influência espacial e os modelos de termocicladores.

Quando testados a 95°C, todos os termocicladores apresentaram a temperatura mínima na linha inferior do bloco térmico. Já a temperatura máxima foi observada na linha superior (termocicladores G, M e R) ou na linha central, sem relação com os modelos de termocicladores. Não foi observada relação significativa a 95°C entre os modelos de termocicladores e a influência espacial entre as colunas do termobloco.

Quando testados a 55°C foi observada relação significativa ($p=0,0323$; Qui Quadrado) entre os modelos e a influência espacial na temperatura do termobloco. Para o modelo Veriti (Applied Biosystems) a temperatura mínima apresentou-se na linha superior do termobloco e para o modelo 2720 (Applied Biosystems) na linha inferior. Com relação às diferentes colunas, quando testados a 55°C foi observada relação significativa ($p=0,0028$; Qui Quadrado) entre os modelos de termocicladores e a influência espacial na temperatura do termobloco. Para o modelo 2720 (Applied Biosystems) a temperatura mínima apresentou-se na coluna nº1 do bloco térmico e para o modelo Veriti (Applied Biosystems) na coluna nº10. Quando testados a 55°C não foi observada influência significativa dos modelos dos termocicladores sobre a localização (posição) da temperatura máxima, que foi observada tanto na linha superior quanto na linha central dos termoblocos. No entanto, todos os equipamentos do fabricante Biocycler apresentaram a temperatura máxima na linha central. E quando a 55°C não houve relação significativa entre os modelos e a influência espacial na temperatura máxima do termobloco.

Quando testados a 72°C foi observada relação significativa ($p=0,0120$; Qui Quadrado) entre os modelos de termociclador e a

influência espacial na temperatura do termobloco. Para os modelos dos fabricantes Applied Biosystems (2720, Veriti e SimpliAmp) e Biocycler, a temperatura máxima apresentou-se na linha central. Com relação às diferentes colunas, também foi observada relação significativa ($p=0,0360$; Qui Quadrado). Para todos os modelos do fabricante Applied Biosystems (2720, Veriti e SimpliAmp) a temperatura máxima foi observada na coluna nº 9 do bloco térmico. E quando testados a 72°C todos os termocicladores verificados apresentaram a temperatura mínima na linha inferior do bloco térmico.

Com o intuito de verificar se a uniformidade de temperatura do bloco térmico melhoraria com o tempo, foi pesquisada a associação entre a influência temporal e os modelos de termociclador. Não foi observada relação significativa entre os modelos dos termocicladores e a influência temporal apresentada, independente dos instantes analisados ($t30s$, $t60s$, $t150$ e $t300s$) (Figura 13). Ou seja, independentemente da duração da etapa da PCR programada, a uniformidade térmica do bloco não vai melhorar com o aumento do tempo.

Para todas as etapas da reação (95°C , 66°C ou 72°C), ao avaliar a associação entre os modelos de termocicladores e as temperaturas efetivas médias (Tabela 3), observou-se que não há diferença significativa na temperatura efetiva entre os termocicladores do modelo 2720 (Applied Biosystems) (termocicladores A, B, C e D). No entanto, há diferença significativa dos termocicladores do modelo 2720 (Applied Biosystems) com os termocicladores do modelo Veriti (Applied Biosystems).

Não foi observada diferença significativa nas temperaturas efetivas médias entre si nos termocicladores do modelo Veriti (Applied Biosystems) (termocicladores E, F, G, H, I e J) e entre os Veriti e os do modelo SimpliAmp (Applied Biosystems) (termociclador K).

Contudo, os termocicladores do fabricante Biocycler apresentaram temperaturas efetivas significativamente diferentes entre si ($p<0,05$; Anova).

A temperatura efetiva média do termociclador L (fabricante Thermo Hybaid, modelo Px2) correspondeu à temperatura efetiva média dos termocicladores do modelo 2720 (Applied Biosystems) quando a 95°C , mas foi significativamente diferente desse quando a 66°C e 72°C . Isto é, apesar de ter sido observada associação entre termocicladores de

mesmo modelo, a temperatura média executada do termociclador L foi semelhante a outro modelo (2720).

Não houve associação entre o SD da temperatura efetiva intraposição com o modelo do termociclador. No entanto, o SD intraposição demonstrou associação com a eficiência de amplificação na PCR-controle. O modelo 2720 (Applied Biosystems) foi o que apresentou menor SD da temperatura efetiva intraposição no bloco térmico ($\leq 0,5^{\circ}\text{C}$). Enquanto o modelo MJ96+/MJ96G (Biocycler) foi o que apresentou maior SD da temperatura efetiva intraposição ($> 1,3^{\circ}\text{C}$).

Quando avaliada a associação entre os modelos de termocicladores com as taxas de aquecimento verificadas, observou-se relação significativa ($p=0,0089$; Qui Quadrado). Os equipamentos do fabricante Biocycler (termocicladores P, Q e R) foram os que apresentaram a menor taxa de aquecimento verificada (menor que $0,5^{\circ}\text{C/s}$). Enquanto os equipamentos do fabricante Applied Biosystems do modelo Veriti apresentaram a maior taxa de aquecimento ($0,8$ a $1,0^{\circ}\text{C/s}$).

Foi pesquisada a existência de associação entre as condições de uso dos termocicladores e os seus desempenhos na PCR-controle. Embora todos os termocicladores que apresentaram bom desempenho na PCR-controle tinham até cinco (5) anos de uso e aqueles com mais de cinco (5) anos de uso demonstraram desempenho ruim, não houve relação significativa entre o desempenho na PCR-controle e o tempo de uso dos termocicladores.

Também não houve relação significativa entre o desempenho dos termocicladores na PCR-controle e o tempo de uso semanal (em horas) dos equipamentos, nem mesmo com relação à frequência de limpeza (Tabela 1). Um resultado intrigante foi que diferentemente do esperado, os termocicladores que apresentaram bom desempenho são utilizados semanalmente por mais de 10 horas, enquanto os termocicladores com menos tempo semanal de uso apresentaram desempenho ruim.

Ainda no que diz respeito às condições de uso dos termocicladores, foi observada uma tendência ($p=0,0787$) entre a realização de calibração nos termocicladores e a eficiência de amplificação. Porém, os termocicladores que passaram pelo procedimento de calibração apresentaram desempenho ruim na PCR-controle, o que induz a dúvida de o motivo do procedimento ser realmente manutenção preventiva. É interessante observar que um dos

termocicladores que apresentou temperaturas de hibridização e de extensão acima das programadas já havia sido submetido à manutenção por motivo de superaquecimento no bloco térmico.

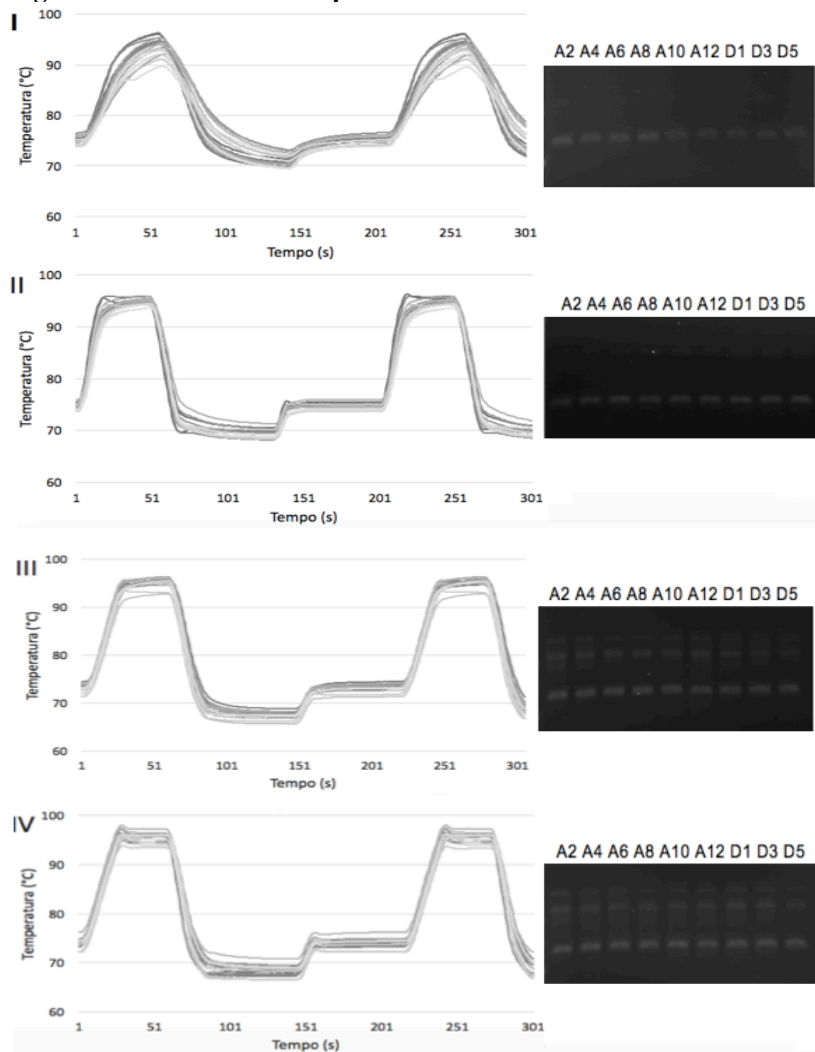
5.5 Avaliação da relação entre os resultados da verificação de temperatura do termociclador e a eficiência de amplificação

As distorções nos perfis de temperatura e os desvios da temperatura e duração programadas não foram desprezíveis, pois resultaram em falhas nos resultados da PCR-controle. A Figura 18 demonstra esta visível associação entre os resultados dos perfis de temperatura com o resultado da PCR-controle. Dentre os 18 termocicladores avaliados, somente quatro (4) apresentaram o padrão de bandas esperado para um termociclador funcionando corretamente, no qual os três fragmentos estão presentes em diferentes intensidades (termocicladores A, B, C e D). Já os 14 termocicladores restantes apresentaram padrão de bandas característicos de funcionamento incorreto, no qual a banda intermediária se apresenta fraca e a banda superior ainda mais fraca (ou nem visível), indicando que o termociclador não atinge a temperatura de hibridização, pois não apresenta resfriamento suficiente para atingir a temperatura desejada.

Os termocicladores A e B, com perfil normal, embora tenham executado a temperatura efetiva da etapa de hibridização acima da programada, apresentaram um bom resultado na PCR-controle. Da mesma forma, os termocicladores C e D, apesar de executarem uma temperatura efetiva acima da desejada para a etapa de hibridização, tal temperatura não foi elevada a ponto de interferir no resultado da PCR-controle, assim como o perfil *overshooting* parece não ter influenciado. Provavelmente porque o termociclador executou o platô em uma temperatura muito próxima da programada para a etapa de hibridização, e a PCR-controle parece não ser sensível o suficiente para detectar tal incoerência (Figura 18-IV). A amplificação da PCR-controle somente seria alterada e indicada com alteração no padrão de bandas a partir de diferenças de temperatura superiores a 2°C (MINERVA BIOLABS, 2015). Ao avaliar a associação entre a temperatura efetivamente executada pelos termocicladores e seu desempenho na PCR-controle, observou-se que diferenças de até 3°C entre a temperatura efetiva e a programada na etapa de hibridização não influenciou a eficiência de amplificação.

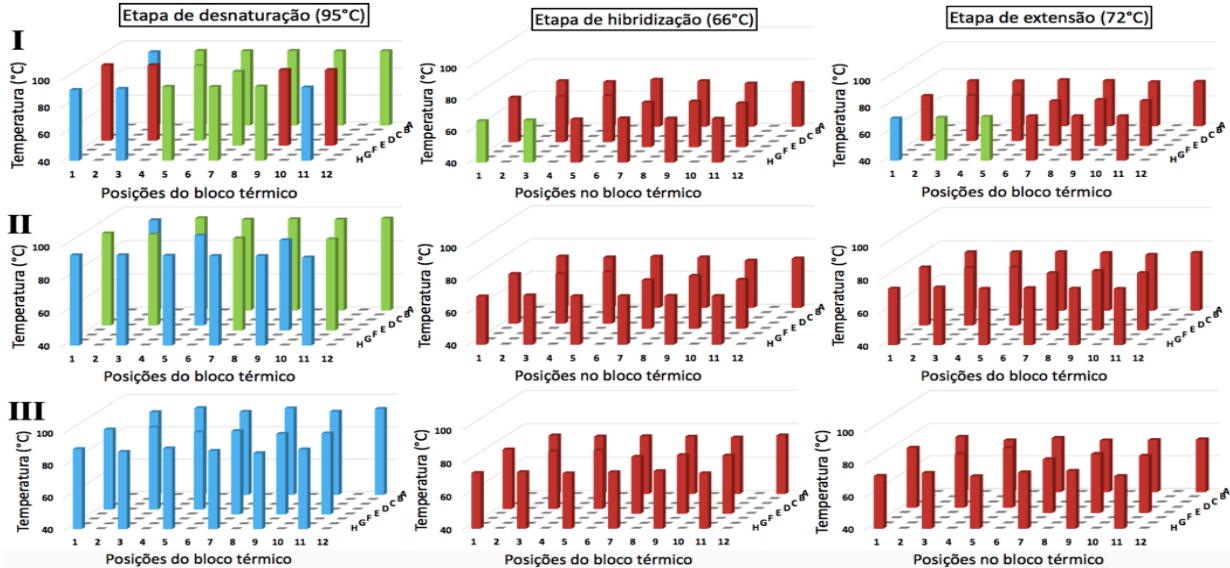
Entretanto, os termocicladores E, F, G, H, I, J, K e L com perfil normal de temperatura na maioria das posições verificadas (alguns com *overshooting* em determinadas posições) apresentaram um resultado ruim na PCR-controle. Isto porque embora com perfil normal, a temperatura efetiva de hibridização foi superior a 3°C e assim permaneceu durante toda a etapa a ponto de interferir na PCR-controle, resultando em um padrão de bandas de termociclador com desempenho ruim (Figura 18-II). Além disso, nesses equipamentos a temperatura efetiva de desnaturação foi menor que a desejada, conforme representado na Figura 19-II.

Figura 18 - Perfis de temperatura e resultados da PCR-control.



(I) Perfil de temperatura curvo e PCR com desempenho ruim (Termociclador R representa os 6 termocicladores com esse perfil de resultado). (II) Perfil de temperatura normal e PCR com desempenho ruim (Termociclador J representa os 8 termocicladores com esse perfil de resultado). (III) Perfil de temperatura normal e PCR com desempenho bom (Termociclador B representa os 2 termocicladores com esse perfil e resultado). (IV) Perfil de temperatura com *overshooting* e PCR com desempenho bom (Termociclador D representa os 2 termocicladores com esse perfil e resultado). Fonte: Autora.

Figura 19 - Representação em 3D da temperatura efetiva nas diferentes posições do bloco térmico dos termocicladores em cada uma das etapas da PCR durante os 31 ciclos programados.



As barras em vermelho, verde e azul indicam se a temperatura efetiva ultrapassou, correspondeu ou não atingiu a temperatura programada, respectivamente. I é representativo de termocicladores com desempenho bom na PCR-controle. II e III são representativos de termocicladores com desempenho ruim na PCR-controle e temperaturas efetivas que alcançaram parcialmente ou não alcançaram a temperatura programada. Fonte: Autora.

Os termocicladores M, N, O, P, Q e R, com perfil curvo de temperatura, também apresentaram resultados ruins na PCR-controle. Esses termocicladores apresentaram temperaturas efetivas de hibridização de 9,3, 7,2, 9,2, 7,7, 6,2 e 7,6°C, respectivamente, mais altas que a temperatura de hibridização programada e duração efetiva da etapa de hibridização de 0 segundos (Tabela 3). A pequena duração efetiva das etapas e a temperatura de hibridização bastante elevada (Figura 19-III) resultaram em padrão de bandas alterado, com apenas a banda inferior visível na PCR-controle (Figura 18-I), indicando termocicladores com funcionamento inadequado.

Observou-se relação significativa ($p=0,0001$; Qui Quadrado) entre as taxas de aquecimento verificadas com os perfis de temperatura apresentados pelos termocicladores. A maioria dos equipamentos com perfil normal de temperatura (A, B e L) apresentou taxa de aquecimento entre 0,6 e 0,7°C. Enquanto a maioria dos equipamentos com perfil curvo (N, O, P, Q e R) apresentou taxa de aquecimento de 0,3 a 0,5°C e todos os termocicladores com perfil *overshooting*, em pelo menos uma posição do bloco térmico, apresentaram taxa de aquecimento de 0,8 a 1,0°C.

Embora também tenha havido relação significativa ($p=0,0089$; Qui Quadrado) entre os modelos de termocicladores com as taxas de aquecimento verificadas, não houve influência significativa das taxas de aquecimento verificadas nos resultados da PCR-controle.

De maneira geral, foi possível agrupar os termocicladores avaliados também de acordo com o resultado das temperaturas efetivas em cada uma das etapas da PCR nas 18 posições do bloco térmico (Figura 19). Todos os termocicladores avaliados apresentaram as temperaturas efetivas das etapas de hibridização e de extensão acima da programada na maioria das 18 posições do bloco térmico verificadas. Com exceção das posições H1, H3 e H5 que apresentaram temperatura efetiva correspondente à programada em alguns casos (barras em verde na Figura 19-I). Somente os termocicladores A, B, C e D (representados pelo termociclador B na Figura 19-I) apresentaram bom desempenho na PCR-controle. Nesses termocicladores a temperatura efetiva de desnaturação correspondeu com a temperatura programada na maioria das posições (Figura 19-I). Além disso, apresentaram a temperatura efetiva mais próxima da programada na etapa de hibridização quando comparados com os demais equipamentos (Tabela 3). Contudo, entre os

termocicladores A, B, C e D, os dois primeiros apresentaram perfil de temperatura normal e os dois últimos com *overshooting*.

Observou-se que os termocicladores que não atingiram a temperatura de desnaturação programada na maioria das posições do bloco térmico (barras azuis nas Figuras 19-II e III) não apresentaram desempenho bom na PCR-controle. O resultado demonstrado pelo termociclador E na figura 19-II representa também os termocicladores F, G, H, I, J, K e L, cujos perfis de temperatura foram normais e com *overshooting*.

O resultado apresentado pelo termociclador R na figura 19-III representa também os termocicladores M, N, O, P e Q, os quais não apresentaram bom desempenho na PCR-controle e perfil de temperatura curvo. Embora não tenha sido significativa a relação entre os perfis de temperatura e o desempenho na PCR-controle, todos os termocicladores com perfil curvo apresentaram desempenho ruim.

Por fim, a presença de *overshooting* nos perfis de temperatura, nas magnitudes observadas, parecem não influenciar no desempenho da PCR-controle. Da mesma forma, no estudo de Kim e colaboradores (2008) a presença de *overshooting* não influenciou os resultados referentes à eficiência de amplificação.

Contudo, ao analisar os cinco (5) minutos da fase inicial de desnaturação da PCR dos 18 termocicladores avaliados, verificou-se que 16 atingiram o platô de acordo com a temperatura programada, variando de 94,5 a 95,4°C. Os termocicladores O e L apresentaram temperatura efetiva de 94,4°C e 96,2°C, respectivamente.

A variação de temperatura entre as posições do bloco térmico não influenciou nos resultados da PCR-controle a ponto de modificar o padrão de bandas entre as diferentes posições (Figuras 16 e 17). Além disto, não houve relação significativa entre a uniformidade do bloco verificada (UBver) e o desempenho dos termocicladores nos resultados da PCR-controle.

A princípio, todos os equipamentos deveriam ter apresentado os mesmos resultados tanto nas avaliações de temperatura quanto na PCR-controle, pois foram utilizados os mesmos protocolos para todos os equipamentos, além dos experimentos terem sido executados sob as mesmas condições. Entretanto, somente os termocicladores do fabricante Applied Biosystems modelo 2720 apresentaram bom

desempenho. Enquanto os termocicladores pertencentes aos demais fabricantes apresentaram desempenhos inadequados na PCR-controle. O interessante foi que os modelos 2720, Veriti e SimpliAmp, apesar de pertencerem ao mesmo fabricante apresentaram desempenhos distintos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Entre os desafios para desenvolvimento do método para avaliação da qualidade de termocicladores estavam a escassez de literatura referente ao tema e as dificuldades para a padronização, principalmente no preparo dos microtubos para avaliação das temperaturas. Entretanto, o método desenvolvido demonstrou-se praticável permitindo aplicação em qualquer laboratório, resultando em um pedido de patente.

A avaliação da qualidade dos termocicladores por meio da verificação da temperatura, utilizando micro-termopares, apontou resultados que permitiram identificar distorções nos perfis de temperatura dos termocicladores. Além disso, a variação da temperatura entre as posições do bloco térmico foi significativamente diferente e também foi observada elevada variação da temperatura intraposição. Os termocicladores que apresentaram menor variação intraposição demonstraram melhor desempenho na PCR controle. Constatou-se que a maioria dos termocicladores não atingiu as temperaturas programadas, executando temperaturas acima da programada nas etapas de hibridização e extensão, e temperatura próxima ou abaixo da programada na etapa de desnaturação. Consequentemente, demonstraram duração efetiva menor que a programada em todas as etapas. Foi verificado que somente alterações acima de 3°C da temperatura programada foram relevantes a ponto de interferir nos resultados da PCR-controle. Dos 18 termocicladores verificados, somente quatro (4) apresentaram bom desempenho na PCR-controle, observando-se relação significativa com os modelos de termocicladores. Contudo, a baixa uniformidade térmica não influenciou em diferenças na eficiência de amplificação entre as posições analisadas no bloco térmico. Portanto, não há posições melhores ou piores no bloco térmico, há termociclador com funcionamento adequado ou inadequado.

Contudo, o funcionamento inadequado apresentado pelos termocicladores também pode ser causado devido a outros fatores. Por exemplo, problemas referentes a instalação quando acomodados em nichos muito confinados. Outros problemas podem estar relacionados a sujeira acumulada, obstruindo o sistema de ventilação, bem como ventilador defeituoso (por exemplo, quando com excesso de ruído), dificultando o resfriamento do equipamento.

Os resultados aqui apresentados ajudam a explicar o fato de que as condições operacionais dos termocicladores realmente podem ser o motivo pelo qual resultados de protocolos de PCR gerados em um laboratório são dificilmente reproduzíveis por outro, mesmo em ensaios executados sob condições idênticas. Isso reforça a importância do monitoramento constante da qualidade desses equipamentos, visto que os termocicladores verificados apresentaram desempenhos distintos. Ressalta-se também a importância de os usuários realizarem a verificação da qualidade dos seus termocicladores a fim de conhecerem melhor o desempenho dos equipamentos, contribuindo para maior reprodutibilidade das técnicas de PCR principalmente entre os laboratórios que utilizam diferentes modelos de termocicladores.

7. PERSPECTIVAS

Retornar, aos laboratórios participantes deste estudo, as informações sobre o desempenho dos termocicladores e entregar os relatórios de verificação da qualidade de cada um dos termocicladores avaliados.

Elaborar um Procedimento Operacional Padrão a fim de auxiliar a aplicação do método desenvolvido para avaliação da qualidade dos termocicladores.

Melhorar o método desenvolvido neste estudo com a simplificação dos protocolos propostos a fim de viabilizar o monitoramento dos termocicladores da UFSC regularmente.

REFERÊNCIAS

AOYAGI, Kazuko. PCR. In: GERSTEIN, Alan S. (Ed.). **Molecular biology problem solver: a laboratory guide**. United States Of America: Wiley-liss, 2001. p. 291-311.

APPLIED BIOSYSTEMS. User Guide Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler: For Amplification of Nucleic Acids. California, 2010. 122p.

APPLIED BIOSYSTEMS. Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler User Guide: For Amplification of Nucleic Acids. California, 2010. 124p.

APPLIED BIOSYSTEMS. SimpliAmp Thermal Cycler User Guide, 2016. 92p.

BERWOUTS, Sarah et al. Quality assurance practices in Europe: a survey of molecular genetic testing laboratories. **European Journal Of Human Genetics**. [s. L.], p. 1118-1126. nov. 2012.

BIOCLER. Manual de Operação: Termociclador MG96+/MG96G. 26p.

BIOER. Instruction Manual of LifeECO Thermal Cycler. Hangzhou, 2013. 40p.

BOROVIK, Cleide Largman et al. **Guia de boas práticas laboratoriais em citogenética e genética molecular humana: comitê de normatização e recomendações para procedimentos utilizados em laboratórios que prestam serviços na área de genética humana**. 2011. Sociedade Brasileira de Genética. Disponível em: <www.sbg.org.br>. Acesso em: 10 jun. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n°. 302, de 15 de outubro de 2005. Dispõe sobre Regulamento Técnico para funcionamento de Laboratórios Clínicos. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 14 out. 2005.

BURTIS, Carl; ASHWOOD, Edward R; BRUNS, David E. Analytical techniques and instrumentation: nucleic acids techniques. In: BURTIS, Carl; ASHWOOD, Edward R; BRUNS, David E. **Tierz textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. 5. ed. Missouri: Elsevier, 2012. Cap. 17. p. 403-406.

CAMPOS-PENA, E. et al. Multiplex PCR Assay for Identification of Six Different Staphylococcus spp. and Simultaneous Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 52, n. 7, p.2698-2701, 14 maio 2014. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00918-14>.

CASCELLA, R. et al. Direct PCR: a new pharmacogenetic approach for the inexpensive testing of HLA-B*57:01. **The Pharmacogenomics Journal**, [s. L.], v. 2, n. 15, p.196-200. abr. 2015. DOI: 10.1038/tpj.2014.48.

CASSU-CORSI, Dandara et al. Misidentification of pan drug-resistant Klebsiella pneumoniae clinical isolates as a metallo- β -lactamase producers by the EDTA/DDST test. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.102-104, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2014.08.008>.

CHEN, Bin et al. Quality Assurance and Quality Improvement in U.S. Clinical Molecular Genetic Laboratories. **Current Protocols In Human Genetics**, [s.l.], p.1-9, abril 2011. John Wiley & Sons, Inc.. DOI: 10.1002/0471142905.hg0902s69.

CLSI. Establishing Molecular Testing in Clinical Laboratory Environments; Approved Guideline. CLSI document MM19-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.

CONTROL LAB. **Desmistifique a Calibração**. Rio de Janeiro, 2005. 13 p. Disponível em: <http://www.controllab.com.br/pdf/manual_calib_2005.pdf>. Acesso em: 30 set. 2014.

COOK, D. et al. Development of a PCR-Based Method for Detection of Delphinium Species in Poisoned Cattle. **Journal of Agricultural and**

Food Chemistry, [s.L.], v. 4, n. 63, p. 1220-1225, jan. 2015. DOI: 10.1021/jf5053496.

DOMINGO, C. et al. 2nd International External Quality Control Assessment for the Molecular Diagnosis of Dengue Infections. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s.L.], v. 4, n. 10, e833, out. 2010. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000833.

ESCADAFAL, C. et al. International External Quality Assessment of Molecular Detection of Rift Valley Fever Virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s.L.], v. 7, n. 5, e2244, maio 2013. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002244.

ESCADAFAL, C. et al. First International External Quality Assessment of Molecular Detection of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s.L.], v. 6, n. 6, e1706, jun. 2012. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001706.

EPPENDORF. Operating Manual: Mastercycler Personal. Califórnia, 2004. 65p.

FAKRUDDIN, Md et al. Nucleic acid amplification: Alternative methods of polymerase chain reaction. **Journal Of Pharmacy And Bioallied Sciences**, [s.l.], v. 5, n. 4, p.245-252, 2013. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/0975-7406.120066>.

FIORENTINI, A. M. et al. Phenotypic and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus*: technological potential for use in fermented sausage. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s.L.], v. 52, n. 3, p. 737-746, jun. 2009. DOI: 10.1590/S1516-89132009000300026.

FITZGERALD, B.; OLSEN, G.; SPEER, B.. Laboratory reporting accuracy of polymerase chain reaction testing for avian polyomavirus. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, [s.L.], p.32-37, mar. 2013.

FORBES, Betty A.; SAHM, Daniel F.; WEISSFELD, Alice S.. Approaches to diagnosis of infectious diseases: nucleic acid-based analytic methods for microbial identification and characterization. In: FORBES, Betty A.; SAHM, Daniel F.; WEISSFELD, Alice S..

Diagnostic microbiology. 12. ed. St Louis, Missouri: Elsevier, 2007. Cap. 8. p. 120-133.

GOLFETTO, Lisléia. **Deteção do HPV e da Chlamydia trachomatis em amostras de cérvix uterina de mulheres da cidade de São Miguel do Oeste.** 2014. 185 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/123189>>. Acesso em: 11 maio 2016.

HOMAYOUNI, V.; SALEHI, M.; KAZEMI, M. Investigating of microsatellites instability in patients with hereditary non-polyposis colorectal cancer in Isfahan. **Advanced Biomedical Research**, [s.L.], v. 3, p.145-156, jun. 2014. DOI: 10.4103/2277-9175.135162.

HE, Q.; VILJANEN, M. K.; MERTSOLA, J.. Effects of thermocyclers and primers on the reproducibility of banding patterns in randomly amplified polymorphic DNA analysis. **Molecular and Cellular Probes**, [s.L.], p. 155-159, abr. 1994.

HOLDEN, Marcia J et al. Molecular diagnostics: harmonization through reference materials, documentary standards and proficiency testing. **Expert Review Of Molecular Diagnostics: Informa Healthcare**, [s. L.], v. 11, n. 7, p.741-755, set. 2011.

HUGGETT, J et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes And Immunity**, [s.l.], v. 6, n. 4, p.279-284, 7 abr. 2005. Nature Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gene.6364190>.

KAMINIWA, M. S. J. et al. Vanadium accelerates polymerase chain reaction and expands the applicability of forensic DNA testing. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, [s. L.], v. 20, n. 4, p.326-333, mai. 2013. DOI: 10.1016/j.jflm.2012.09.006.

KESSLER, Harald H.; RAGGAM, Reinhard B.. Quality assurance and quality control in the routine molecular diagnostic laboratory for infectious diseases. **Clinical Chemistry And Laboratory Medicine**,

[s.l.], v. 50, n. 7, p.1153-1159, 1 jan. 2012. Walter de Gruyter GmbH. DOI: 10.1515/cclm-2011-0707.

KIM, Young Ho et al. Performance evaluation of thermal cyclers for PCR in a rapid cycling condition. **Biotechniques: the international journal of life science methods**. [s.L.], p. 495-505. abr. 2008.

KLUG, William S. et al. **Conceitos de genética**. 9. ed. Artmed, 2010. Cap. 10. p. 804.

LAU, Susanna Kp et al. Burkholderia pseudomallei in soil samples from an oceanarium in Hong Kong detected using a sensitive PCR assay. **Emerg Microbes Infect**, [s.l.], v. 3, n. 10, p.1-6, 1 out. 2014. Nature Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1038/emi.2014.69>.

LAWUNG, Ratana; CHERDTRAKULKIAT, Rungrot; PRACHAYASITTIKUL, Virapong. Protocol for a Facile Multiplex PCR for Multi-antimicrobial Resistance and Gonococcus Detection. **Methods In Molecular Biology**, [s.l.], p.329-341, 2012. Springer Science + Business Media. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-937-2_23.

LEVEN, M.; FINCH, R.; VAN BELKUM, A.. European quality clearance of new microbiological diagnostics. **Clinical Microbiology And Infection**, [s.L.], v. 19, n. 1, p.29-38, jan. 2013. Elsevier BV. DOI: 10.1111/1469-0691.12052. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S1198743X14603062?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 10 jun. 2015.

MAC PHERSON, J. M. et al. Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers, and effects of primer and DNA concentration. **Molecular and Cellular Probes**, [s.L.], p. 293-299, ago. 1993.

MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M.. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. **Journal Of Clinical Laboratory Analysis**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.47-51, 2002. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jcla.2058>.

MELO, Murilo Rezende et al. Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s.l.], v. 46, n. 5, p.375-381, out. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1676-24442010000500006>.

MINERVA BIOLABS. Traditional Thermal Cycler Validation Kit: For Conventional PCR block cyclers. Germany, 2015. 12p.

MORAES, Ana Carolina Rabello de et al. Importance of Detecting Multidrug Resistance Proteins in Acute Leukemia Prognosis and Therapy. **Journal Of Clinical Laboratory Analysis**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.62-71, jan. 2013. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jcla.21563>.

MOREL, A. S. et al. Complementarity between targeted real-time specific PCR and conventional broad-range 16S rDNA PCR in the syndrome-driven diagnosis of infectious diseases. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, [s.l.], v. 34, n. 3, p.561-570, 28 out. 2014. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-014-2263-z>.

MULLIS, Kary B.. **The Nobel Prize in Chemistry 1993**. Disponível em: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/. Acesso em: 11 maio 2016.

NGAN, G. J. Y. et al. Development of multiplex PCR assays based on the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer for the detection of clinically relevant nontuberculous mycobacteria. **Letters In Applied Microbiology**, [s.l.], v. 52, n. 5, p.546-554, 28 mar. 2011. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765x.2011.03045.x>.

NIKISIN, S. et al. International External Quality Assessment Study for Molecular Detection of Lassa Virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s.L.], v. 9, n. 5, e0003793, maio 2015. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003793.

NOGUEIRA, Christiane Lourenço et al. Alternative sputum preparation to improve polymerase chain reaction assay for Mycobacterium tuberculosis detection. **Int J Tuberc Lung Dis**, [s.l.], p.783-787, 2012.

International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.11.0644>.

PENNER, G. A. et al. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. **Pcr Methods And Applications**, [s. L.], v. 2, n. 4, p.341-345, maio 1993.

PEREZ, D. P.; SALDANA, H. A. B.. Thermocycler temperature variation invalidates PCR results. **Biotechniques: the international journal of life science methods**. [s.L.], p. 286-293. out. 1990.

PRIM, Rodrigo Ivan et al. Molecular profiling of drug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in the state of Santa Catarina, southern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 110, n. 5, p.618-623, ago. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760150100>.

RAYMAEKERS, Marijke et al. Reflections and proposals to assure quality in molecular diagnostics. **Acta Clinica Bélgica**, [s. L.], v. 66, n. 1, p.33-41, fev. 2011.

ROSSETTI, Maria Lucia; SILVA, Cláudia Maria Dornelles da; RODRIGUES, Jaqueline Josi Samá. **Doenças infecciosas: diagnóstico molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

RUNDELL, Clark A. **Upgrading Quality Control in Molecular Diagnostics**. 2008. Disponível em: <<https://www.westgard.com/qc-molecular-diagnostics.htm>>. Acesso em: 11 jun. 2015.

SAIKI, R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, n.4839, p. 487-491, 1988.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. In Vitro Amplification of DNA by PCR. In: *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001, cap. 8.

SANTOS, E. A.; STERNBERG, C.; ALMEIDA, R. T.. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA AMBIENTE NA ANÁLISE DO TERMOCICLADOR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE

ENGENHARIA BIOMÉDICA, 24., 2014, Uberlândia. **Anais...** . Uberlândia: CBEB, 2014. p. 1522 - 1525.

SAUNDERS, Ginny C. et al. Interlaboratory Study on Thermal Cycler Performance in Controlled PCR and Random Amplified Polymorphic DNA Analyses. **Clinical Chemistry**, [s.L.], v. 47, n. 1, p.47-55, jan. 2001.

SCHAUBERGER, G.; WAGNER, M.. Qualitätskontrolle von PCR Thermocyclern: Überprüfung der räumlichen und zeitlichen Temperaturverteilung. **Biomedical Engineering**, [s.L.], v.43, p.216-218, 1998.

SCHEFFER, Mara Cristina et al. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clonal spread in southern Brazil and in the state of Goiás. **Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 14, n. 5, p.508-509, out. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-86702010000500014>.

SCHEFFER, Mara Cristina et al. Intrahospital spread of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a University Hospital in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 43, n. 4, p.367-371, ago. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822010000400006>.

SCHODER, D. et al. Physical Characteristics of Six New Thermocyclers. **Clinical Chemistry**, [s.l.], v. 49, n. 6, p.960-963, 1 jun. 2003. American Association for Clinical Chemistry (AACC). DOI: 10.1373/49.6.960.

SCHODER, D. et al. Novel Approach for Assessing Performance of PCR Cyclers Used for Diagnostic Testing. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s. L.], p. 2724-2728. jun. 2005.

SCHORNER, Marcos Andre. Detection of Group B *Streptococcus agalactiae* from Anorectal and Vaginal Screening Tests. **Clin Microbiol**, [s.l.], v. 03, n. 05, p.1-4, 2014. OMICS Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.4172/2327-5073.1000169>.

SERTIC, Jadranka. Molecular Diagnostics: Quality Assurance Program in Genotyping: A Croatian Experience. **Biochemia Medica**, [s. L.], v. 14, n. 1, p.95-100, abr. 2004.

SIPOS, Rita et al. Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. **Fems Microbiology Ecology**, [s.l.], v. 60, n. 2, p.341-350, maio 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00283.x>.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA / MEDICINA LABORATORIAL. **NORMA PALC 2013**: Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos. Brasil: Milograph, 2013. 52 p.

SONG, L. et al. External Quality Assessment for Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16 Detection by Reverse Transcription-PCR Using Armored RNA as a Virus Surrogate. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.L.], v. 49, n. 10, p.3591-3595, out. 2011. DOI: 10.1128/JCM.00686-11.

STRACHAN, Tom; READ, Andrew P. **Human molecular genetics**. New York: Garland Science, 2003.

STRAMBU, V. et al. Translating clinical research of Molecular Biology into a personalized, multidisciplinary approach of colorectal cancer patients. **Journal of Medicine and Life**, [s.L.], v. 7, n. 1, p.17-26, mar. 2014.

TWEED, G. P.; WHITNEY, J.; BLOCH, P. L.. Temperature Cycler Evaluation: What do you need to know? **Biotechniques: the international journal of life science methods**. [s.L.], p. 526-532. out. 1991.

WALLACE, Paul S.; MACKAY, William G.. Quality in the Molecular Microbiology Laboratory. **Methods In Molecular Biology**, [s.L.], p.49-79, 13 set. 2012. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/978-1-60327-353-4_3.

WEIER, Heinz Ulrich; GRAY, Joe W.. A Programmable System to Perform the Polymerase Chain Reaction. **Dna**, [s.l.], v. 7, n. 6, p.441-

447, jul. 1988. Mary Ann Liebert Inc.
<http://dx.doi.org/10.1089/dna.1.1988.7.441>.

WEISSENSTEINER, Thomas; GRIFFIN, Hugh G.; GRIFFIN, Annette (Ed.). Thermostable DNA polymerases for in vitro DNA amplifications. In: WEISSENSTEINER, Thomas; GRIFFIN, Hugh G.; GRIFFIN, Annette (Ed.). **PCR technology: current innovations**. 2. ed. New York: Crc Press, 2003. Cap. 25. p. 219-223.

WILDNER, L. M. et al. Mycobacteria mobility shift assay: a method for the rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v.109, n. 3, p.356-361, mai. 2014. DOI: 10.1590/0074-0276130458.

ZAULI, Danielle A. G.; MENEZES, Carla Lisandre Paula de; OLIVEIRA, Cristiane Lommez de. Development and Padronization of Three Multiplex PCRs for the Diagnosis of Chlamydia trachomatis, Toxoplasma gondii, Herpes Simplex Viruses 1 and 2, and Cytomegalovirus. **Molecular Biotechnology**, [s.l.], v. 54, n. 3, p.1004-1009, 24 fev. 2013. Springer Science + Business Media.
<http://dx.doi.org/10.1007/s12033-013-9652-x>.

APÊNDICE A – Questionário referente às características e condições de uso de termocicladores

Instruções (leia antes de responder as questões abaixo):

- Favor utilizar um questionário para cada termociclador, mesmo que o equipamento utilizado esteja no mesmo laboratório.
- Favor não buscar informações nos manuais ou na literatura para responder as questões do item 3.

1. Informações do laboratório participante:

- Laboratório:

- Centro _____ de _____ ensino:

- Responsável _____ pelo _____ preenchimento:

- Data: ___/___/_____

- Contato:

2. Características do termociclador:

- Fabricante:

- Modelo:

- Número de série:

- Taxa máxima de aquecimento (°C/s):

_____ () Não sei

- Taxa máxima de resfriamento (°C/s):

_____ () Não sei

- Uniformidade do bloco (±°C):

_____ () Não sei

- Acurácia (±°C):

_____ ()

Não sei

- Sistema de aquecimento:

_____ () Não sei

- Capacidade:

24 tubos

96 tubos

Outro - Especifique:

- Tipo de tubos admitidos:

- 0,2 ml
 - 0,5 ml
 - Outro - Especifique:

- _____
- O termociclador possui sistema de aquecimento de tampa?
 - Sim
 - Não
 - Há necessidade de adicionar óleo na superfície dos poços?
 - Sim
 - Não

3. Questões relacionadas às condições de uso do termociclador:

- Como o termociclador foi adquirido pelo laboratório?
 - Por compra direta com fabricante ou distribuidor
 - Por doação
 - Outra - Especifique:

- _____
- Qual o tempo total de uso do termociclador no laboratório?
 - Menos de 1 ano
 - Entre 1 e 5 anos
 - Mais de 5 anos

- Quantas vezes os processos de calibração e manutenção foram realizados no termociclador?
 - 1 vez
 - Entre 1 e 5 vezes
 - Mais de 5 vezes
 - Nenhuma vez
 - Informação desconhecida

- Quando ocorreu o último processo de calibração e manutenção do termociclador?
 - A menos de 1 ano
 - Entre 1 e 2 anos
 - A mais de 2 anos
 - Nunca ocorreu
 - Informação desconhecida

- Qual a principal causa do envio para a manutenção?
 - Diminuição do desempenho
 - Super aquecimento do bloco térmico
 - Rotina
 - Outra - Especifique:

- Nunca foi enviado para manutenção

- Quem realiza o serviço de manutenção do termociclador?

Serviço de manutenção autorizada - Especifique:

Outro - Especifique:

Nunca foi enviado para manutenção

- Com que frequência é realizada a limpeza do termociclador?

Semanalmente

Mensalmente

Nunca

Informação desconhecida

Por favor, descreva a forma como a limpeza é realizada:

- Qual o perfil dos usuários com relação ao seu grau de instrução?

Estudante de graduação - Número de usuários: _____

Estudante de pós-graduação - Número de usuários:

Técnico - Número de usuários: _____

Outro - Especifique:

- Em média quantas horas o termociclador é utilizado dentro do período de uma semana?

- Até 5 horas
- De 5 a 10 horas
- Mais de 10 horas
- Informação desconhecida

- O termociclador costuma continuar em funcionamento durante a noite (*overnight*) a 4°C?

- Sim
- Não

- Quais são as temperaturas (ou programações) utilizadas nos protocolos de PCR executados por este termociclador?

- Qual a temperatura normalmente utilizada na tampa do termociclador? _____

- Existe alguma preferência em utilizar determinadas posições no bloco térmico?

- Não
- Sim

Se sim, por favor, especifique quais:

- Existe controle do registro de uso do termociclador de forma a garantir a rastreabilidade?

Sim

Não

- Fique à vontade para fazer observações relacionadas ao assunto em questão:

Muito obrigada pelo preenchimento!

APÊNDICE B – Termo de consentimento livre e esclarecido

ESTUDO: Avaliação da qualidade de termocicladores.

Prezado participante da pesquisa, você está sendo convidado a participar de uma pesquisa sobre a avaliação da qualidade de termocicladores. Esta pesquisa está associada ao projeto de mestrado da aluna Paula Alves de Souza do programa de Pós-Graduação em Farmácia e orientado pela professora Dra. Maria Luiza Bazzo e co-orientado pela Professora Dra. Flávia Martinello, ambas do Departamento de Análises Clínicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina.

Este estudo tem como objetivo geral avaliar os equipamentos termocicladores utilizados nos laboratórios de pesquisa da UFSC, bem como o levantamento das condições de uso e manutenção destes equipamentos, por meio de aplicação de questionários aos usuários e da verificação do desempenho destes equipamentos.

Durante a pesquisa você irá responder a um questionário contendo 3 itens. Os itens 1 (Informações do laboratório participante) e 2 (Características do termociclador) tem como objetivo identificar o laboratório de pesquisa e o modelo do equipamento, respectivamente. O item 3 (Questões relacionadas as condições de uso do termociclador) tem como objetivo reunir informações relacionadas a condições de uso e manutenção de equipamentos termocicladores. Para responder este último item não é permitido buscar informações nos manuais ou na literatura.

Este projeto possui relevância acadêmica e como benefícios pode gerar protocolos de manejo para melhor uso dos equipamentos analisados. Como possível risco, ao responder o questionário você pode sentir algum constrangimento devido ao manejo equivocado do equipamento ou algum cansaço/aborrecimento.

Durante os procedimentos de coleta de dados você estará sempre acompanhado por um dos pesquisadores, que lhe prestará toda a assistência necessária. Caso tenha alguma dúvida sobre os procedimentos ou sobre o projeto você poderá entrar em contato com o pesquisador a qualquer momento pelos telefones ou e-mails abaixo.

Estando de acordo em participar, os pesquisadores serão os únicos a ter acesso aos dados e tomarão todas as providências necessárias para manter o sigilo, mas sempre existe a remota possibilidade da quebra do sigilo, mesmo que involuntário e não intencional, cujas consequências serão tratadas nos termos da lei. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas e mostrarão apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome, instituição ou qualquer informação relacionada à sua privacidade. Sinta-se à vontade em deixar de participar da pesquisa a qualquer momento, sem ter qualquer prejuízo.

Duas vias deste documento estão sendo rubricadas e assinadas por você e pelo pesquisador responsável. Guarde cuidadosamente a sua via, pois é um documento que traz importantes informações de contato e garante os seus direitos como participante da pesquisa.

A legislação brasileira não permite que você tenha qualquer compensação financeira pela sua participação em pesquisa. Você não terá nenhuma despesa advinda da sua participação na pesquisa. Caso alguma despesa extraordinária associada à pesquisa venha a ocorrer, você será ressarcido nos termos da lei.

Caso você tenha algum prejuízo material ou imaterial em decorrência da pesquisa poderá solicitar indenização, de acordo com a legislação vigente e amplamente consubstanciada.

O pesquisador responsável, que também assina esse documento, compromete-se a conduzir a pesquisa de acordo com o que preconiza a Resolução 466/12 de 12/06/2012, que trata dos preceitos éticos e da proteção aos participantes da pesquisa.

Você poderá entrar em contato com o pesquisador pelo telefone (48) 9915-4129, e-mail pauli.as@hotmail.com, endereço profissional: Universidade Federal de Santa Catarina - Centro de Ciências da Saúde - Departamento de Análises Clínicas Campus Universitário – Trindade CEP 88 040 970 - Florianópolis – SC ou residencial: Rua Luiza Oscar de Carvalho, nº 75, Trindade CEP 88036-400 - Florianópolis – SC. Você também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC pelo telefone (48) 3721-6094 e-mail cep.propesq@contato.ufsc.br ou pessoalmente na rua

Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401, Trindade,
Florianópolis/SC, CEP 88.040-400.

Eu,.....
..., portador do documento de identidade (RG) nº....., li
este documento (ou tive este documento lido para mim por uma pessoa
de confiança) e obtive dos pesquisadores todas as informações que
julguei necessárias para me sentir esclarecido e optar por livre e
espontânea vontade participar da pesquisa.

Florianópolis, de de

Assinatura do participante:

Assinatura do pesquisador:

Antecipadamente agradecemos à colaboração.

Prof.^a Dra. Maria Luiza Bazzo
E-mail:marialuizabazzo@gmail.com
Telefone 3721-2066

Prof.^a Dra. Flávia Martinello
E-mail:flaviamartinello@ccs.ufsc.br
Telefone 3721-9712 ramal 227

Paula Alves de Souza
E-mail: pauli.as@hotmail.com
Telefone 9915-4129

APÊNDICE C – Declaração de autorização de uso de equipamento**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

Eu _____, portador do documento de identidade (RG) n° _____, responsável legal pelo equipamento com n° de patrimônio _____ vinculado ao Departamento _____ da Universidade Federal de Santa Catarina, declaro para os devidos fins e efeitos legais que tomei conhecimento do projeto de pesquisa: **“Avaliação da qualidade de termocicladores”** e autorizo a realização dos experimentos para avaliação da qualidade do mesmo.

Florianópolis, / /2016.

Assinatura do docente

APÊNDICE D – Mapa para protocolos de avaliação da temperatura dos termoblocos dos termocicladores

Data: __/__/__																											
Laboratório: _____																											
Termociclador: _____																											
Tempo zero (t0s)												Pesagem (g)															
Teste:				Teste:				Teste:				T	Antes	Depois	#												
Protocolo de verificação da temperatura estática 1				Protocolo de verificação da temperatura estática 2				Protocolo mimetizando os ciclos térmicos de uma				1															
Ciclos 55°C 72°C 95°C				Ciclos 95°C 72°C 55°C				Ciclos 95°C 66°C 72°C				2															
1				1				1				3															
2				2				2				4															
3				3				3				5															
T(°C) Max.: ___ Min.: ___				T(°C) Max.: ___ Min.: ___				T(°C) Max.: ___ Min.: ___				6															
												7															
												8															
												9															
												10															
												11															
												12															
												13															
												14															
												15															
												16															
												17															
												18															
												19															
												20															
												21															
												22															
												23															
												24															
												25															
												26															
												27															
												28															
												29															
												30															
												31															
												T(°C) Max.: ___ Min.: ___															
												Obs.: _____															

APÊNDICE E – Especificações técnicas dos termocicladores em avaliação

Termociclador	Fabricante / Modelo	Taxa máx. aquecimento/resfriamento (°C/s)*	Uniformidade do bloco (±°C)*	Sistema de aquecimento	Capacidade (n° microtubos)	Volume microtubo (mL)	Sistema de aquecimento de tempo
A	Applied Biosystem/ 2720	2,6 / 2,6	0,5 ^a	Por bloco ou volume	96	0,2	Sim
B	Applied Biosystem/ 2720	2,6 / 2,6	0,5 ^a	Por bloco ou volume	96	0,2	Sim
C	Applied Biosystem/ 2720	2,6 / 2,6	0,5 ^a	Por bloco ou volume	96	0,2	Sim
D	Applied Biosystem/ 2720	2,6 / 2,6	0,5 ^a	Por bloco ou volume	96	0,2	Sim
E	Applied Biosystem/ Veriti	3,35 / 2,8	0,5 ^b	Por volume	96	0,2	Sim
F	Applied Biosystem/ Veriti	3,35 / 2,8	0,5 ^b	Por volume	96	0,2	Sim
G	Applied Biosystem/ Veriti	3,35 / 2,8	0,5 ^b	Por volume	96	0,2	Sim

H	Applied Biosystem/ Veriti	3,35 / 2,8	0,5 ^b	Por volume	96	0,2	Sim
I	Applied Biosystem/ Veriti	3,35 / 2,8	0,5 ^b	Por volume	96	0,2	Sim
J	Applied Biosystem/ Veriti	3,35 / 2,8	0,5 ^b	Por volume	96	0,2	Sim
K	Applied Biosystem/ SimpliAmp	3,1 / 3,0	0,5 ^b	Por bloco ou volume	96	0,2 0,5	Sim
L	Thermo/ Px2	3,0 / 2,0	0,4 ^c	Por bloco ou volume	96	0,2	Sim
M	BIORAD/C 1000	5,0 / 5,0	0,4 ^d	Por bloco ou volume	96	0,2	Sim
N	Eppendorf/ Mastercycler	3,0 / 3,0	0,5	Por bloco ou volume	25	0,2 0,5	Sim
O	Bioer/ life ECO	2,0 / 1,7	0,4	Por bloco ou volume	96	0,2	Sim
P	Biocycler/ Peltier Thermal Cycler	3,0 / 2,0	0,2	Por bloco ou volume	96	0,2 0,5	Sim

Q	Biocycler/P eltier Thermal Cycler	3,0 / 2,0	0,2	Por bloco ou volume	96	0,2 0,5	Sim
R	Biocycler/P eltier Thermal Cycler	3,0 / 2,0	0,2	Por bloco ou volume	96	0,2 0,5	Sim

* Valores fornecidos pelos fabricantes. *a*: 30 segundos após aquecer a 95°C. *b*: 20 segundos após aquecer a 95°C. *c*: 15 segundos após aquecer a 95°C. *d*: 10 segundos após aquecer a 90°C.

APÊNDICE F – Condições de uso dos termocicladores em avaliação

Termociclador	Tempo total de uso (anos)	Última calibração/ manutenção	Serviço de manutenção	Perfil de usuários	Uso <i>overnigh t</i>	Preferência por poços	Registro de uso
A	1-5	-	-	Pós-grad. – 10 Bioq. – 4	Sim	Sim Centrais	Não
B	1-5	-	-	Grad. – 3 Pós-grad. – 8 Bioq. – 4	Sim	Sim Centrais	Não
C	1-5	-	-	Grad. – 3 Pós-grad. – 10 Téc. – 4	Sim	Sim Centrais	Sim
D	<1	-	-	Grad. – 1 Pós-grad. – 10 Téc. – 5	Sim	Sim Alternados	Sim
E	1-5	-	-	Grad. – 2 Pós-grad. – 6	Não	Não	Sim
F	1-5	-	-	Grad. – 2 Pós-grad. – 7	Não	Não	Sim

G	1-5	-	-	Grad.- 3 Pós-grad. - 10	Não	Não	Não
H	1-5	-	-	Grad.- 10 Pós-grad. - 10	Não	Sim Centrais	Sim
I	1-5	>2 anos	Serviço de manutenção autorizado	Grad.- 1 Pós-grad. - 10 Téc.- 1	Não	Não	Sim
J	1-5	>2 anos	Serviço de manutenção autorizado	Grad.- 1 Pós-grad. - 10 Téc.- 1	Não	Não	Sim
K	1-5	1-2 anos	Serviço de manutenção autorizado	Grad.- 1 Pós-grad. - 10 Téc. - 1	Não	Não	Sim
L	>5	>2anos	Serviço de manutenção autorizado	Grad.- 2 Pós-grad. - 4	Não	Sim Uniformes e simétricos Microplaca	Não
M	>5	-	-	Grad.- 5 Pós-grad. - 10	Não	Não	Sim
N	>5	-	-	Grad.- 1	Não	Não	Não

O	1-5	-	-	Grad. – 3 Pós-grad. – 4	Não	Não	Sim
P	>5	>2anos	Serviço de manutenção autorizado	Grad.– 4 Pós-grad. – 4	Sim	Sim Centrais	Sim
Q	>5	<1	Outro – Fernatec (Curitiba)	Pós-grad. – 8	Sim	Não	Não
R	1-5	1-2	Outro	Pós-grad. – 4	Sim	Sim Centrais	Sim

Pós-grad. = Estudante de pós-graduação. Grad. = Estudante de graduação. Bioq. = Bioquímico. Téc. = Técnico de laboratório

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da qualidade de termocicladores

Pesquisador: Flávia Martinello

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 50001215.3.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.414.989

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa em nível de Mestrado pesquisadora Paula Alves de Souza - CCS UFSC Programa de Pós-graduação em Farmácia, orientada por Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo.

A proposta de pesquisa pretende caracterizar os termocicladores utilizados na UFSC permitindo extrapolar a variabilidade de imprecisão que ocorre com esses equipamentos. Assim, espera-se contribuir para a garantia da qualidade, por meio da avaliação do desempenho dos termocicladores utilizados na UFSC. Participantes: 20

O levantamento do número e da localização dos termocicladores da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) será realizado primeiramente por meio de contato com o setor de patrimônio da Universidade através do qual serão identificados os termocicladores do Campus Reitor João David Ferreira Lima - Trindade. Posteriormente, serão convidados os laboratórios de pesquisa da UFSC para participar do projeto, objetivando-se avaliar o maior número possível de termocicladores, incluindo aqueles adquiridos com recursos de pesquisa e não patrimoniados pela Universidade.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 1.414.989

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o desempenho dos termocicladores utilizados na Universidade Federal de Santa Catarina e desenvolver um protocolo para o monitoramento destes equipamentos, contribuindo para a garantia da qualidade e confiança dos resultados obtidos por técnicas de PCR.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Foram revistos riscos e benefícios sendo reescritos em acordo com a Res. 466/12.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto possui relevância acadêmica e pode gerar protocolos de manejo para melhor uso dos equipamentos analisados presentes em laboratórios da UFSC locus do projeto, mas pode ser estendido a todos os laboratórios que fazem uso destes equipamentos

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram corretamente apresentados cumprindo as exigências da Res.466/12, e as considerações do parecer 1.354.004.

Recomendações:

Recomenda-se apenas utilizar no TCLE o cabeçalho da Instituição proponente.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências adicionais. Solicita-se que seja cumprida a Res.466/12 em todo o percurso da pesquisa, apresentando os relatórios finais a este comitê.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_589040.pdf	10/12/2015 18:00:49		Aceito
Outros	Carta_resposta2.pdf	10/12/2015 17:59:10	Flávia Martinello	Aceito
Outros	Carta_resposta.pdf	23/11/2015 11:37:52	Flávia Martinello	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_corrigido.pdf	23/11/2015 11:37:17	Flávia Martinello	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	09/10/2015	Flávia Martinello	Aceito

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401

Bairro: Trindade

CEP: 88.040-400

UF: SC

Município: FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3721-6094

E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 1.414.989

Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	12:01:29	Flávia Martinello	Aceit
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	11/09/2015 17:30:54	Flávia Martinello	Aceit
Outros	QUESTIONARIO.pdf	11/09/2015 17:29:29	Flávia Martinello	Aceit
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	11/09/2015 17:27:35	Flávia Martinello	Aceit

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 18 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br