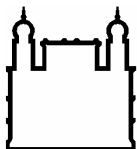


FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS

**ENSAIO MOLECULAR PARA VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE
GRIPE COM ÊNFASE NO DIAGNÓSTICO DE INFLUENZA A H1N1**

RONALDO FERREIRA DIAS

RIO DE JANEIRO
2011



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

RONALDO FERREIRA DIAS

**Ensaio Molecular para Vigilância Epidemiológica de Gripe com
ênfase no diagnóstico de Influenza A H1N1**

Dissertação apresentada ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos.

RIO DE JANEIRO

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DE MANGUINHOS /

CICT / FIOCRUZ – RJ

Dias, Ronaldo Ferreira

Ensaio Molecular para Vigilância Epidemiológica de Gripe com ênfase no diagnóstico de Influenza A H1N1/Ronaldo Ferreira Dias – Rio de Janeiro, 2011. IX, f.: il.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Tecnologia de Imunobiológicos, 2011.

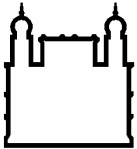
Bibliografia: f.

Orientador – Alvarez, Patrícia; Krieger, Marco Aurélio

1. Diagnóstico. 2. Influenza. 3. PCR em tempo real

I. Título

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos e no Departamento de Reativos para Diagnóstico do Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP, sob a orientação da Dra. Patrícia Alvarez Brindeiro e Dr. Marco Aurélio Krieger.



Ministério da Saúde

FIUCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

RONALDO FERREIRA DIAS

**ENSAIO MOLECULAR PARA VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE
GRIPE COM ÊNFASE NO DIAGNÓSTICO DE INFLUENZA A H1N1**

Orientadores: Dra. Patrícia Alvarez Brindeiro e Dr. Marco Aurélio Krieger

Dissertação aprovada em 09 de Junho de 2011.

Examinadores:

Prof^a. Dra. Elena C. C. Siqueira
Bio-Manguinhos/Fiocruz / Presidente

Prof. Dr. José Nelson Couceiro
UFRJ

Prof^a. Dra. Constança Britto
IOC/Fiocruz

RIO DE JANEIRO
2011

*À June, por sempre ter acreditado na minha
capacidade*

*Ao José Victor, meu filho, que é muito mais
importante do que tudo que eu já tenha feito ou venha a fazer.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ronaldo e Filomena que me apóiam em tudo e acreditam em mim mais do que ninguém,

À Dra Patrícia Alvarez Brindeiro, que me apoiou e me deu suporte no decorrer neste trabalho, nos momentos em que mais precisei, e que foi a peça fundamental para que esse trabalho pudesse ser realizado,

Ao Dr. Marco Aurélio Krieger, que me propiciou as oportunidades e que, apesar da distância física, foi indispensável à realização deste trabalho,

Ao Antonio Gomes Pinto Ferreira, que permitiu que tudo começasse e sempre me apoiou em todas as minhas iniciativas,

A todos do LATED, laboratório de tecnologia diagnóstica, e, em especial, aos membros do setor de biologia molecular (Elisabete Ferreira, Daniele e Fabiane Monteiro), por terem tido paciência com meus erros e meus pedidos,

Ao DERED, especialmente ao pessoal do escritório, pela receptividade e paciência,

A todos do Instituto de Biologia Molecular do Paraná, e, em especial, à Andréia Dallabona, à Camila Suarez e a toda a equipe da INTEC, por terem me acolhido de uma maneira inesquecível,

À Celina Poersch, pela ajuda na parte prática, apesar de ter tido de nos deixar, ainda durante a realização do trabalho,

A todos os colegas do Mestrado Profissional, pela amizade, ajuda, sugestões e ensinamentos. Todos vocês, sem exceção, contribuíram direta ou indiretamente para a realização dessa dissertação.

Aos amigos do Escritório do DERED, por permitirem que utilizasse as instalações para a digitação deste trabalho.

Aos amigos Carlos Renato Calvet da Silva, Pedro Paulo Ferreira Ribeiro, Bernardo Loureiro, Rafael Alexandrino e Alfredo Jabour , pela inestimável contribuição para a finalização deste trabalho,

À Dra Elena Caride, pela sua revisão e pela participação ao longo deste trabalho,

À Bio-Manguinhos, à Fiocruz e ao IBMP, pelo apoio financeiro.

Per Ardua Surgo
(Na dificuldade, Venço)
Lema do brasão do estado da Bahia

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Influenza.....	1
1.1.1. Estrutura do vírus	1
1.1.3. Mecanismos de variações antigênicas.....	5
1.1.4. Epidemiologia e Histórico das pandemias causadas pelo vírus Influenza A H1N1.....	8
1.2. Diagnóstico de influenza.....	12
1.2.1. Isolamento viral	13
1.2.2. Outras possibilidades diagnósticas.....	13
1.2.3. Diagnóstico molecular.....	15
1.2.3.1 Histórico de técnicas moleculares.....	15
1.2.3.1.1 Técnicas Moleculares.....	16
1.2.3.1.2. Sistema Taqman®.....	17
1.3. Situação da Influenza A H1N1 no Sistema Único de Saúde.....	20
1.4. Atuações de Bio-Manguinhos no cenário nacional.....	23
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo Geral	25
2.2. Objetivos Específicos	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1. Sistemas de extração e PCR em tempo real para a adaptação de um ensaio molecular.....	26
3.2. Origem e quantidade de amostras utilizadas.....	28
3.3. Sistemas de Extração avaliados	29
3.3.1. Extração manual	31
3.3.2. Maxwell®16(Promega).....	31
3.3.3.. NucliSens miniMAG® (BioMerieux).....	32
3.3.4. MagMax® (Applied Biosystems)	33
3.3.5. QIAcube® (Qiagen).....	33
3.3.6 Labturbo(BioTools).....	34
3.4 PCR em tempo real Protocolo IBMP/Bio-Manguinhos.....	35
3.5 Oligonucleotídeos e sondas	36
3.6 Protocolo de PCR em tempo real.....	38

	ix
3.6.1 ABI 7500.....	39
3.6.2 LionCube	39
3.7. Controles da reação	39
3.8 Protocolo H1N1 CDC	40
4. RESULTADOS	42
4.1 Matriz de definições para os Equipamentos.....	42
4.2 Nacionalização de insumos.....	44
4.2.1. Avaliação das reações SINGLE e MULTIPLEX de H1N1, HA, NA, INFA, M1 E RNP.....	44
4.3 Padronizações de ensaios Duplex	46
4.3.1. Avaliação de reações duplex H1N1/RNP e INFA-M1/RNP	47
4.3.2. Análise de reprodutibilidade do modelo escolhido.	49
4.4 - Teste com diferentes condições de master mix, e comparação entre sondas purificadas e não purificadas por HPLC.	58
4.5- Comparações entre o método de extração semiautomatizado (Labturbo) e o método de extração manual (Invitrogen) e entre dois equipamentos de PCR em tempo real (LionCube e ABI 7500).....	60
5 - DISCUSSÃO	67
6 - CONCLUSÃO	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ml	Mililitro
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
mm	Milímetro
Aids	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BPL	Boas Práticas de Laboratório
CCEB	Tampão de eluição da coluna de extração
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	DNA complementar
CI	Controle Interno
CP	Controle positivo
Ct	“Ciclo Threshold”- Ciclo Limiar
CV	Coefficiente de variação
DERED	Departamento de Reativos para Diagnóstico
DESVPAD	Desvio-padrão
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucléico)
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
ELISA/EIE	Teste imunoenzimático
FDA	<i>Food and drug Administration</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
GMP	<i>Good Manufacturing practices</i>
H1N1	Hemaglutinina do tipo 1 e neuraminidase do tipo 1
H2N2	Hemaglutinina do tipo 2 e neuraminidase do tipo 2
H3N2	Hemaglutinina do tipo 3 e neuraminidase do tipo 2
HCV	Virus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
IBMP	Instituto de Biologia Molecular do Paraná
IOC	Instituto Oswaldo Cruz

IVD	<i>in vitro diagnostics</i>
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
MP(M1)	<i>Matrix Protein</i>
MS	Ministério da Saúde
NTC	<i>No template control</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Polimerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido Ribonucleíco)
RNP	Rnase P
RT	<i>Reverse transcriptase</i> (Transcriptase Reversa)
SRH	hemólise radial simples
SUS	Sistema Único de Saúde
T _m	Temperatura de melting
WHO	World Health Organization
PB1	Polimerase básica 1
PB2	Polimerase Básica 2
NP	Nucleoproteína
NS	Proteína não-estrutural
NA	Neuraminidase
M1	Proteína de Matriz
HA	Hemaglutinina
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1:** Estrutura do vírus da influenza, com a visualização das proteínas hemaglutinina, neuraminidase e M2(canal iônico), membrana, complexo da RNA polimerase e complexo de nucleoproteína, além de todos os genes (1 a 8) que compõem o vírus da influenza A e B.....02
- Figura 1.2:** Ciclo da replicação do vírus Influenza: A) o hospedeiro é contaminado pelas vias aéreas. B) o vírus adere à célula, via ácido siálico. C) este sofre endocitose, entrando no citoplasma da célula. D) liberação do RNA viral no citoplasma. E) o RNA viral entra no núcleo. F) O RNA é transcrito. G) Ocorre a formação de complexos de ribonucleoproteínas no citoplasma. H) Formação de uma nova partícula viral. K) com a nova partícula viral formada, esta reinicia o ciclo em uma nova célula.05
- Figura 1.3:** *Antigenic drift* e *antigenic shift* , permitindo a visualização de pequenas mutações(*antigenic drift*) e a formação de novas cepas(*antigenic shift*).....06
- Figura 1.4:** Figura que ilustra a formação da nova linhagem de influenza A H1N1, com a constituição do recombinante quádruplo, pois continha genes PB2 e PA provenientes da infecção ocorrida em 1998, gene PB1 da pandemia de 1968, genes HA, NP e NS da linhagem norte-americana de 1918 e genes NA e MA originários da proteína de matriz provenientes da linhagem eurásiana de 1979.....08
- Figura 1.5:** Distribuição dos casos de H1N1 durante a epidemia. Situação em agosto de 2009. Fonte: http://flutracker.rhizalabs.com/flu/by_status_and_num.html
- Legenda:** Em laranja, casos confirmados; Em vermelho, óbitos confirmados.....12
- Figura 1.6:** foto de isolamento do Vírus influenza em ovo.13
- Figura 1.7:** Sistema TaqMan®: A) Desnaturação das fitas do cDNA. B) Anelamento dos iniciadores Forward e Reverso e da sonda marcada com um silenciador ("quencher") na ponta 3' e um reporter na extremidade 5', específicos para a região alvo a ser amplificada. Neste momento a sonda encontra-se em equilíbrio

(Fenômeno FRET). C) Extensão da região alvo. Ocorre a elisão da sonda pela enzima *Taq* DNA polimerase, resultando na separação dos corantes repórter e silenciador com subsequente emissão de fluorescência do repórter, gerando assim um aumento de emissão de fluorescência, sendo esta detectada.18

Figura 1.8: Modelo esquemático de um resultado de PCR em Tempo Real, onde fica visualizada a linha do *threshold* e o *baseline* (índice de fluorescência basal da reação).20

Figura 3.1: Fluxograma da cadeia de ações para desenvolvimento de ensaio molecular. Foram avaliadas as regiões alvo conservadas, métodos e equipamentos de extração e PCR em tempo real, além de insumos para a reação de PCR em tempo real. Para isso foram avaliadas as questões de propriedade intelectual, além da rastreabilidade, sensibilidade, custo, assistência técnica e facilidade para o manuseio dos equipamentos.....28

Figura 3.2: Equipamento de extração Maxwell®16 da empresa Promega.32

Figura 3.3: Equipamento de extração NucliSens miniMAG® (BioMeiriux).32

Figura 3.4: Equipamento de extração MagMax® (Applied Biosystems).....33

Figura 3.5: Equipamento de extração QIAcube® da empresa QIAGEN.34

Figura 3.6: Equipamento de extração LabTurbo 36 C, da Fabricante BioTools.35

Figura 3.7: Descrição dos equipamentos utilizados, insumos de extração e de RT-PCR dos protocolos preconizados pelo CDC e IBMP.41

Figura 4.1: Resultados das três extrações realizadas com as médias, desvios-padrão (DESVPAD) e o coeficiente de variação (CV) dos protocolos sugeridos.....41

Figura 4.2: Resultados obtidos com o oligonucleotídeo RNP e H1N1 (demonstrado nos quadros 4.7 e 4.8), com as respectivas porcentagens de contaminação obtida

nas alíquotas de CCEB e SM nos testes realizados entre as limpezas mecânicas sugeridas no protocolo descrito na metodologia, com suas respectivas porcentagens.53

Figura 4.3: Gráfico com os resultados positivos para o oligonucleotídeo 1(H1N1\MP), com os respectivos fatores de diluição em ordem crescente. Legenda ao lado. LC-lioncube, ABI-ABI 7500.62

Figura 4.4: Gráfico com os resultados positivos para o oligonucleotídeo 1(MP\RNP), com os respectivos fatores de diluição em ordem crescente. Legenda ao lado. LC-lioncube, ABI-ABI 7500.62

Figura 4.5: Gráfico com os resultados positivos para o oligonucleotídeo 1 (H1N1\MP), com os respectivos fatores de diluição em ordem crescente. Legenda ao lado. LC-lioncube, ABI-ABI 7500.63

Figura 4.6: Gráfico com os resultados positivos para o oligonucleotídeo 1 (H1N1\MP), extraídos por extração manual com os respectivos fatores de diluição em ordem crescente. Legenda ao lado. LC-lioncube, ABI-ABI 7500.64

Figura 4.7: Gráfico com os resultados positivos para o oligonucleotídeo 2(MP\RNP), extraídos por extração manual com os respectivos fatores de diluição em ordem crescente. Legenda ao lado. LC-lioncube, ABI-ABI 7500.64

Figura 4.8: Gráfico com os resultados positivos para o oligonucleotídeo 1 (H1N1\RNP), extraídos por extração manual e amplificados com sondas purificadas com os respectivos fatores de diluição em ordem crescente. Legenda ao lado. LC-lioncube, ABI-ABI 7500.65

Figura 4.9: Gráfico com os resultados positivos para o oligonucleotídeo 1 (H1N1\RNP), extraídos por extração manual e semiautomatizada, e amplificados com sondas purificadas com os respectivos fatores de diluição em ordem crescente. Legenda ao lado.66

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.1:** Comparação entre os subtipos A, B e C do vírus influenza, em relação a genoma, estrutura, hospedeiro, evolução e características epidemiológicas.01
- Quadro 3.1:** Matrizes de possibilidades automáticas e semiautomatizadas de extração, com suas respectivas metodologias e informações analisadas.30
- Quadro 3.2:** Sequências dos iniciadores Forward (F) e Reverse (R) e sondas dos oligonucleotídeos usados neste trabalho. Todas estão colocadas na direção 5´3´
Sondas: H1N1- sonda específica para influenza pandêmico, SwINFA- sonda específica para influenza sazonal, MP- sonda específica para gene da proteína de matriz e RNP- Sonda específica gene RNaseP. (-) significa que não utiliza essa sonda em sua combinação para diagnóstico. Conjunto de oligonucleotídeos usados no trabalho.....37
- Quadro 3.3:** Concentrações necessárias para uma reação de PCR em tempo real padronizada neste trabalho na proposta de produto efetuada no trabalho. Todos os insumos usados são oriundos da transferência de tecnologia da empresa BioTools para o IBMP.38
- Quadro 3.4:** reagentes e volumes necessários para a realização da reação de PCR em tempo real conforme protocolo CDC.41
- Quadro 4.1:** Resumo das informações prestadas pelas empresas participantes, e dos critérios determinantes observados. Legenda: IVD- *In vitro diagnostic*, BPF- Boas práticas de fabricação, ISO- International Organization for Standardization, BR-Brasil.Legenda:rç-reações; Transf. De tec- Transferência de tecnologia.....43
- Quadro 4.2 :** Resultados Discordantes Obtidos com os Oligonucleotídeos Específicos para H1N1 Pandêmico em 2010 (IBMP) em relação aos resultados previamente obtidos com o padrão de referência CDC2009. Resultado expresso em número de amostras discordantes. (-)- nenhuma discordância.45

Quadro 4.3: Resultados Discordantes Obtidos com os Oligonucleotídeos Específicos para H1N1 Pandêmico em 2010 (IBMP) em relação aos resultados previamente obtidos com o padrão de referência CDC2009. Resultado expresso em número de amostras discordantes.45

Quadro 4.4: Resultados Discordantes Obtidos com os Oligonucleotídeos Específicos para H1N1 Pandêmico em 2010 (IBMP) em relação aos resultados previamente obtidos com o padrão de referência CDC2009 . Resultado expresso em número de amostras discordantes.46

Quadro 4.5: Resultados Discordantes Obtidos com os Oligonucleotídeos Específicos para H1N1 Pandêmico em 2010 (IBMP) e 2009 (CDC) com o duplex H1N1/RNP (H1N1 IBMP) e com os singleplex swH1N1 E swINFA (H1N1 CDC) realizados em 2009. Resultado expresso em número de pacientes discordantes.47

Quadro 4.6: Resultados Discordantes Obtidos com os Oligonucleotídeos Específicos para H1N1 Pandêmico em 2010 (IBMP) e 2009 (CDC) do duplex MP/RNP E INFA+MP/RNP (MP IBMP, INFA+MP IBMP) e com o singleplex INFA (INFA CDC) realizado em 2009. Resultado expresso em número de pacientes discordantes.48

Quadro 4.7: Resultados das três extrações realizadas com 5 duplicatas das amostras positivas com as médias, desvios-padrão (DESVPAD) E o coeficiente de variação (CV) dos protocolos sugeridos.48

Quadro 4.8: Resultados obtidos com o oligonucleotídeo RNP nos testes realizados entre as limpezas mecânicas sugeridas no protocolo descrito na metodologia, com suas respectivas porcentagens. Amostra: tampões CCEB e meio de cultura SM. ...52

Quadro 4.9: Resultados obtidos com o oligonucleotídeo H1N1 nos testes realizados entre as limpezas mecânicas sugeridas no protocolo descrito na metodologia, com suas respectivas porcentagens. Amostra: tampões CCEB e meio de cultura SM. ...52

Quadro 4.10: Resultados obtidos com os oligonucleotídeos H1N1/RNP e MP/RNP no protocolo de teste realizado com pool positivo e alíquotas de CCEB. Os resultados estão expressos em Ct.54

Quadro 4.11: Resultados obtidos com os oligonucleotídeos H1N1/RNP e MP/RNP nos protocolos de testes realizados com pool positivo e negativo. A referida tabela demonstra o resultado das quatro repetições propostas no protocolo detalhado acima. Os resultados em vermelho indicam a amplificação de amostras negativas. Os resultados estão expressos em Ct.55

Quadro 4.12: Resultados obtidos com os oligonucleotídeos H1N1/RNP e MP/RNP no protocolo de teste número cinco preconizado acima e realizado com pool positivo e alíquotas de CCEB. Os resultados estão expressos em Ct.56

Quadro 4.13: Resultados obtidos nas 12 extrações realizadas no tópico 4.3, com as respectivas amostras utilizadas e resultados obtidos.57

Quadro 4.14: Condições de concentrações de $MgSO_4$, dNTP, primers, sondas, *Taq* polimerase(*Taq*) e Reverse transcriptase(RT) utilizadas nos testes realizados.58

Quadro 4.15: Resultados obtidos em PCR em tempo real realizado com as condições de master mix descritas no quadro 4.14 com sondas não purificadas para o oligonucleotídeo H1N1. Resultados expressos em Ct. Na condição 4 não houve amplificação. Os resultados estão expressos em Ct. Em azul, a melhor condição verificada entre todas apresentadas.56

Quadro 4.16: Resultados obtidos em PCR em tempo real realizado com as condições de máster mix descritas no quadro 4.14 com sondas não purificadas para o oligonucleotídeo RNP. Resultados expressos em Ct. Na condição 4 não houve amplificação. Os resultados estão expressos em Ct. Em azul, a melhor condição verificada entre todas apresentadas.59

Quadro 4.17: Resultados obtidos em PCR em tempo real realizado com as condições de máster mix descritas No quadro 4.14 com sondas purificadas para o

oligonucleotídeo H1N1. Resultados expressos em Ct. Na condição 4 não houve amplificação. Os resultados estão expressos em Ct. Em azul, a melhor condição verificada entre todas apresentadas.59

Quadro 4.18: Resultados obtidos em PCR em tempo real realizado com as condições de master mix descritas No quadro 4.14 com sondas purificadas para o oligonucleotídeo RNP. Resultados expressos em Ct. Na condição 4 não houve amplificação. Os resultados estão expressos em Ct. Em azul, a melhor condição verificada entre todas apresentadas.60

Resumo

O uso de métodos moleculares tem sido apontado como uma das principais ferramentas para o diagnóstico de doenças infecciosas. Dentre as técnicas disponíveis, a PCR em tempo real tem sido uma das mais amplamente utilizadas. A partir dos achados das inúmeras pesquisas desenvolvidas em virtude da epidemia de Influenza A H1N1 em 2009, tal metodologia foi preconizada pelo CDC como sendo a mais eficiente para a confirmação desta patologia na população. A rápida disseminação da epidemia de 2009, em território Brasileiro, evidenciou a necessidade de adoção de uma alternativa de teste em âmbito nacional, cujos custos fossem mais compatíveis com os recursos de que dispõe o Sistema Único de Saúde (SUS). Esta dissertação buscou estabelecer um protótipo de produto para a Vigilância epidemiológica de Influenza A H1N1 a partir de uma plataforma de PCR em Tempo Real, visando contribuir para o estabelecimento de uma rede de vigilância epidemiológica baseada em ensaios moleculares, com a definição de uma matriz de extração semiautomatizada e um equipamento para a realização de PCR em Tempo Real. Este trabalho foi desenvolvido por meio da comparação de matrizes de extração e de equipamentos de PCR em tempo real dos principais fornecedores internacionais. A empresa que obteve a melhor avaliação segundo os critérios descritos foi a Biotools®, por ter apresentado uma proposta competitiva quanto aos custos das plataformas e insumos necessários, além de um atraente pacote de transferência de tecnologia. Após a definição dos equipamentos e insumos, foi iniciada a aferição de um protótipo de modelo nacionalizado de diagnóstico. Em paralelo, buscou-se ainda a melhoria do desempenho do modelo brasileiro, com a avaliação de diferentes composições da mistura de reação, tendo sido também testadas regiões genômicas diferentes daquelas do padrão de referência para o diagnóstico, além da possibilidade do uso de sondas purificadas. Com base nos resultados obtidos, observou-se que a extração semiautomatizada e aquela realizada pelo método manual apresentam um padrão semelhante de eficiência. Também foi comprovada a capacidade de extração do equipamento, inclusive em diluições de amostra pura até uma concentração de 1024 vezes, além da eficiência da purificação de sondas pela técnica de HPLC (High-performance liquid chromatography). Ficou evidenciada a equivalência da reação de PCR em tempo real desenvolvida pelo consórcio IBMP/Bio-Manguinhos quando comparada à reação de PCR em tempo real desenvolvida pelo CDC-EUA, considerado padrão de referência para o diagnóstico molecular de influenza A H1N1. Concomitantemente, o modelo de equipamentos da Biotools(Labturbo/Liongene) oferece, como vantagens, a possibilidade de eliminar a etapa manual de extração indicada pelo protocolo do CDC, e de agregar ao processo a realização de uma extração semiautomatizada, o que facilita a execução do protocolo e amplia o quantitativo de amostras que podem ser examinadas a cada ciclo de trabalho.

Abstract

Nowadays, molecular tools appear as the main alternatives for diagnosis of infectious diseases. Among the available techniques, Real Time PCR (RT-PCR) has been widely used, coupled to extraction matrices. In view of the findings obtained from several researches conducted due to the Influenza A H1N1 epidemic, this technique is considered by the CDC as the most efficient method to confirm this pathology in an affected population. The rapid expansion of the 2009 epidemic in Brazil evidenced the need of a nationalized alternative diagnostic option, without requiring materials from international (foreign) suppliers, and that could be cost-effective to Brazilian National Health System (SUS). The present work aimed at the establishment of a product prototype that could meet such requirements. The choice of an instrument setting based on the Real Time PCR (RT-PCR) platform contributes to an epidemiological surveillance network of molecular assays, and enhances Bio-Manguinhos participation in this field. Other factors that were taken into account concern the economic viability of such instruments, as well as the respective installation and validation protocols and clearance by the National Sanitary Surveillance Agency (ANVISA). According to the aforesaid criteria, the best ranked supplier was BioTools Company, which presented a competitive proposal for cost of platform and consumables, as well as an attractive technology transfer proposal. Different formulations of the reaction mixture were evaluated in order to improve the test performance. It was found that the Real Time PCR (RT-PCR) assay developed by the IBMP/Bio-Manguinhos consortium presented a better efficacy than that of the CDC-USA, which is the reference standard for Influenza A H1N1 molecular diagnosis. Furthermore, BioTools instruments, which were chosen for the tests, have the advantage of eliminating the manual extraction step in the CDC protocol and include a semi-automated extraction, which facilitates the performance and increases the amount of samples processed (throughput of samples).

1. INTRODUÇÃO

1.1. Influenza

1.1.1. Estrutura do vírus

O vírus da Influenza (figura 1.1) pertence à família *Orthomyxoviridae*, já tendo sido isoladas diferentes linhagens dos subtipos A, B e C. Os Vírus da Influenza são partículas envelopadas de RNA, segmentado, de fita simples e sentido negativo, sendo os subtipos A e B mais relevantes em humanos, como agentes causadores da doença. Dentre os três, o Vírus da influenza A é o que apresenta a maior variabilidade e o maior potencial infeccioso. De fato, ele é muito suscetível a alterações morfológicas, já que, no hospedeiro, forma uma população heterogênea de pequenas partículas esféricas, cujo diâmetro varia de 80 a 120 nm (Forrest e Webster, 2010, McHardy, 2009, Sullivan et al, 2009).

A estrutura e o funcionamento das proteínas codificadas pelas 8 estruturas genômicas já foram bem descritos na literatura. A exceção consiste no subtipo C, que possui apenas 7 estruturas genômicas (Nicholson et al, 1998). O quadro 1.1 demonstra as diferenças entre os 3 subtipos de Influenza, bem como os mecanismos de evolução genética/antigênica por eles utilizados. Os mecanismos de *Antigenic drift* e *Antigenic shift* serão detalhados no item 1.1.3.

Quadro 1.1: Comparação entre os subtipos A, B e C do vírus influenza, em relação a genoma, estrutura, hospedeiro, evolução e características epidemiológicas.

	Influenza A	Influenza B	Influenza C
Genoma	8 segmentos	8 segmentos	7 segmentos
Estrutura	11 proteínas	11 proteínas	9 proteínas
Hospedeiro	Humanos, suínos, equinos, aves, outros mamíferos marinhos e terrestres	Humanos, mamíferos marinhos	Humanos e suínos
Evolução genética/antigênica	Antigenic shift e drift	Antigenic drift	Antigenic drift
Características epidemiológicas	Causa epidemias e pode causar pandemias	Causa epidemias e não causa pandemias	Sem sazonalidade marcada

Fonte: www.medicinanet.com.br/influenza

O genoma do vírus da influenza apresenta polaridade negativa, ou seja, é a fita de RNA complementar ao genoma que será sintetizada na célula infectada que desempenhará o papel de RNA mensageiro. Os segmentos de RNA genômico da influenza A codificam as seguintes proteínas: três polimerases (PB1, PB2 e PA), hemaglutinina (HA), nucleoproteína (NP), neuraminidase (NA), proteínas da matriz (M1) e canal iônico (M2), e proteínas não-estruturais (NS1 e NS2) (figura 1.1).

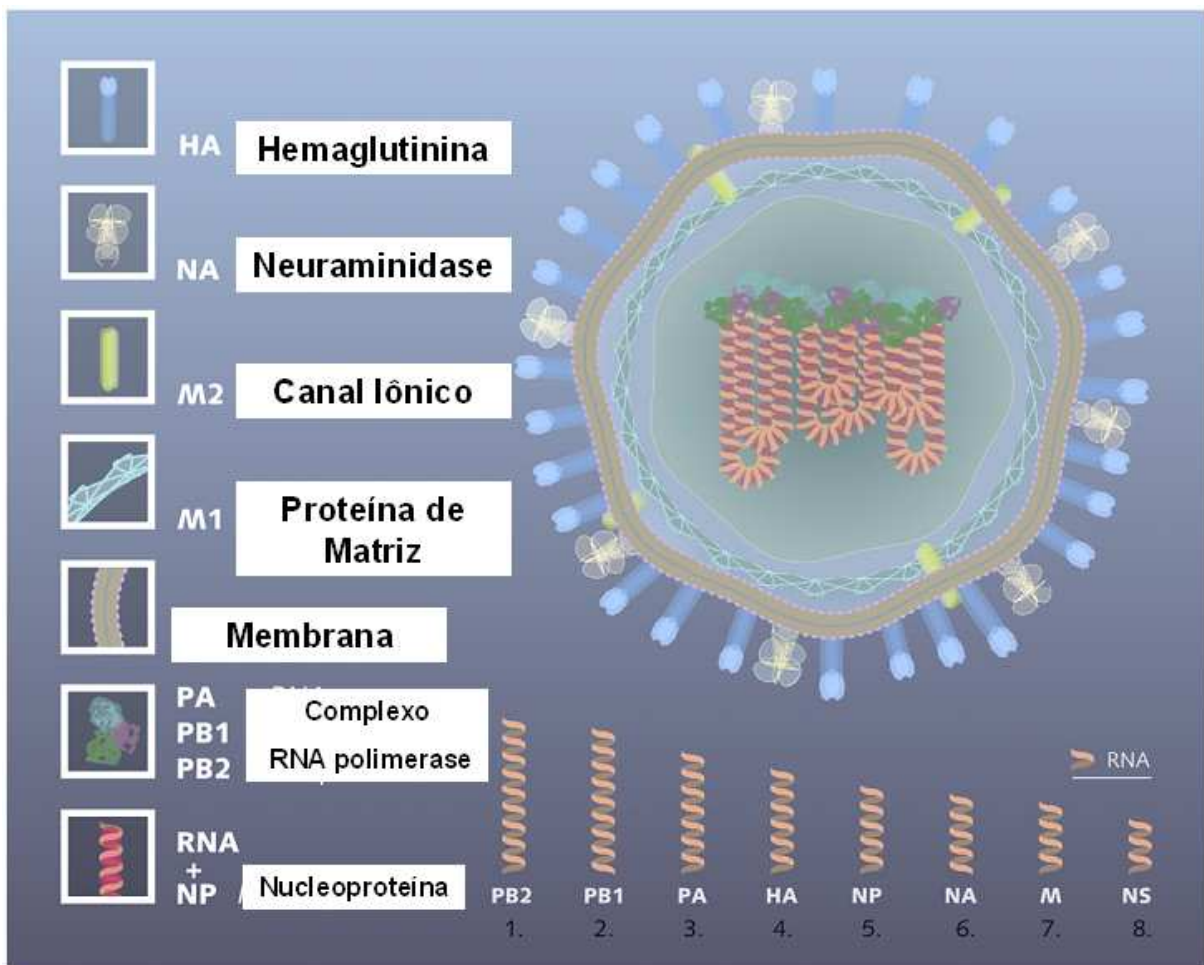


Figura 1.1: Estrutura do vírus da influenza, com a visualização das proteínas hemaglutinina, neuraminidase e M2 (canal iônico), membrana, complexo da RNA polimerase e complexo de nucleoproteína, além de todos os genes (números 1 a 8) que compõem o vírus da influenza A e B. Adaptado de Mchardy, 2009

O vírus da influenza A ainda é subdividido de acordo com as características estruturais e antigênicas da HA e NA. São conhecidas, atualmente, 16 variantes de HA e 9 de NA. A determinação da variante antigênica da HA e da NA permite caracterizar as diferentes cepas isoladas, sendo indicada por um número de 1 a 16,

após a letra H, no caso da hemaglutinina; e por um número de 1 a 9, acompanhado da letra N, para a neuraminidase (Nicholson et al, 1998).

A nomenclatura-padrão do vírus inclui o gênero do vírus (gênero A), sua origem geográfica, o número da linhagem, ano e o subtipo da linhagem viral. Como exemplo, por ter a linhagem de influenza A H1N1 causadora da pandemia de 2009 ter sido isolada na Califórnia, em meados deste mesmo ano, ficou designada A/Califórnia/04/2009(H1N1) (Nicholson et al, 1998, McHardy,2009).

A natureza fragmentada do material genético do vírus influenza induz a altas taxas de mutação e a uma capacidade de realizar rearranjos, em especial, na fase de replicação. Essas mutações, que, em geral, são observadas nas duas glicoproteínas de superfície, a saber, a hemaglutinina e a neuraminidase, ocorrem de forma independente e imprevisível, e provocam o aparecimento de novas variantes, dotadas da sua conhecida característica de disseminação fácil e rápida em populações humanas. Essas mudanças podem ser pontuais, ou o seu advento pode resultar da formação de uma nova linhagem, mediante mecanismos de rearranjo (Forrest e Webster,2010)

1.1.2. Ciclo de replicação do vírus.

O ciclo de replicação do vírus da influenza se inicia a partir da entrada do vírus no organismo hospedeiro humano, cuja principal via de ingresso costuma ser o trato respiratório. Sendo replicado no epitélio nasal e na faringe, o vírus, ao longo da evolução da doença, consegue infectar o trato respiratório inferior e os brônquios, além dos alvéolos pulmonares (Forrest e Webster, 2010, McHardy,2009, Sullivan et al, 2010). O mecanismo que permite a entrada na célula consiste na ligação da proteína hemaglutinina ao ácido siálico, disponível na membrana, e, em seguida, na entrada deste no interior da célula, via um endossomo. O vírus Influenza humano tem preferência por resíduos siálicos, que estão ligados à galactose mediante uma ligação alfa2-6. Após a adesão, com a endocitose pela célula hospedeira, é fundamental a liberação das ribonúcleoproteínas virais para o núcleo celular. Entrando no núcleo celular, as subunidades da polimerase (PB1 e PB2) e a nucleoproteína (NP) iniciam a replicação e a transcrição do RNA viral. A proteína PB1 atua por meio da catalisação da adição de nucleotídeos às cadeias de RNA, enquanto que a PB2 é responsável pela ação da endonuclease, responsável pela

geração do iniciador utilizado para a síntese do RNAm. Devido à incapacidade da RNA polimerase de corrigir a fita que está sendo sintetizada, podem haver mutações pontuais. (Loureiro, 2004).

As proteínas nucleares e as de matriz são exportadas para o citoplasma via complexos ribonucleoproteicos, para a produção de novas partículas virais na membrana. A liberação de partículas virais para outras células é realizada e facilitada pela proteína neuraminidase, já preparada para a infecção de novas células (Sullivan et al, 2010).

A saída do vírus da célula ocorre, ainda, por meio da hemaglutinina ligada ao ácido siálico, sendo posteriormente clivada pela neuraminidase, que remove os resíduos de ácido siálico, possibilitando a infecção de novas células. Se, no momento da formação da nova partícula viral, houver uma disponibilidade de genes de mais de um subtipo de vírus influenza, poderá ser observada a formação de um novo vírus rearranjado, gerando uma nova linhagem. Após a clivagem pela neuraminidase, uma nova partícula viral está apta a recomeçar um novo ciclo em uma nova célula, ou a ser expelida novamente pelo sistema respiratório, infectando outros indivíduos (Sullivan et al, 2010) (figura 1.2).

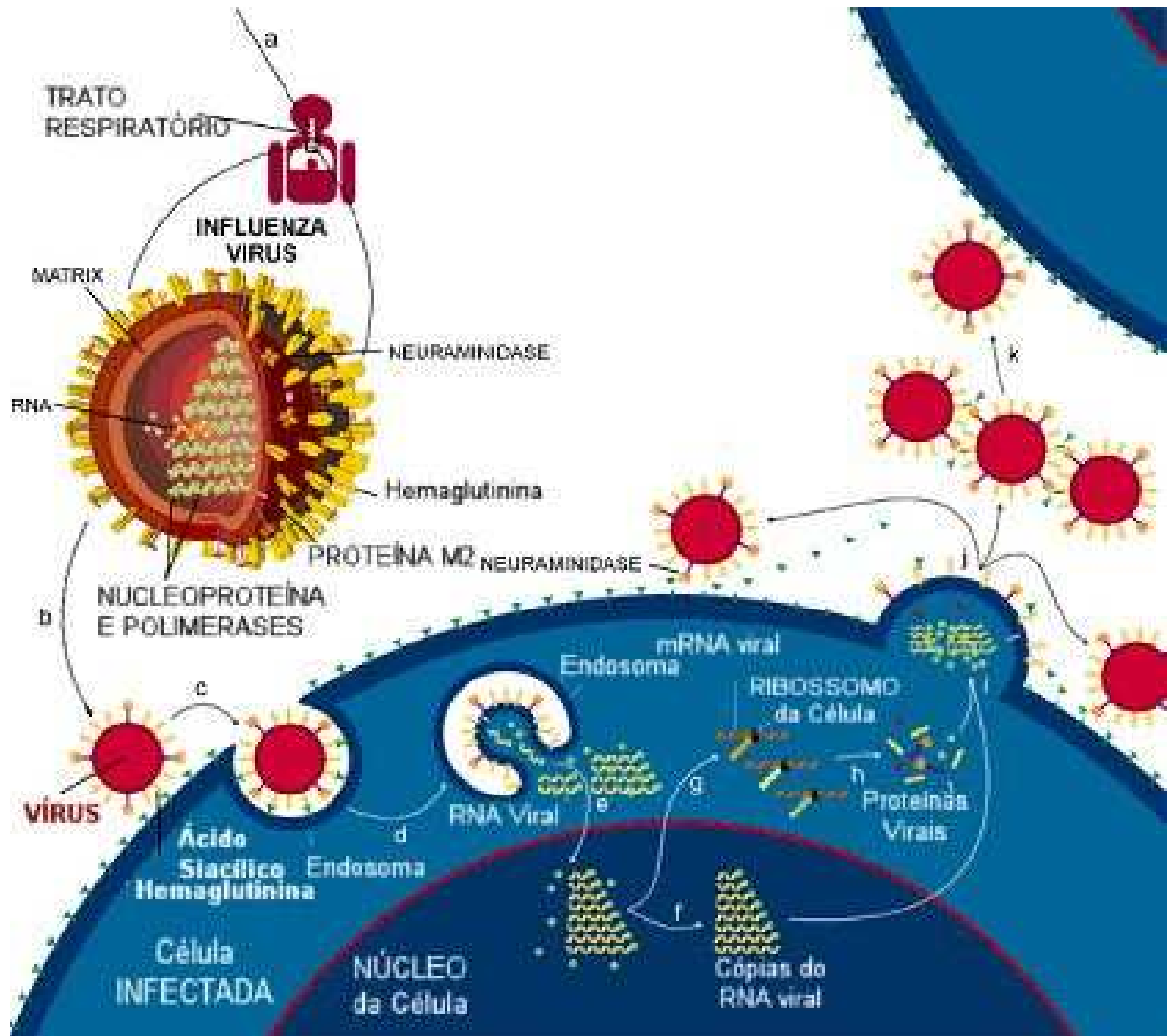


Figura 1.2: Ciclo da replicação do vírus Influenza: A) o hospedeiro é contaminado pelas vias aéreas. B) o vírus adere à célula, via ácido siálico. C) este sofre endocitose, entrando no citoplasma da célula. D) liberação do RNA viral no citoplasma. E) o RNA viral entra no núcleo. F) O RNA é transcrito. G) Ocorre a formação de complexos de ribonucleoproteínas no citoplasma. H) Formação de uma nova partícula viral. K) com a nova partícula viral formada, esta reinicia o ciclo em uma nova célula. Loureiro, 2004

1.1.3. Mecanismos de variações antigênicas.

Os vírus da influenza estão sujeitos a dois tipos de variações antigênicas: **Antigenic drift** e **antigenic shift**. As **antigenic drift** são variações antigênicas menores, que ocorrem a cada 2 ou 3 anos no subtipo A, e a cada 5 ou 6 anos no subtipo B. Estas variações são devidas a mutações pontuais nos segmentos do genoma viral, que ocasionam a mudança de aminoácidos nas glicoproteínas de superfície. As **antigenic shift**, ou rearranjo são variações antigênicas maiores, que estão associadas à substituição completa de um ou mais segmentos do material

genético do vírus, geralmente nas áreas que controlam a produção de glicoproteínas de superfície. Essas alterações decorrem do reagrupamento entre o vírus circulante em humanos e aquele que infecta outras espécies de animais, gerando uma recombinação. Diante dos relatos sobre a ocorrência de fenômenos de **antigenic shift**, observa-se que a maioria da população não possui imunidade para novos vírus, o que leva à rápida disseminação da doença, afetando indivíduos de todas as classes sociais e faixas etárias. As grandes pandemias resultaram de variações antigênicas mais significativas, que acarretaram os episódios da gripe espanhola (1918-1919), da asiática (1957) e da de Hong Kong (1968) (McHardy, 2009, Schnitzler, 2009) (figura 1.3).

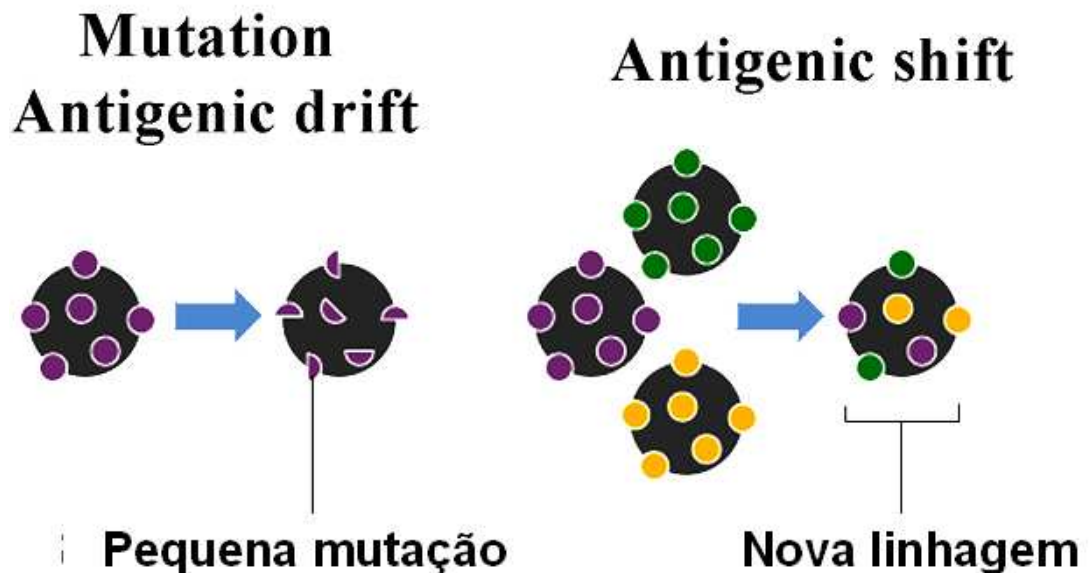


Figura 1.3: *Antigenic drift e antigenic shift*, permitindo a visualização de pequenas mutações(antigenic drift) e a formação de novas cepas(antigenic shift).Do autor

As variações antigênicas são uma das características mais peculiares do vírus da influenza. Ao final de seu ciclo, o vírus recém-formado precisa encapsidar seus genes para sair da célula. Quando dois vírus influenza de linhagens diferentes entram na mesma célula, o rearranjo é um possível mecanismo de atuação do vírus. Seus genes se replicam no núcleo, e saem dele para o citoplasma para serem encapsidados. Todos os 8 genes precisam entrar na nova partícula viral formada, para que ela se torne infecciosa. Para tanto, cada gene possui uma sequência sinal que interage com a proteína M1(MP-proteína de matriz), conferindo a estrutura da partícula do vírus influenza de todos os subtipos. Contudo, este sinal é semelhante, até mesmo em vírus distintos, e os genes de um podem ser empacotados em

conjunto com genes de outro, no fenômeno denominado de rearranjo (Loureiro, 2004).

Embora sejam diversas as possibilidades de rearranjo entre dois vírus, apenas algumas combinações geram vírus viáveis, capazes de ser transmitidos. Dentre estas, algumas podem mesclar características entre os dois vírus de linhagens distintas que sofreram rearranjo, permitindo, por exemplo, que um vírus aviário adquira genes que possibilitem a sua replicação em humanos (Nicholson *et al*, 1998).

Neste momento, o novo vírus recebeu novas Hemaglutinina e Neuraminidase, inéditas para o sistema imune e não reconhecidas por anticorpos, o que lhe confere a capacidade de infectar mais pessoas e de escapar à resposta imune montada por vacinas prévias (Schnitzler, 2009).

Em 1918, o H1N1 aviário passou a circular, tanto em humanos quanto em porcos, gerando linhagens distintas e presentes até hoje. Em 1997, um novo vírus suíno surgiu na América do Norte, a partir de um triplo rearranjo, com uma combinação de genes de Influenza humanos (H3N2 gerado em 1968), suínos e aviários. Trata-se do H1N2 suíno. Os porcos da Europa estavam virtualmente a salvo de gripe até 1976, quando o H1N1 suíno foi trazido em um carregamento de porcos da América do Norte; em 1979, este foi rapidamente substituído por um H1N1 aviário (Nicholson *et al*, 1998).

Na figura 1.4, fica demonstrada a formação da nova linhagem de influenza A H1N1, com a formação do recombinante quádruplo, pois continha genes PB2 e PA provenientes da infecção ocorrida em 1998, gene PB1 da pandemia de 1968, genes HA, NP e NS da linhagem norte-americana de 1918, e genes NA e MA provenientes da proteína de matriz gerados pela linhagem eurásiana de 1979.

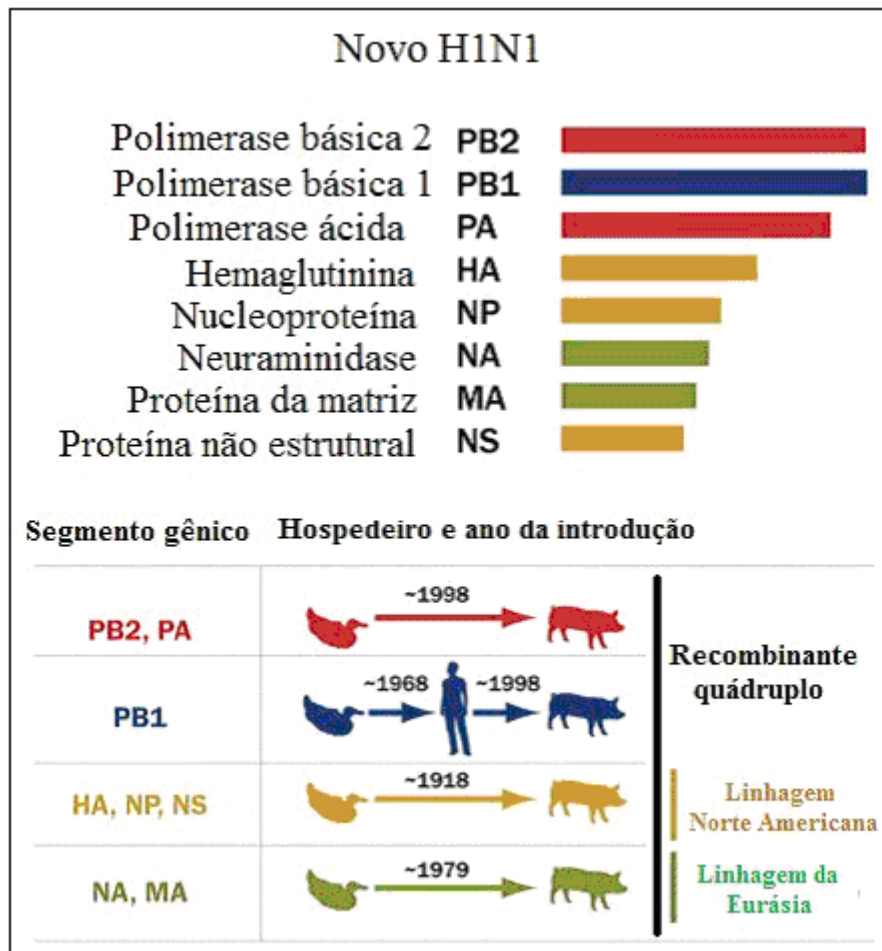


Figura 1.4: Figura que ilustra a formação da nova linhagem de influenza A H1N1, com a constituição do recombinante quádruplo, pois continha genes PB2 e PA provenientes da infecção ocorrida em 1998, gene PB1 da pandemia de 1968, genes HA, NP e NS da linhagem norte-americana de 1918 e genes NA e MA originários da proteína de matriz provenientes da linhagem eurásiana de 1979. adaptado de **Garten *et al.***

1.1.4. Epidemiologia e Histórico das pandemias causadas pelo vírus Influenza A H1N1.

As doenças respiratórias atingem a humanidade desde 412 A.C, e o primeiro relato de tais patologias remonta a descrições de Hipócrates, pai da medicina. Ao longo da antiguidade, surtos de influenza foram registrados em diversos momentos, inclusive durante a Guerra do Peloponeso. O histórico detalhado de epidemias de doenças respiratórias se inicia nos anos de 1173-1174, com a descrição clara dos sintomas apresentados, embora não haja registros de que este surto tenha se tornado uma pandemia. Ao longo dos séculos 14,15 e 16, existem relatos vagos de surtos, inclusive de alguns ocorridos durante a Guerra dos Cem Anos, cujo detalhamento, no entanto, não nos é fornecido pelas fontes históricas. A partir do

século 18, cresce a quantidade de informações sobre a influenza e, no início do século 20, começa a haver uma profusão de trabalhos e estudos sobre o tema. (Nicholson et al, 1998).

O início do histórico das infecções recentes por Influenza A pode ser datado de 1918, com a transmissão de um vírus de origem aviária para humanos, gerando o desencadeamento de uma pandemia que, segundo estimativas, teria dizimado mais de cinquenta milhões de pessoas. Cabe destacar que a maioria dos óbitos ocorreu durante a segunda onda da epidemia, mais precisamente entre os anos de 1919-20, pela ação de um vírus que apresentava mutações derivada de suínos. Esta teoria foi comprovada em estudos posteriores, realizados em ratos. (Nicholson et al, 1998).

Em 1957, foram observados rearranjos, como o da influenza A H1N1, gerando uma nova linhagem denominada H2N2, que foi derivada de uma espécie de H1N1, originário de aves. Em 1968, ocorreu na China, mais especificamente em Hong Kong, uma epidemia com um novo subtipo de vírus, denominado H3N2. Rapidamente essa linhagem foi responsável pela epidemia que se espalhou por todo o sudeste asiático. Em 1976, a linhagem H1N1 reemergiu, e causou uma epidemia nos Estados Unidos, embora tenha se verificado que este vírus não conseguiu se disseminar na população em geral, estabelecendo-se apenas em um quartel em Nova Jersey, onde foi relatada uma morte. Observa-se que, desde 1977, as epidemias sazonais têm apresentado uma alternância entre o vírus da influenza A H1N1 e a linhagem H3N2 (Nicholson *et al*, 1998).

Em 1998, em uma população de suínos da América do Norte, foi identificada uma linhagem dotada de uma combinação tripla de genes virais, com origem em linhagens diversificadas. Esta linhagem continha 5 segmentos clássicos da influenza suína H1N1, embora também incluísse genes da polimerase oriundos de aves e de humanos. O primeiro caso de infecção em humanos causada por essa linhagem foi relatado em 2005, atingindo uma adolescente de 16 anos que havia tido contato com suínos em uma fazenda em Wisconsin, nos EUA. Em relação aos outros 10 casos relatados, as investigações sempre apontaram que os pacientes haviam travado contato com suínos (Nicholson *et al*, 1998).

Em abril de 2009, o CDC confirmou à comunidade científica internacional dois casos de mortes causadas por uma doença respiratória acompanhada de febre, no sul da Califórnia, nos EUA. Nesta mesma época, foram notificados óbitos no México (Províncias de Veracruz e Potosí), com sintomatologia análoga, por infecção pelo

vírus da influenza, do subtipo A, de linhagem H1N1, e cujos genes da linhagem suína circulavam entre porcos desde 1999. Ainda no decorrer da confirmação dos casos, verificou-se que nenhuma das duas pessoas mortas na Califórnia havia tido contato anterior com porcos, o que evidenciou a capacidade de transmissão entre humanos. A linhagem de influenza A H1N1 acima relatada possuía a combinação de 6 segmentos de genes da combinação tripla recombinante suína que circulava desde 1999, além de mais 2 genes derivados da linhagem eurásiana da influenza A H1N1 (Sullivan et al 2009, www.cdc.com/flu).

As pandemias ocasionadas pelo vírus da influenza ocorrem com certa regularidade, embora apresentem uma variação em seu grau de intensidade. As epidemias e pandemias da influenza iniciam-se de forma rápida e inesperada, e atingem seu pico em duas ou três semanas, com uma duração total de 5 a 8 semanas. São fenômenos de rearranjos como os descritos anteriormente que deram origem aos vírus causadores da maioria das pandemias de gripe. Em 1957, um evento de rearranjo com um vírus aviário forneceu novas hemaglutinina e neuraminidase que permitiram ao vírus promover uma infecção mais intensa, na chamada gripe Asiática. Em 1968, novamente em um rearranjo, o vírus adquiriu uma nova Hemaglutinina aviária, e causou a Gripe de Hong Kong (Nicholson *et al*, 1998).

Em 2008, o triplo rearranjado circulante em porcos na América do Norte tornou a se rearranjar com o vírus suíno H1N1 da Eurásia. Ainda não se sabe se este evento ocorreu em porcos ou em humanos. O mais provável é que tenha atingido humanos, pois ainda não encontramos porcos contaminados. Em abril de 2009, uma nova linhagem H1N1 foi detectada em casos relatados na Califórnia, e, algumas semanas depois, houve a explosão da epidemia, cujo início foi oficialmente confirmado no México. O vírus foi identificado como semelhante ao que circulava em suínos. Foi aventada a possibilidade da contaminação de seres humanos, em uma fase inicial, em fazendas de criação de suínos no norte do México. Esse processo teria evoluído para a pandemia, exigindo, assim, uma rápida resposta da comunidade científica, inclusive em relação aos diagnósticos (Schnitzler, 2009).

A maioria dos casos de Influenza A H1N1 com a mutação observada em 2009 apresenta uma sintomatologia parecida com outras linhagens de influenza, como tosse, dor no corpo, acompanhado de febre em alguns casos. A transmissão ocorre sob 3 formas distintas: exposição por contato com pessoa infectada, por aerossóis ou por partículas que possuam contaminação, como a saliva. A contribuição de cada

uma das vias acima mencionadas sofre variações, varia dependendo de fatores como, por exemplo, à distância em relação às pessoas infectadas, além das condições de temperatura e umidade.

O quadro de superinfecção é caracterizado por uma pneumonia grave, podendo evoluir ao óbito. Em geral, a hospitalização de pacientes somente se justifica diante de uma pré-condição existente, como asma, obesidade mórbida, gravidez e patologias, que, de alguma maneira, possam debilitar o sistema imunológico da paciente. No México, os casos fatais foram estimados em 0,4 % dos pacientes infectados, muito próximo ao número verificado no Brasil. Atualmente, a mortalidade causada pelo vírus Influenza A H1N1 e pelas linhagens sazonais está relacionada a esses mesmos percentuais (Schnitzler, 2009).

A estimativa acerca do período de incubação do vírus da influenza é de 1 a 7 dias. O vírus pode ser transmitido desde o primeiro dia de infecção até 1-2 dias após o encerramento da apresentação dos sintomas. Estudos recentes demonstram que 80 % dos pacientes portam o vírus por 5 dias, 40 % por 7 dias e 10 % por 10 dias (Perez-Padilha et al, 2009).

A maioria dos casos ocorre em adultos jovens, com idades entre 12 e 17 anos, embora as infecções mais graves sejam, em sua maioria, relatadas em faixas etárias mais elevadas e, principalmente, em idosos (Perez-Padilha et al, 2009).

O Brasil foi um dos países mais afetados em número de casos em 2009. Segundo um boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, até 1º de agosto de 2009, haviam sido notificados 17.277 casos suspeitos de influenza, dentre os quais apenas 2.959 foram confirmados pela técnica de PCR em tempo real 2.959. Houve confirmação de casos em 1049 municípios do Brasil, assim como um número registrado de 96 óbitos (BRASIL, 2010), conforme demonstrado no mapa pelos pontos em vermelho (figura 1.5).

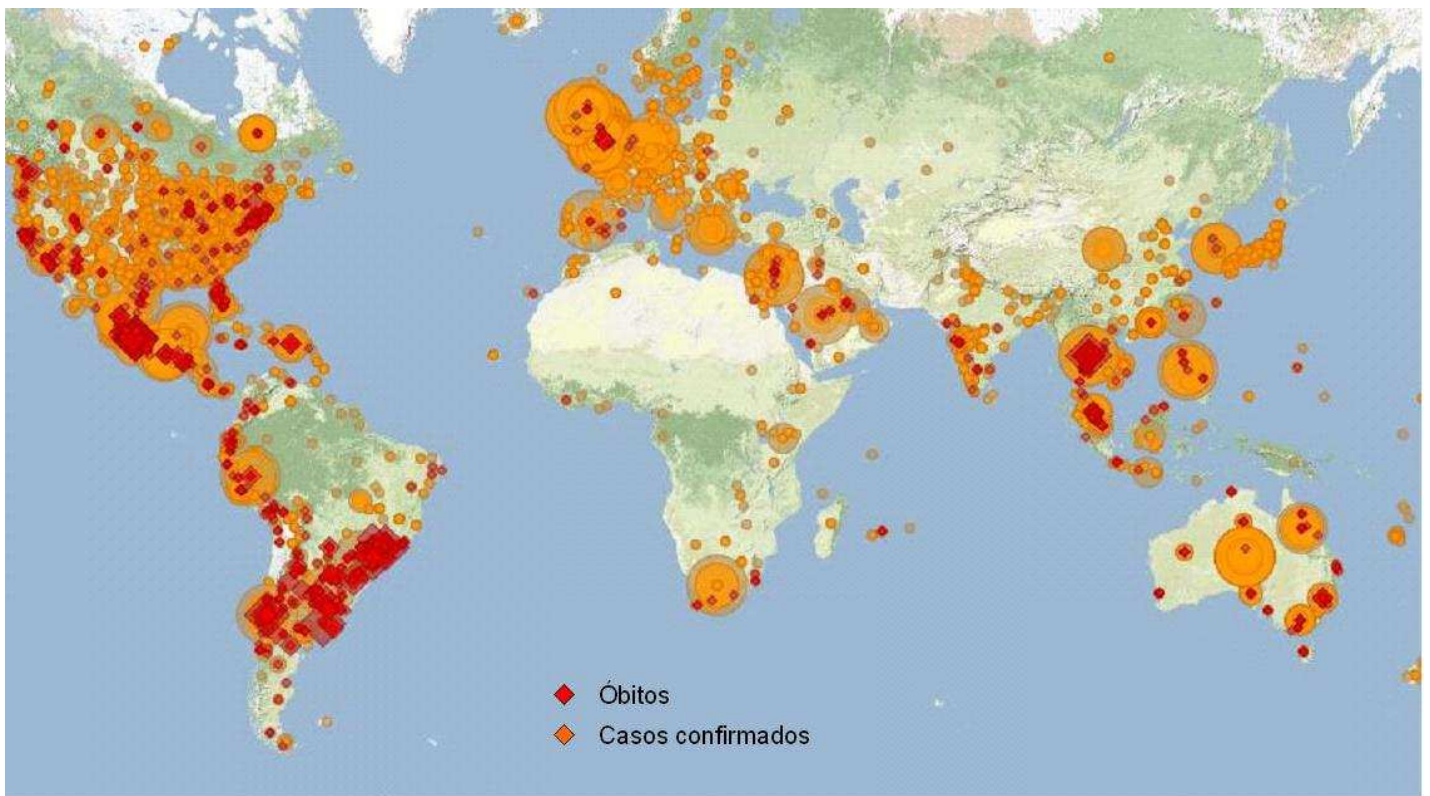


Figura 1.5: Distribuição dos casos de H1N1 durante a epidemia. Situação em agosto de 2009. http://flutracker.rhizalabs.com/flu/by_status_and_num.html. **Legenda:** Em laranja, casos confirmados; Em vermelho, óbitos confirmados.

1.2. Diagnóstico de influenza.

O diagnóstico da influenza deve ser o mais preciso possível, devido à similaridade entre essa patologia e outras causadas por vírus que afetam o sistema respiratório. Embora a administração da terapia antiviral dependesse da confirmação do diagnóstico, nos casos de pandemia, em que as ferramentas diagnósticas disponíveis não eram suficientes, o tratamento tinha de ser iniciado após a simples verificação dos sintomas.

A seguir, passam a ser apresentadas as possibilidades diagnósticas mais frequentes para a confirmação de infecção pela influenza.

1.2.1. Isolamento viral

As amostras coletadas para o isolamento viral devem ser inoculadas em ovos embrionados ou células MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*). Os materiais clínicos preconizados são “swabs” nasofaríngeos, lavado nasal ou traqueal, ou amostra de tecido pulmonar no caso da morte do animal (WHO, 2002), embora o efeito citopático (ECP) seja de difícil visualização ao microscópio em células MDCK. Sete dias após a inoculação, ou assim que for observado um eventual ECP, deve-se coletar o sobrenadante, e realizar o teste de hemaglutinação.

O isolamento viral também pode ser realizado em ovos, para propiciar aumento da concentração de vírus disponíveis. São utilizados três ovos por amostra, inoculando-se 0,1 mL do material na cavidade alantóica, na amniótica, ou em ambas (figura 1.6). Sete dias após a inoculação, é realizada a coleta do líquido alantóico e/ou amniótico, ambos sendo testados para a detecção da presença do vírus, por meio da prova de hemaglutinação (Figura 1.6).

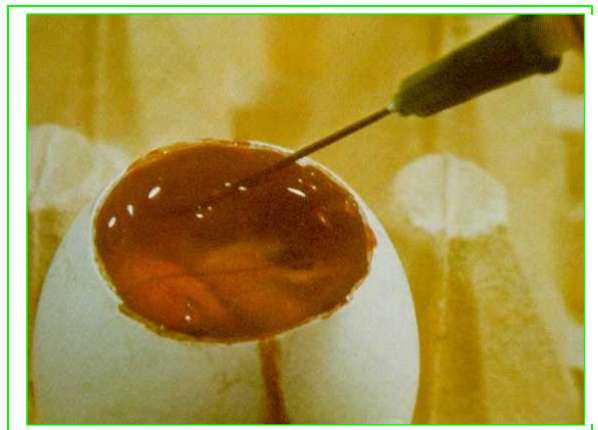


Figura 1.6: foto de isolamento do Vírus influenza em ovo.
Loureiro,2004

1.2.2. Outras possibilidades diagnósticas.

O diagnóstico sorológico deve ser empregado, sempre que possível, para complementar o isolamento, adquirindo uma extrema relevância em casos onde não

tiverem sido coletados materiais clínicos para o isolamento, ou onde o laboratório não dispuser dos equipamentos necessários para tanto (WHO, 2002).

O teste de inibição da hemaglutinação (HI) é utilizado para duas finalidades: a caracterização antigênica das amostras isoladas, e a detecção da presença de Anticorpos contra o vírus da influenza. O uso do HI para o diagnóstico sorológico é realizado em duas etapas. Primeiramente o vírus hemaglutinante é misturado ao anticorpo, onde caso esse seja específico irá se ligar e inibirá sua capacidade de aglutinação. Posteriormente adiciona-se o soro do paciente e se os anticorpos inibirem a reação num determinado momento, o vírus é identificado. A diferença consiste na utilização do soro que se deseja pesquisar sobre a presença de anticorpos, em vez dos soros hiperimunes, e um vírus- padrão, em vez daquele que havia sido isolado.

Na hemólise radial simples (SRH), antígenos virais são misturados a hemácias de carneiro fixadas em agarose contendo fatores de complemento de covaia. Os soros testados são adicionados em poços feitos na agarose, e os anticorpos anti-influenza, atuando em conjunto com o complemento, irão lisar as hemácias, formando um halo claro ao redor do poço, que pode ser medido em mm^2 (WHO, 2002).

No teste de hemaglutinação, o vírus previamente inoculado em ovos é retirado e colocado em conjunto com um concentrado de hemácias. Em caso de positividade da reação, haverá a formação de um precipitado, passível de ser observado a olho nu. Ressalta-se que autores não consideram esse técnica um diagnóstico sorológico, já que não há a formação de um complexo antígeno-anticorpo.

É possível ainda o uso de testes rápidos para influenza, que funcionam com a detecção da nucleoproteína viral e informa resultados em até 30 minutos. Porém estes possuem baixa sensibilidade e podem gerar resultados falsos negativos ou não diferenciar entre as linhagens de Influenza A H1N1.

1.2.3. Diagnóstico molecular.

1.2.3.1 Histórico de técnicas moleculares.

Há mais de 60 anos, a comunidade científica tem trabalhado no aperfeiçoamento de técnicas mais eficientes para o diagnóstico de doenças. O advento da biologia molecular trouxe novas perspectivas no âmbito do desenvolvimento tecnológico de ensaios, como, por exemplo, a identificação de vírus e bactérias e a quantificação destes patógenos. Desde a descoberta da estrutura do ácido nucléico, tem se avançado no ramo das metodologias capazes de realizar a detecção de material genético em diversos tipos de tecidos e fluidos. Ao longo desse processo, foi observada a capacidade de utilização das técnicas de biologia molecular como ferramenta de diagnóstico capaz de ser sensível e eficiente. Dentre as técnicas desenvolvidas na área de diagnóstico, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem se consolidado, nos últimos 20 anos, como uma das ferramentas mais utilizadas e promissoras (Csako, 2006, Ratcliff et al, 2007).

Para a realização de um diagnóstico molecular, devemos contar com um conjunto que contemple a maior eficiência possível de extração e a precisão necessária para detecção de ácidos nucléicos. A utilização de sistemas de PCR em tempo real, em conjunto com um sistema de extração eficiente, possibilitam a realização destas reações, assegurando a eficiência e a acurácia aludidas acima (Yeh et al., 2009).

As técnicas de extração de ácidos nucléicos e sua posterior utilização avançaram consideravelmente, tendo evoluído desde os primeiros métodos com solventes orgânicos e cloreto de cálcio, até a extração por matrizes de fase sólida dos dias atuais, que pode ser realizada por meio da adoção de metodologias diversas (Berensmeier, 2006, Wen et al., 2008).

Concomitantemente a isso, a PCR em Tempo Real também avançou e permitiu o aumento de sensibilidade, reprodutibilidade e especificidade dos ensaios de diagnósticos moleculares, graças ao desenvolvimento de ensaios qualitativos e quantitativos (Yeh et al., 2009). A PCR em tempo real é baseada no método de PCR convencional desenvolvida por Kary Mullins, nos anos 80, que permitiu a amplificação de pequenas quantidades de DNA (Mullins & Faloona, 1987). As estratégias de pesquisa baseadas em metodologias derivadas do PCR permitiram avanços na biologia molecular (Csako, 2006, Buckingham e Flaws,2007).

A PCR convencional consiste em uma reação em que o ácido nucléico é submetido a diferentes temperaturas e tempos variáveis, denominados ciclos. Este processo é determinado por três etapas: desnaturação do ácido nucléico, anelamento dos primers e extensão da cadeia. Na etapa de anelamento, deve-se sempre ter como base o T_m (melting temperature) dos iniciadores, temperatura que determina que 50 % dos oligonucleotídeos iniciadores na reação encontram-se anelados a sua seqüência alvo. Essas etapas ou fases irão se repetir, de acordo com o número de ciclos necessários. Os resultados de PCR convencional são visualizados em um gel (agarose ou acrilamida) onde são avaliadas as amplificações (Mullins & Faloona, 1987).

A PCR em Tempo Real tem como principais características o fato de tratar-se de um método quantitativo e/ou qualitativo, que possibilita a redução do tempo para a obtenção do diagnóstico, graças à eliminação de etapas posteriores ao processamento dos ciclos de reação, como a visualização em gel de agarose (Higuchi et al, 1992, Cikos e Koopel, 2009). Porém, existem algumas desvantagens como, por exemplo, o custo dos equipamentos e dos reagentes envolvidos. Tendo em vista os aspectos acima enumerados, esse método baseado no sistema TaqMan®, apresenta inúmeras vantagens em relação ao PCR convencional, dentre as quais se destacam a redução no tempo de processamento, o aumento na especificidade de reação, na sensibilidade, e a possibilidade de realização de ensaios quantitativos por meio da comparação com curva-padrão com concentrações previamente estabelecidas (Lee et al, 1993, Livak et al, 1995, Freeman et al, 2000, Csako, 2006).

1.2.3.1.1 Técnicas Moleculares

As técnicas de biologia molecular estão sendo cada vez mais usadas, e a reação em cadeia da polimerase (PCR) é o método mais empregado como ferramenta diagnóstica. Porém, com a evolução para a PCR em tempo real, este vem sendo substituído (Vernet, 2004).

Diversos protocolos foram desenvolvidos, com variações em relação ao método de extração do material genético, à concentração de reagentes e as condições de ciclagem térmica. A região a ser amplificada está diretamente

relacionada com os iniciadores utilizados na reação, tornando muito relevante a escolha destes para uma boa sensibilidade e especificidade da reação. Normalmente são utilizados iniciadores específicos para o gene que codifica a glicoproteína hemaglutinina (Fouchier et al, 2000).

Existem outros protocolos de RT-PCR que detectam outros genes, que não a hemaglutinina. Fouchier e colaboradores (2000) desenvolveram um trabalho, mostrando a possibilidade de detectar infecções por qualquer subtipo do vírus influenza, em qualquer espécie animal, por meio da identificação do gene M, que é altamente conservado. Entretanto, não é possível determinar o subtipo do vírus.

Para o diagnóstico de rotina, a Organização Mundial da Saúde recomenda que a detecção e a determinação do subtipo sejam realizadas pelas técnicas de hemaglutinação (HA) e inibição da hemaglutinação (HI). Porém, o uso das novas técnicas moleculares para a detecção direta do vírus na amostra clínica, facilitou a rápida identificação e caracterização genética dos vírus (WHO, 2002).

Um diagnóstico dotado de um grau elevado de acurácia é fundamental para o início da terapia antiviral e para o estabelecimento de políticas de saúde pública. Whiley e colaboradores em 2009 desenvolveram uma possibilidade de diagnóstico usando a metodologia de PCR em Tempo Real baseado no sistema TaqMan®, onde os alvos para o anelamento dos iniciadores seriam os genes da hemaglutinina e a neuraminidase específicas da linhagem circulante. A diferenciação entre as linhagens circulantes A, B e C e as do subtipo Influenza A H1N1 é fundamental para a rapidez e eficiência do diagnóstico.

1.2.3.1.2. Sistema Taqman®

Dentre as possibilidades de sistemas de PCR em tempo real, o sistema TaqMan® é o mais utilizado, sendo composto por um par de iniciadores e uma sonda interna ao fragmento que será amplificado, onde se situa um fluoróforo reporter na extremidade 5' e um quencher na extremidade 3'. Neste momento, a sonda encontra-se em equilíbrio. A sonda *TaqMan*® (específica para o gene de interesse) é marcada duplamente com um corante repórter em uma extremidade e

um corante “silenciador” na outra. Não estando anelado ao alvo, a transferência de energia fluorescente (fenômeno FRET) ocorre de modo a que a emissão pelo repórter seja absorvida pelo silenciador. Quando a sonda encontra-se hibridizada ao alvo e é degradada pela enzima *Taq* DNA polimerase, durante a PCR, os corantes repórter e silenciador são separados, e a emissão de fluorescência do repórter não será mais absorvida pelo silenciador, o que conduz a um aumento de emissão de fluorescência pelo repórter, que a cada ciclo de reação será detectada e quantificada.(figura 1.7)(Lee et al, 1993; Livak et al 1995, Bustin, 2000).

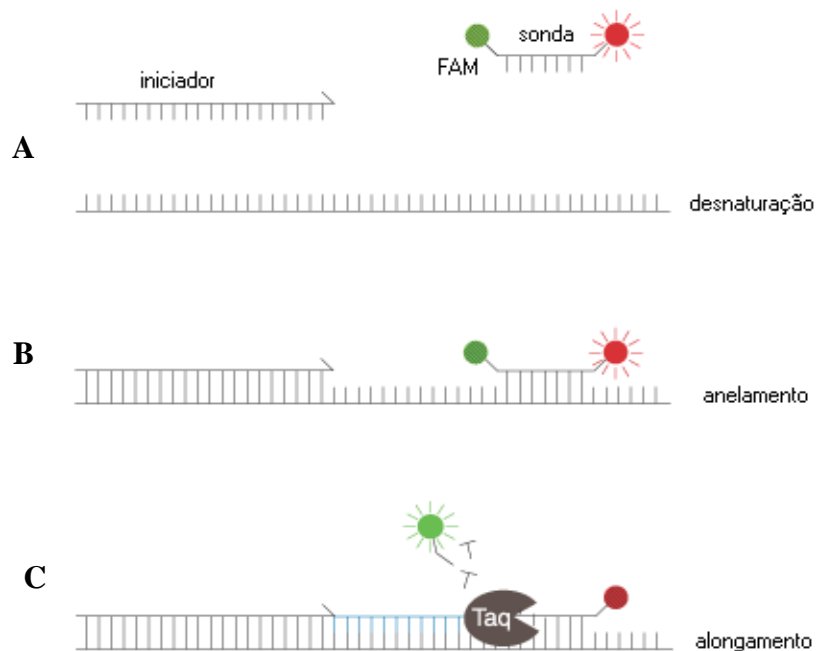


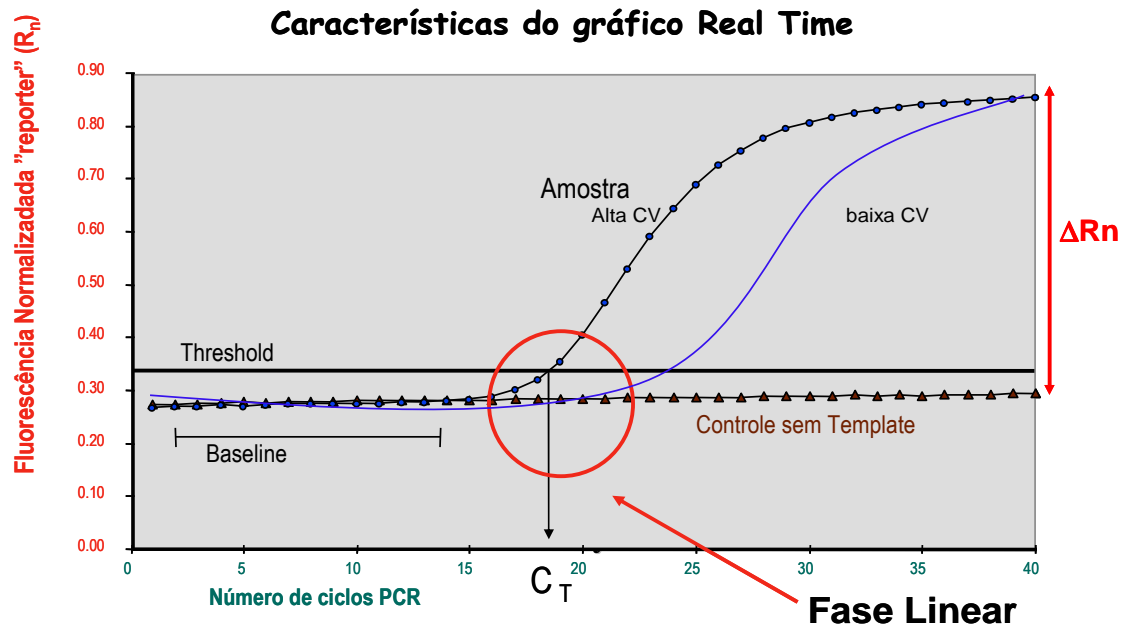
Figura 1.7: Sistema TaqMan®: A) Desnaturação das fitas do cDNA. B) Anelamento dos iniciadores Forward e Reverso e da sonda marcada com um silenciador (“quencher”) na ponta 3’ e um reporter na extremidade 5’, específicos para a região alvo a ser amplificada. Neste momento a sonda encontra-se em equilíbrio (Fenômeno FRET). C) Extensão da região alvo. Ocorre a elisão da sonda pela enzima *Taq* DNA polimerase, resultando na separação dos corantes repórter e silenciador com subsequente emissão de fluorescência do repórter, gerando assim um aumento de emissão de fluorescência, sendo esta detectada. Poersch, 2007.

Quando não há a extensão da região alvo, a sonda permanece íntegra, ocorrendo a Transferência de Energia por Ressonância de Fluorescência (FRET) do fóton, que é liberado pelo fluoróforo para molécula quencher, acarretando o bloqueio desta emissão no sistema. À medida que a enzima *Taq* DNA polimerase com atividade exonucleásica 5’-3’, estende a cadeia e encontra a sonda, que é sequência-específica, e, portanto hibridizada ao alvo, promove a quebra

exonucleásica (elisão) da mesma, separando o fluoróforo do quencher e permitindo, assim, a liberação da fluorescência, com a geração do sinal de amplificação. A fluorescência aumenta a cada ciclo, sendo proporcional à quantidade de produto amplificado (Lee et al, 1993; Livak et al 1995).

O sistema TaqMan® permite o desenvolvimento de ensaios multiplex, graças à possibilidade de acoplamento de diferentes fluoróforos a diferentes sondas. Com efeito, eles emitem fluorescências em comprimentos distintos de onda, tornando viável a detecção diferenciada de cada alvo, e relacionando-os com a fluorescência específica. Vale salientar que o equipamento de PCR em Tempo Real deve dispor dos filtros (emissão e detecção) compatíveis com as fluorescências escolhidas, além de lâmpadas (diodo, branca, laser, etc) para excitação e câmara CCD e/ou fotomultiplicadores para detecção.

O resultado da PCR em Tempo Real é gerado em um gráfico, onde é representado o acúmulo de fluorescência pelo tempo ou número de ciclos da reação (Ct - “Ciclo Threshold”) (Figura 1.8). Este é o ciclo (Ct) onde a fluorescência detectada de uma determinada amostra intercepta a linha de threshold acima do background de fluorescência (Mackay et al., 2002), ou seja, inicia a fase exponencial, permitindo uma quantificação exata e reprodutível do número inicial de ácidos nucleicos presentes na amostra (do material amplificado) (Lee et al, 1993; Livak et al 1995).



C_T é inversamente proporcional a concentração de DNA

Figura 1.8: Modelo esquemático de um resultado de PCR em Tempo Real em escala linear, onde fica visualizada a linha do threshold e o baseline (índice de fluorescência basal da reação). Do Autor.

Os dados brutos gerados em uma reação de PCR em tempo Real devem ser exportados em formatos compatíveis, para análises em programas-padrão como, por exemplo, o Excel, o que oferece, assim, uma gama maior de possibilidades na análise dos resultados. A padronização das análises garante um resultado mais preciso e real, confirmando a credibilidade desta tecnologia, e consolidando-a no cenário de técnicas de diagnóstico molecular.

1.3. Situação da Influenza A H1N1 no Sistema Único de Saúde.

O Instituto Oswaldo Cruz atua como Laboratório de Referência Nacional para Influenza, credenciado pelo Ministério da Saúde, e integra, há mais de 50 anos, a rede da Organização Mundial da Saúde (OMS) de centros nacionais de influenza. A rede nacional de laboratórios de vigilância em influenza também é integrada pelo Instituto Adolfo Lutz (SP) e pelo Instituto Evandro Chagas (PA), que figuram como Laboratórios de Referência Regional do Ministério da Saúde (<http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=2531&sid=9>). O manejo dos pacientes requer ações específicas de biossegurança e cuidados com a

saúde, que geram impactos diretos sobre o atendimento fornecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

Uma resposta laboratorial precisa e rápida certamente favorecerá os usuários deste sistema, possibilitando, ainda, a organização de informações e dados que permitirão uma melhor compreensão epidemiológica da doença. Segundo um boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, foram processadas, de abril de 2009 de fevereiro de 2010, 73.121 amostras com suspeita de influenza A H1N1 pela técnica de PCR em tempo real, tendo sido confirmada a positividade de 28.256 dentre elas (Brasil, 2010). Em relação ao número de óbitos, até o dia 20 de fevereiro de 2010, foram contabilizadas 2091 mortes em decorrência da Influenza A H1N1 nos anos de 2009/2010.

Durante os anos de 2009 e 2010, ficou evidenciada a ineficiência do, fornecimento de insumos pelos fabricantes, o que gerou transtornos na entrega de resultados necessários ao monitoramento da infecção. Nos meses de julho e agosto de 2010, uma amostra levava até 3 meses para ser processada, dando ensejo a um clima de ansiedade na divulgação dos resultados e a um aumento do pânico da população. Acrescente-se a isso que os produtos oferecidos internacionalmente para este diagnóstico, tanto pelo CDC quanto por empresas privadas, não possuem registro junto aos órgãos competentes de vigilância sanitária (ANVISA e FDA). Estes produtos, conforme recomendações dos fabricantes devem ser utilizados exclusivamente em pesquisas, pois são fabricados sem o atendimento às Boas Práticas de Fabricação (BPF) e à certificação necessária.

A situação observada por ocasião da pandemia de H1N1 motivou a tomada de atitudes, tanto na área diagnóstica quanto na terapêutica. No Brasil, os testes de diagnóstico para o vírus Influenza A H1N1 pandêmico eram totalmente dependentes do mercado internacional. Alguns dos insumos utilizados nestes testes são doados pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ou adquiridos de empresas privadas, o que deixa vulnerável o Estado brasileiro, frente às oscilações de custo e de oferta destes produtos, além das dificuldades em assegurar padrões de qualidade dos ensaios *in house*, na execução e resultados destes testes. Durante a pandemia de 2009, a confirmação dos casos suspeitos de influenza A H1N1 era realizada por cultura viral ou por PCR em tempo real, embora o tratamento já fosse

administrado em algumas faixas etárias, independentemente do diagnóstico confirmado de infecção pela linhagem descrita acima.

Na época, ainda se questionou que o modelo de diagnóstico por PCR em tempo Real desenvolvido pelo CDC apresentava falhas, e que outros desenhos de alvos moleculares começavam a ser descritos na literatura, como alternativa ao modelo estabelecido e utilizado.

Foi diante da percepção do cenário mencionado acima que Unidades da Fundação Oswaldo Cruz, em parceria com o IBMP (Instituto de Biologia Molecular do Paraná), resolveram instituir uma força-tarefa para o desenvolvimento de um diagnóstico nacional, capaz de modificar esta situação em curto e médio prazo. Este teste diagnóstico nacional apresentará certas características como, por exemplo: sua produção em condições de BPF, sua oferta aos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENS) juntamente com os equipamentos que compõem uma plataforma tecnológica semiautomática, com formação e capacitação de recursos humanos, além de assistência técnica e científica. Tais condições aprimorariam a competência técnica destes laboratórios, assim como a qualidade e a quantidade de diagnósticos.

Esse sistema nacionalizado poderá ser utilizado pelos Laboratórios, também em período pós-pandemia, para o diagnóstico de outros agravos, tais como: Dengue, Febre Amarela, Hepatite C (HCV), Hepatite B (HBV), Leishmaniose, Doença de Chagas, Hantavirose, Rickettsiose, Leptospirose e outros. O consórcio formado pela Fiocruz/Bio-Manguinhos e IBMP já vem trabalhando em um sistema de diagnóstico molecular para diferentes agravos, sob condições padronizadas e de BPF, e cujo baixo custo permita a sua incorporação e disponibilização ao SUS, promovendo, assim, a equidade entre os usuários deste sistema.

O presente trabalho buscará estabelecer um protótipo de produto para Vigilância epidemiológica de Influenza A H1N1 com base na plataforma de PCR em Tempo Real, visando consolidar a atuação de Bio-Manguinhos no referido projeto tecnológico e ainda, contribuir para o estabelecimento de uma rede de vigilância epidemiológica baseada em ensaios moleculares.

1.4. Atuações de Bio-Manguinhos no cenário nacional

Em relação à realidade da saúde pública brasileira, o diagnóstico e as notificações de doenças têm se apresentado como uma barreira de difícil superação, pois o cenário nacional não propicia a realização do diagnóstico e a correta comunicação de ocorrências, e nem as possíveis ações envolvidas no combate dos problemas relatados.

Uma rede nacional de vigilância epidemiológica padronizada e dotada de insumos nacionalizados poderia facilitar esse trabalho, aumentando seu escopo de atuação. Por outro lado, a diversidade de tipos de ensaios “*in house*” existentes não permite a padronização dos resultados obtidos, impedindo, assim, a obtenção do verdadeiro retrato da situação nacional.

Desde a década de 80, Bio-Manguinhos tem atuado no fornecimento de reativos para diagnóstico em ações conjuntas com o Ministério da Saúde. Possui um papel estratégico, já que, em muitos casos, esta Instituição é a única a fornecer ferramentas diagnósticas para determinadas patologias.

No atual âmbito do desenvolvimento em Reativos para Diagnóstico, Bio-Manguinhos vem atuando em testes moleculares baseados na plataforma de PCR em Tempo Real, como Kit NAT multiplex HIV/HCV, Carga Viral HIV e HCV e ensaio qualitativo para Dengue, e, com isso, vem agregando conhecimento e capacitação tecnológica para padronização de seus ensaios moleculares, em consonância com as mais modernas tecnologias de diagnóstico existentes.

Bio-Manguinhos já obteve a transferência de tecnologia da enzima *Taq* DNA polimerase e tampão de reação para PCR em Tempo Real, podendo contribuir para a produção nacionalizada de ensaios/kits diagnósticos para diferentes patógenos, com base nesta tecnologia, gerando a possibilidade de responder mais eficientemente, com menor custo e em menor tempo às demandas que lhe forem apresentadas pelo Ministério da Saúde.

Podemos ilustrar a importância da atuação do Desenvolvimento Tecnológico de Reativos para Diagnóstico de Bio-Manguinhos pelo exemplo da partícula calibradora (Patente da Fiocruz), que pode ser processada como controle interno e/ou controle positivo. Trata-se de partículas virais miméticas (VLP – “Virus Like Particle”), e biosseguras, por não possuírem as proteínas do envelope viral do HIV responsáveis pela interação com a célula CD4. Sendo assim, estas partículas

miméticas não possuem capacidade replicativa, sendo obtidas por transfecção, em um ciclo único. São capazes de monitorar todas as etapas do processo, validando, assim, cada reação isoladamente. Caso o CI (controle interno) de uma dada reação esteja fora da faixa aceitável de sua análise, somente esta reação será invalidada, sendo necessária sua repetição em uma próxima rotina.

No Brasil, é imperioso o desenvolvimento de ensaios moleculares que possibilitem a vigilância epidemiológica na população, e cujos custos e equipamentos sejam adequados à realidade do parque tecnológico instalado e às unidades de saúde disponíveis.

Um dos objetivos do presente trabalho consiste em lançar as bases para que a FIOCRUZ (Bio-Manguinhos e IBMP) possa produzir kits para o diagnóstico da influenza A H1N1, atendendo aos requisitos das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e, como consequência, contribuir para o estabelecimento de uma rede de vigilância epidemiológica com ênfase em diagnóstico molecular, método este que será estratégico para as ações de saúde pública coordenadas pelo Ministério da Saúde.

A referida rede poderia vir a tornar-se uma ferramenta de diagnóstico, com várias aplicações nas mais diversas patologias de interesse para a saúde pública brasileira. Com o objetivo de alcançar um melhor aproveitamento desta rede, já estão sendo desenvolvidos kits para dengue, malária, leishmaniose, dentre outras doenças. .

O desenvolvimento do presente trabalho foi possibilitado pela organização de um fluxograma para a avaliação das possíveis fornecedores de equipamentos e insumos, onde foram avaliados aspectos fundamentais a um processo de transferência de tecnologia no âmbito do poder público federal, a saber: custos, operação dos equipamentos, facilidade de utilização pelo usuário, tempo de uso e agregação de conhecimento à matriz tecnológica, e a gama de possibilidades de métodos diagnósticos oferecidos pela unidade.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estabelecer um protótipo de produto, e definir um conjunto de equipamentos com base na plataforma de PCR em Tempo Real para diagnóstico de Influenza A H1N1, com a finalidade de contribuir para a formação de uma rede de vigilância epidemiológica por meio do uso de ensaios moleculares.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar diferentes regiões genômicas conservadas do vírus da influenza A H1N1, e verificar a possibilidade de formação de um duplex para a reação de PCR em tempo real, onde possam ser adaptadas e padronizadas no modelo proposto de protótipo de produto com base na plataforma de PCR em Tempo Real, com o melhor resultado possível;
- Identificar e analisar metodologias automatizadas ou semiautomatizadas de extração de ácidos nucléicos, testando aquelas que forem disponibilizadas pelas empresas;
- Identificar e analisar equipamentos de PCR em Tempo Real, testando aqueles que forem disponibilizados pelas empresas;
- Definir critérios para a formação da matriz de decisão, referentes a custo, assistência técnica, propriedade intelectual, rastreabilidade, sensibilidade e facilidade de execução do mesmo;
- Definir um protocolo-padrão de PCR em Tempo Real, dotado de insumos nacionalizados, e que apresente um desempenho igual ou superior ao protocolo tradicional desenvolvido pelo CDC/USA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Sistemas de extração e PCR em tempo real para a adaptação de um ensaio molecular.

Este trabalho foi realizado com a adaptação de possíveis modelos de ensaios moleculares baseados na técnica de PCR em Tempo Real para Influenza A H1N1, comparando estas demandas com os dados já existentes na bibliografia científica internacional e a avaliação de custo-benefício desta proposta de modelo de equipamentos de extração e PCR em Tempo Real e insumos/reagentes para posterior comparação com o modelo estabelecido pelo CDC (Schnitzler, 2009).

Foi analisado qual o grau de sensibilidade e processos dos métodos de extração e, ainda, foram levados em conta os pacotes de protocolos de instalação e validação dos equipamentos, além de registro na ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e uma análise econômica e técnica de viabilidade. Essas bases são fundamentais para minimizar a dependência tecnológica e evitar amarras que impossibilitem a incorporação dos processos envolvidos.

Com objetivo de trazer mais confiabilidade ao trabalho em termos de sensibilidade e especificidade, foi definido como alvo da reação à região genômica mais conservada, baseando-se na bibliografia disponível e em comparação de seqüências de Influenza A H1N1 isolados em diversas regiões demográficas, inclusive do Brasil, e de diferentes tipos e subtipos, em bancos de dados como ex: GeneBank.

O projeto “Nacionalização da Produção de Insumos para o Diagnóstico Molecular da Influenza A H1N1 e Estruturação de Rede Piloto de Diagnóstico Molecular e Vigilância Epidemiológica Voltados para a Saúde Pública”, foi aprovado em Agosto/2009. Em Dezembro de 2010, foi publicada a portaria TC 104/2009, que liberou recursos para o projeto para a Fiocruz. No mesmo mês, foi assinado, entre a Fiocruz e o IBMP, o contrato 45/2009, no valor de R\$ 1.547.700,00 para financiamento do projeto. Em Janeiro de 2010, para dar início ao projeto e à análise de viabilidade de um sistema semi-automatizado, que incluía plataformas de

extração e detecção para testes moleculares, foi elaborada uma Matriz de Análise, tendo sido determinados alguns critérios a serem empregados na escolha dos equipamentos. Os critérios estabelecidos para a aquisição dos equipamentos foram os seguintes: Transferência de Tecnologia para produção dos insumos (excluídos plásticos e ponteiras), Rastreabilidade da amostra, Software/Sistema aberto de Integração entre as Plataformas, Equipamentos com Certificação IVD e Certificação GMP e Desempenho técnico.

Além dos parâmetros mencionados na portaria acima referida, foram acrescentados itens ao modelo escolhido. O fluxograma de ações abaixo (figura 3.1) representa as ações envolvidas nesta dissertação. Foram avaliadas as regiões alvo conservadas, métodos e equipamentos de extração e PCR em tempo real, além de insumos para a reação de PCR em tempo real. Para isso foram avaliadas as questões de propriedade intelectual, além da rastreabilidade, sensibilidade, custo, assistência técnica e facilidade para o manuseio dos equipamentos. Segue abaixo, ilustrativamente, a cadeia de ações que foi analisada para a tomada de decisões.

Fluxograma para Execução do Trabalho

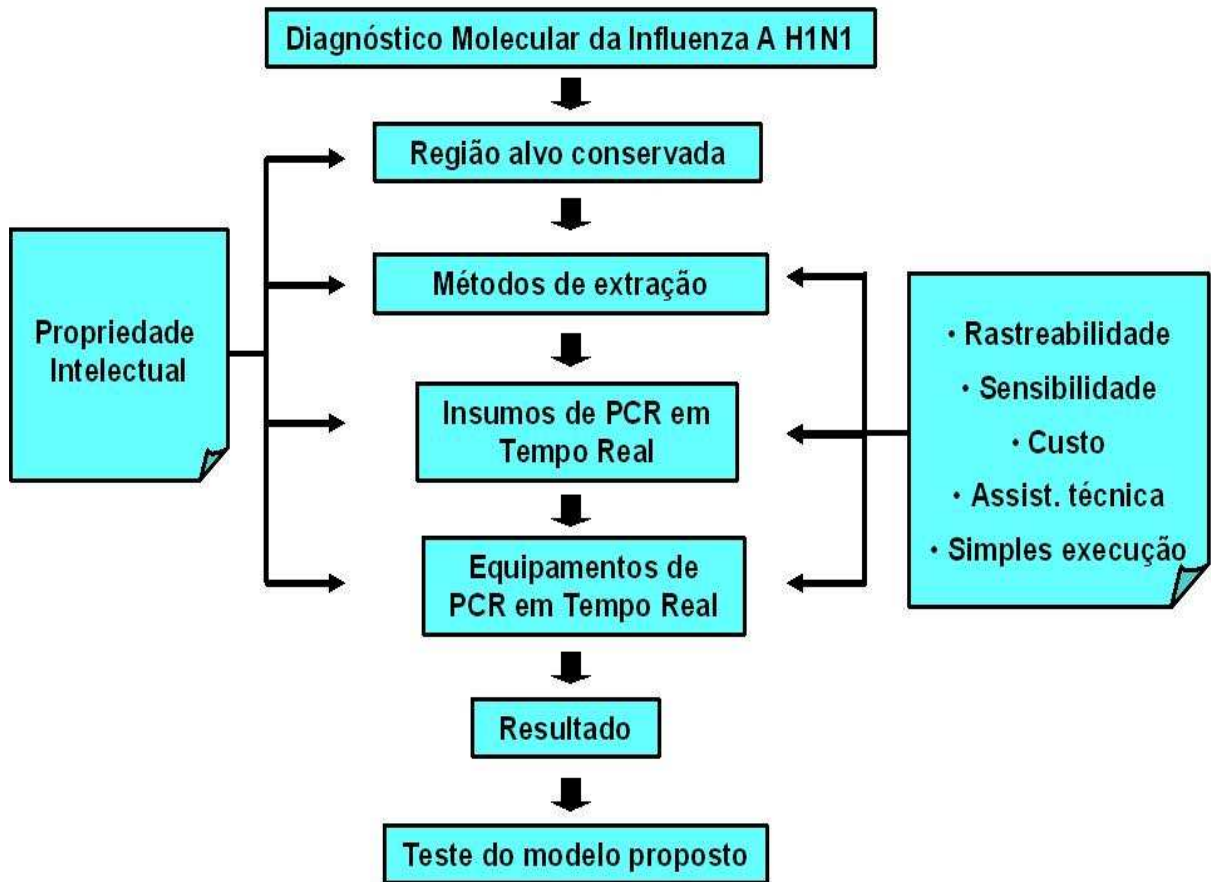


Figura 3.1: Fluxograma da cadeia de ações para desenvolvimento de ensaio molecular. Foram avaliadas as regiões alvo conservadas, métodos e equipamentos de extração e PCR em tempo real, além de insumos para a reação de PCR em tempo real. Para isso foram avaliadas as questões de propriedade intelectual, além da rastreabilidade, sensibilidade, custo, assistência técnica e facilidade para o manuseio dos equipamentos **Fonte:** Do autor

3.2. Origem e quantidade de amostras utilizadas.

As amostras utilizadas neste trabalho foram cedidas pelo Laboratório de Vírus Respiratórios do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) /Fiocruz e pelo Laboratório Central do estado do Paraná, a identificação das amostras clínicas e RNA eram desconhecidas e estas são amostras da epidemia de 2009.

Foram utilizadas 116 amostras de RNA obtidas no laboratório de vírus respiratórios do Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/Fiocruz e 203 amostras do Laboratório

central do estado do Paraná. Estas amostras consistiam em RNA extraído pelos métodos de extração manual, que serão posteriormente citados, a partir de amostras de aspirado nasal obtidas por *Swab* e conservadas em meio de transporte.

Adicionalmente foram processados “pool” de amostras positivas e negativas, onde foram utilizadas amostras clínicas confirmadas pela reação de PCR em tempo real (protocolo CDC) realizada pelo Laboratório Central do Estado do Paraná.

3.3. Sistemas de Extração avaliados

Dentre as diversas metodologias de extração testadas, destacam-se a extração por partículas de sílica e aquela por *beads* magnéticos. Essas metodologias vêm se mostrando consolidadas no mercado, como as alternativas mais viáveis para o fornecimento em escala compatível com o tamanho do projeto, que possam ser padronizados e implementados em uma rede nacional de vigilância epidemiológica molecular (Wen *et al.*, 2008).

Seguem, na tabela abaixo, as possibilidades de fornecedores com seus equipamentos e metodologias que foram analisadas neste trabalho (quadro 3.1).

Modelo	Empresa	Método	Vantagens	Desvantagens	Automação	Número Amostras	Volume amostra	Volume eluição	Tempo	Tipo de amostra	Facilidade de execução
Maxwell 16®	Promega	Beads magnéticos	+ rápido	Sem possibilidade de uso de código de barras	Sim	16	300 ul	20-300 ul	40 minutos	Sangue total, plasma e aspirado nasal	Sem avaliação
MiniMag®	BioMerieux	Beads magnéticos	Sensibilidade	Manuseio complexo	Não	12	200 ul	25 ul	60 minutos	Sangue total e plasma	Manual, difícil execução
Magmax®	Applied Biosystem	Beads magnéticos	Sensibilidade	Sem possibilidade de uso de código de barras	Sim	Até 96	200 ul	80-130 ul	60 minutos	Qualquer tecido biológico	Simples execução
QiaCube®	Qiagen	Partículas de sílica	Sensibilidade	Sem possibilidade de uso de código de barras	Sim	12	140 ul	10 ul	60 minutos	Sangue total, plasma e aspirado	Simples execução
Labturbo®	Biotoools	Partículas de sílica	36 amostras	Assistência técnica no Brasil ainda é falha	Sim	36	200 ul	80-200 ul	90 minutos	Sangue total, plasma e aspirado nasal	Simples execução, PCR setup integrado

Quadro 3.1: Matrizes de possibilidades automáticas e semiautomatizadas de extração, com suas respectivas metodologias e informações analisadas.

Conforme apresentado, o presente trabalho tem como um de seus objetivos a avaliação dos potenciais candidatos a matrizes de extração de ácidos nucléicos, levando em conta as possibilidades de transferência de tecnologia para IBMP/Bio-Manguinhos, sua facilidade de execução, tempo de processo, seu potencial de recuperação do material extraído, seu custo e capacidade para prestação de serviços de assistência técnica em território nacional. Foram analisadas as seguintes metodologias / equipamentos:

3.3.1. Extração manual

As extrações manuais dos RNAs utilizados na dissertação, cedidas pelo Laboratório de Vírus Respiratórios do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) /Fiocruz e pelo Laboratório Central do estado do Paraná, foram realizadas com o Kit PureLink Viral DNA/RNA Kits do fabricante Invitrogen, e com o Kit Qiamp Viral RNA mini Kit da fabricante Qiagen, a partir de 200 uL de aspirado nasal, seguindo as instruções do fabricante, e com volume de eluição de 80 ul. Ambos são utilizados no protocolo preconizado pelo CDC.

3.3.2. Maxwell®16(Promega)

O Maxwell®16 é um sistema automatizado capaz de extrair ácidos nucléicos de diferentes tipos de amostras. O equipamento processa 16 amostras, com o volume inicial de 300 ul em aproximadamente 15 a 40 minutos, dependendo do tipo de amostra e plataforma utilizadas (figura 3.2).

O Maxwell®16 pode ser configurado para eluição de diferentes volumes utilizando as seguintes plataformas: Lev (Low elution volume) para eluição de volumes entre 20-100µL e Sev (Standart elution volume) para volumes de até 300µL.

O sistema para purificação das amostras é baseado em partículas paramagnéticas (PMP_s), que permanecem numa fase sólida móvel para capturar as partículas virais; em seguida, ocorrem lavagens e, por fim, a eluição do material desejado.



Figura 3.2: Equipamento de extração Maxwell®16 da empresa Promega.www.promega.com

3.3.3.. NucliSens miniMAG® (BioMerieux)

O nucliSens miniMAG® é a segunda geração de um sistema semiautomatizado de isolamento de ácidos nucleicos de amostras clínicas, com base na tecnologia de extração a partir de beads magnéticos, possibilitando a análise de 12 amostras em um único procedimento. Esta metodologia pode ser acoplada a diferentes métodos de amplificação, e possui etapas manuais (figura 3.3).



Figura 3.3: Equipamento de extração NucliSens miniMAG® da empresa BioMerieux www.Biomerieux.com

3.3.4. MagMax® (Applied Biosystems)

O MagMax® é um sistema de extração automatizada, cuja tecnologia se baseia na extração por beads magnéticos. Ele possibilita a extração de 96 amostras a cada rodada, facilitando o fluxo de trabalho dos técnicos, e, nesse trabalho, o respectivo protocolo foi utilizado segundo as instruções do fabricante (figura 3.4).



Figura 3.4: Equipamento de extração MagMax® da empresa Applied Biosystems. www.appliedbiosystems.com

3.3.5. QIAcube® (Qiagen)

O QIAcube® é uma estação de trabalho para extração semiautomatizada, que possui capacidade para a extração de 12 amostras, e elimina etapas manuais capazes de comprometer o desempenho da extração. Foi utilizado o protocolo segundo as instruções do fabricante (figura 3.5).



Figura 3.5: Equipamento de extração QIAcube® da empresa QIAGEN. www.qiagen.com

3.3.6 Labturbo(BioTools)

O Labturbo 36c, fabricado pela empresa taiwanesa Taigen e comercializado pela espanhola BIOTOOLS, é um equipamento de extração semiautomática, baseado na técnica de coluna de extração com partículas de sílica para a extração de ácidos nucleicos, que, além da extração, agrega a capacidade de incorporação da etapa de PCR "Setup", sendo um diferencial na manipulação das amostras para diagnóstico.

Esse equipamento tem capacidade de extrair 36 amostras em uma hora e trinta minutos, tanto de plasma, quanto de aspirado nasal, sendo um aparelho de fácil utilização pelo operador. Apresenta programas que permitem a extração de 200 a 500 uL de amostras dos referidos matérias biológicos citados acima (figura 3.6).

A extração realizada no equipamento Labturbo seguiu as especificações determinadas pelo fabricante, e partiu de 200 ul, específico para amostras de aspirado nasal. Esse equipamento, com o uso desse programa, efetua 24 extrações a partir de 200 ul de aspirado nasal, gerando em cada uma das extrações 80 ul de RNA disponíveis para amplificação. Padronizou-se um programa específico para o processamento de 24 amostras de 200 ul de aspirado nasal.

Para aumentar a eficiência de extração nos casos de utilização do aspirado nasal, o fabricante recomenda a realização de uma etapa de solubilização prévia das amostras com o tampão de extração, a saber, fora do equipamento em questão, e antes da colocação das amostras no equipamento. Inicia-se com a colocação de 200 uL de tampão de lavagem e 200 uL de amostra em um microtubo de 1,5 mL devidamente identificado. Após este procedimento, agita-se em aparelho de vortex por 5 segundos e aguarda-se 10 minutos. A Solução é posteriormente transferida para o tubo de extração específico do equipamento e colocada na posição determinada pelo usuário na máquina. Após a colocação no equipamento, inicia-se o programa, com as seguintes etapas: etapa de lise, etapa de lavagem das colunas e etapa de eluição (sendo estas realizadas com auxílio de uma bomba de vácuo acoplada ao equipamento), com sua posterior transferência para um tubo devidamente identificado onde esse RNA ficará armazenado. Após esse procedimento de extração, efetua-se a descontaminação do equipamento por luz ultravioleta, durante 30 minutos.

O procedimento de limpeza e descontaminação do equipamento consiste no uso de hipoclorito de sódio diluído a 2 % em água, para a limpeza mecânica das partes e seu interior. Esse procedimento segue a recomendação do fabricante.

Após analisar todas as possibilidades de extração descritas neste tópico, foi escolhido o Labturbo para compor a matriz diagnóstica a ser definida na dissertação. O detalhamento dos motivos será discutido nos resultados apresentados.

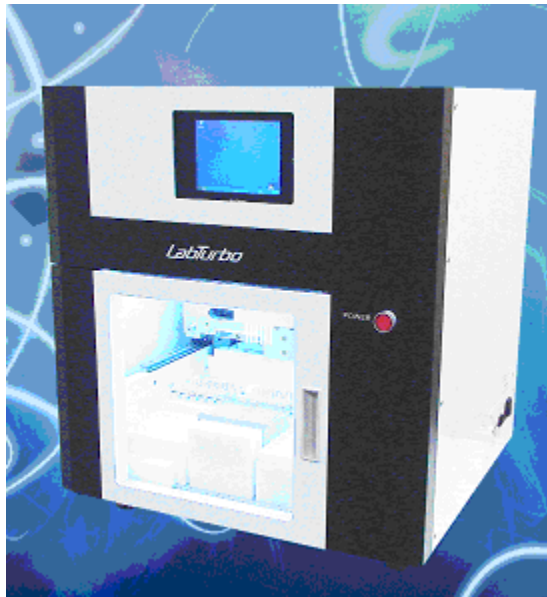


Figura 3.6: Equipamento de extração LabTurbo 36 C, da Fabricante BioTools.www.biotools.com

3.4 PCR em tempo real Protocolo IBMP/Bio-Manguinhos.

As sequências dos iniciadores e sondas infA (sonda específica para influenza sazonal) e RNP (gene constitutivo da RNase P) são as mesmas preconizadas pelo CDC para a realização da vigilância do vírus H1N1 pandêmico (Quadro 3.2). Os iniciadores e sondas H1N1(sonda específica para influenza pandêmica H1N1), HA (hemaglutinina), NA (neuraminidase) e MP(M1) (gene da proteína de matriz) foram desenhados pela equipe do IBMP, com base nas sequências dos vírus de Influenza A sazonal e H1N1 pandêmico, depositadas no GeneBank, sendo as sequências do

conjunto de oligonucleotídeos (primers e sondas) de H1N1 e NA específicas para uma região do gene da neuraminidase do H1N1 pandêmico, as de HA específicas para uma região do gene da hemaglutinina do H1N1 pandêmico, e as de M1 específicas para uma região do gene da matriz dos vírus Influenza

3.5 Oligonucleotídeos e sondas

Visando padronizar os ensaios duplex para o Kit de H1N1, foram realizados testes com diferentes conjuntos de oligonucleotídeos e sondas, testados pelo grupo do IBMP. Abaixo, segue a lista das seqüências padronizadas para a proposta de protótipo de kit:

IBMP	CDC
GACCRATCCTGTACACCTCTGAC AGGGCATTYGGACAAAKCGTCTA 5'FAM TGCAGTCTCGCTCACTGGGCAG 3'BHQ1	GACCRATCCTGTACACCTCTGAC AGGGCATTYGGACAAAKCGTCTA 5'FAM TGCAGTCTCGCTCACTGGGCAG BHQ1 3'
AGACCAATCYTGTCACCTCTG CATTYGGACAAAKCGTCTACG 5'FAM TCCTCGCTCACTGGGCACGGT BHQ1 3'	- - -
- - -	GCACGGTCAGCACTTATYCTRAG GTGRGCTGGGTTTTTCATTTGGTC 5'FAM CYACTGCAAGCCCATACACACAAAGCAGGCA 3'BHQ
GACATATGTTAAACATCAGCAACCAACT TTGTCTTTACTGTATAGCCCCATCCACTAAC 5'FAM GCTGGACAGTCAGTGGTTTTCCGTGAA BHQ1 3'	GTGCTATAAACACACCAGCCTYCCA CGGGATAITCCITTAATCCTGTRGC 5'FAM CAGAATATACATCCRGTCACAA TTGGARAA BHQ1 3'
AGA TTT GGA CCT GCG AGC G GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT 5'HEX TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG BHQ1 3'	AGA TTT GGA CCT GCG AGC G GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT 5'HEX TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG BHQ1 3'

Quadro 3.2: Sequências dos iniciadores Forward (F) e Reverse (R) e sondas dos oligonucleotídeos usados neste trabalho. Todas estão colocadas na direção 5'3'. Sondas: H1N1- sonda específica para influenza pandêmico, SwINFA- sonda específica para influenza sazonal, MP- sonda específica para gene da proteína de matriz e RNP- Sonda específica gene RNaseP. (-) significa que não utiliza essa sonda em sua combinação para diagnóstico. Conjunto de oligonucleotídeos usados no trabalho.

Gene	Iniciadores	sonda
Matriz	InfA F	InfA
	InfA R	
Matriz	MP F	MP
	MP R	
Nucleoproteína	SwinfA F	SwinfA
	SwinfA R	
Hemaglutinina	H1N1 F	H1N1
	H1N1 R	
RNase P	RNP F	RNP
	RNP R	

3.6 Protocolo de PCR em tempo real

A técnica de Transcrição reversa seguida da PCR em Tempo real é o método mais sensível para a detecção e a quantificação de RNA. A incorporação da enzima RT a uma etapa prévia da reação de PCR, definida como PCR em uma única etapa (“one step PCR”), acarreta a otimização do tempo de processamento do ensaio. Geralmente, é usado um oligonucleotídeo a partir da região 3’ do RNA como iniciador da reação de RT, que será o mesmo usado na reação seguinte de PCR, como oligonucleotídeo reverso, em adição ao oligonucleotídeo direto (“forward”). A ciclagem de PCR em tempo real padronizada para o ensaio de influenza A H1N1 é composta de um ciclo único a 47°C por 30 minutos para a transcrição reversa de RNA em cDNA (DNA complementar), seguidos de um único ciclo a 95°C por 7 minutos, e de 40 ciclos de 95°C por 20 segundos, seguidos de 55°C por 60 segundos.

Segue, abaixo, tabela com o quantitativo necessário e suas respectivas concentrações (quadro 3.3) para cada reação padrão de PCR em tempo real, no protocolo estabelecido no protótipo de kit IBMP/Bio-Manguinhos (H1N1/RNP e MP/RNP):

Quadro 3.3: Concentrações necessárias para uma reação de PCR em tempo real padronizada neste trabalho na proposta de produto efetuada no trabalho. Todos os insumos usados são oriundos da transferência de tecnologia da empresa BioTools para o IBMP.

REAGENTE	CONCENTRAÇÃO FINAL	VOLUME
Tampão 10X + <i>Taq</i> DNA Polimerase	1X	12,5 ul
Enzima RT 100X	1X	0,25 ul
Conjunto de oligonucleotídeos	0,4 uM primers / 0,2 uM sondas	2 ul
RNA	--	10 ul
Volume final	--	25 ul

Foram testados dois equipamentos de PCR em tempo real, ABI 7500 e LionCube para a amplificação/detecção das amostras de RNA obtidos. Para ambos a ciclagem, reação e volume de RNA eram iguais.

3.6.1 ABI 7500

Para o desenvolvimento da tese, foi utilizado para todas as análises o equipamento ABI 7500, que se encontra no Laboratório de tecnologia diagnóstica (LATED). A linha do threshold foi padronizada no valor de 1.0, com limite de detecção para todos os oligonucleotídeos citados até o Ct 35, estabelecendo como parâmetros preliminares de análise os valores de threshold. O “cut off” expressa a linha de corte no ciclo de amplificação máximo permitido para a detecção no equipamento de PCR em tempo real, específico para este ensaio padronizado.

3.6.2 LionCube

Foi utilizado, durante as pesquisas para a tese, o equipamento LionCube(da fabricante espanhola BioTools), que se encontra no Laboratório de tecnologia diagnóstica (LATED). Para todas as análises, foi utilizada a linha do threshold no valor de 6.0, com limite de detecção para todos os oligonucleotídeos citados até o ct 36, estabelecendo como parâmetros preliminares de análise os valores de threshold. O “cut off” expressa a linha de corte no ciclo de amplificação máximo permitido para a detecção no equipamento de PCR em tempo real, específico para este ensaio padronizado.

3.7. Controles da reação

A proposta de produto consiste em iniciadores e sondas estabelecidos pelo IBMP, insumos de RT-PCR obtidos através da transferência de tecnologia com a empresa Biotools para o IBMP, além de um controle positivo e um negativo, cuja finalidade baseia-se em avaliar todo o processo, desde a etapa de extração até a de amplificação. Os controles devem ser considerados como amostras desde o início

do teste e devem ser processados em todas as corridas, sendo processados 200 uL de cada controle em uma rotina.

O controle positivo consiste em um “armored RNA”, também conhecido como RNA “encouraçado” ou ainda “protegido”, contendo sequências- alvo para a detecção específica de vírus subtipo H1N1 e do vírus Influenza A. Esse “Armored RNA” é composto por um fago que pode ter sua seqüência alterada conforme o interesse do ensaio, com a adição de alvos específicos de interesse em cada reação.

O controle negativo da reação é composto pelo fago em questão sem a seqüência de interesse. Para a validação dos testes, o resultado da amplificação do controle positivo deve ser positivo para as sequências relacionadas neste produto. Ainda está em fase de análise a definição de uma faixa esperada de Ct.

Acrescenta-se ainda que foram usados como controles negativos para a execução dos experimentos descritos nos resultados meios de cultura SM(Tris-HCL, NaCl e gelatina), tampão de eluição da coluna de extração (CCEB – Column clean elution buffer), pool de amostras sabidamente negativas testadas em PCR em tempo real pelo protocolo CDC, além de água RNase FREE. Ainda foi usado o NTC (no template control), que vem a ser os insumos da reação de PCR, mais a substituição da amostra por água RNase FREE. Em virtude de sua natureza, era esperada a ausência de amplificação dessas amostras.

3.8 Protocolo H1N1 CDC

O protocolo do CDC foi utilizado pelo Laboratório de Vírus Respiratórios do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) /Fiocruz e pelo Laboratório Central do estado do Paraná como padrão para as comparações o protótipo de kit Brasileiro, está disponível no site abaixo:

O protocolo do CDC utilizado como padrão de referência consiste em um ensaio de RT-PCR onde a reação de PCR em tempo real é realizada com 4 alvos em reações separadas (“single”) onde estes detectam regiões da influenza pandêmica (SwInfA), influenza sazonal (InfA), a região da hemaglutinina da influenza pandêmica (SwH1) e o gene da RnaseP (RNP). Esse protocolo deve ser realizado com secreções respiratórias e aspirado nasofaríngeo (quadro 3.4).

Segundo protocolo do CDC, recomenda-se o uso da enzima invitrogen superScript III platinum e seu tampão, com equipamentos de amplificação da Applied

Biosystem e da BioRad. Para a extração de ácido nucléico, recomendou-se o uso de kits de extração manual da Invitrogen ou Roche.

A reação de PCR em tempo real é realizada com um ciclo de 50°C por 30 minutos para a transcrição reversa, seguido por um ciclo de 95°C por 2 minutos e 45 ciclos de amplificação de PCR de 95°C por 15 seg e 30°C por 55 seg.

Quadro 3.4: reagentes e volumes necessários para a realização da reação de PCR em tempo real conforme protocolo CDC.

Reagente	Concentração / reação
Água RNase FREE	N x 5,5 ul
Iniciador <i>forward</i> 40 uM	N x 0,5 (1 uM)
Iniciador <i>reverse</i> 40 uM	N x 0,5 (1 uM)
Sonda 10 uM	N x 0,5 (0,25 uM)
<i>Taq</i> polimerase	N x 0,5
2X Master Mix PCR	N x 12,5
Volume Final	N x 20,0

Legenda: N- Número de reações.

A figura 3.7 ilustra um comparativo dos equipamentos, insumos de extração e insumos de PCR em tempo real utilizado no protocolo preconizado pelo CDC e pela proposta de produto Bio-Manguinhos/IBMP.

Protocolo CDC		Bio-Manguinhos / IBMP
<p>Equipamentos:</p> <ul style="list-style-type: none"> Manual ou QIACube ABI 	X	<p>Equipamentos:</p> <ul style="list-style-type: none"> Labturbo LionGene
<p>Insumos:</p> <p>Extração</p> <ul style="list-style-type: none"> Kits de extração QIAGEN ou Roche 		<p>Insumos:</p> <p>Extração</p> <ul style="list-style-type: none"> Transferência Tecnologia Kit extração
<p>RT-PCR</p> <ul style="list-style-type: none"> Primers e sondas fornecidos pelo CDC Master mix + <i>Taq</i> (Invitrogen) Enzima RT (Invitrogen) 		<p>RT-PCR</p> <ul style="list-style-type: none"> Primers e sondas nacionalizados Master mix + <i>Taq</i> (TT Biotools) Enzima RT (TT Biotools)

Figura 3.7: Descrição dos equipamentos utilizados, insumos de extração e de RT-PCR dos protocolos preconizados pelo CDC e IBMP. **Fonte:** Do autor.

4. RESULTADOS

4.1 Matriz de definições para os Equipamentos

Os equipamentos foram analisados quanto à capacidade da empresa em atender aos critérios relacionados na figura 3.1, tais como: sensibilidade, rastreabilidade, custo, simples execução dos procedimentos, capacidade de processamento e assistência técnica em nosso país, e suas particularidades em termos de deslocamentos, o que sintetiza todas as necessidades de Bio-Manguinhos para poder fornecer um sistema completo ao Ministério da Saúde.

Cinco empresas foram consultadas e convidadas a apresentar propostas, a saber: Applied Biosystem, Biotools, Biomeuriex, Promega e Qiagen, conhecidas mundialmente nesta linha de equipamentos, e que mantêm representantes no Brasil. Dentre essas empresas, duas não ofereciam plataformas de detecção e nem se pronunciaram quanto à transferência de tecnologia, enquanto que a terceira não preenchia qualquer dos critérios (estabelecidos no quadro 3.1 da metodologia). Dentre as duas empresas restantes, a companhia que obteve melhor avaliação segundo os critérios acima descritos foi a Biotools, que apresentou proposta competitiva quanto aos custos das plataformas e insumos necessários, além de um atraente pacote de transferência de tecnologia (Quadro 4.1). Desta forma, as plataformas escolhidas foram:

- Termociclador: LionCub - Marca Biotools
- Extração: Labturbo 36 Compact System – Marca Biotools).

Além dos aspectos acima relatados, o equipamento Labturbo 36 Compact System apresentou uma característica técnica de grande relevância, que desempenhou um papel primordial para a sua escolha: a capacidade de realizar, no próprio equipamento de extração, o “setup” da reação de PCR e das amostras para a

reação. Este procedimento minimiza o tempo de processamento, diminuindo as possibilidades de contaminação e de falha humana durante as reações.

Empresa	Função	Critérios analisados						Valor R\$ Equipos + Insumos/200.000 rç
		Transf. de Tec.	Rastreabilidade	Sistema de Integração	IVD	BPF	Módulo de Detecção	
Applied Biosystems	extração + setup	Não	Não	Não	Não	Não	ABI 7500 - sem IVD	9,35
Biomerieux	extração	Não respondeu	Sim	Sim. Eles não informam se o software está incluído	ISO 13485	Sim	Não possui	8,15
Biotools	extração + setup	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	LionCube - sem IVD	9,86
Promega	extração	Não respondeu	Sim	Sim, software flexível	BR não	Não	Não possui	10,72
Qiagen	extração + setup	Sim	Sim	Não	ISO 13485	Sim	RotorGene Q (5 plex HRM) - em andamento CE-IVD	15,81

Quadro 4.1: Resumo das informações prestadas pelas empresas participantes, e dos critérios determinantes observados. Legenda: IVD- *In vitro diagnostic*; BPF- Boas práticas de fabricação, ISO- Internacional Organization for Standardization, BR-Brasil.Legenda:rç-reações; Transf. De tecnologia. De transferência de tecnologia.

A partir deste momento, foi dada continuidade ao desenvolvimento do protótipo de produto para o diagnóstico da Influenza A H1N1. Dentre as diversas atividades empreendidas e as repetidas rodadas de testes com número e tipos variados de amostras, realizamos estudos com os insumos/reagentes brasileiros (tampões de extração, master mix com *Taq* DNA Polimerase, enzima *reverse transcriptase*), comparando o seu desempenho com o de produtos equivalentes que compõem o modelo preconizado pelo CDC. Buscamos, ainda, a melhoria do desempenho do teste, com a avaliação de diferentes formulações da mistura de reação (alterando as concentrações dos sais, enzimas, iniciadores e sondas, bem como as temperaturas da reação). Esses resultados são apresentados, em detalhes, nos tópicos que seguem.

4.2 Nacionalização de insumos

4.2.1. Avaliação das reações SINGLE e MULTIPLEX de H1N1, HA, NA, INFA, M1 E RNP

Foi utilizado RNA previamente extraído de 116 amostras coletadas durante a pandemia de 2009, processadas e analisadas pelo Laboratório de Referência em Doenças Respiratórias do IOC (Instituto Oswaldo Cruz). Esse ensaio tinha por objetivo avaliar os reagentes desenvolvidos e produzidos pelo IBMP com reações singleplex para a vigilância epidemiológica de H1N1 pandêmico, e a comparação entre os resultados obtidos com o protocolo preconizado pelo CDC e executado pelo Laboratório de Referência em Doenças Respiratórias do IOC, durante o ano de 2009. Novas alíquotas das mesmas amostras relatadas acima foram extraídas pelo equipamento Labturbo, conforme protocolo detalhado na metodologia.

78 RNAs positivos para H1N1, 19 RNAs positivos para Influenza A (INFA) sazonal (sem determinação de subtipo) e 19 RNAs negativos para H1N1 e Influenza A sazonal extraídos durante o ano de 2009 com o kit Qiamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) foram submetidas a reação de PCR em tempo real. Cada amostra foi submetida a seis reações singleplex de amplificação, sendo elas: H1N1 (iniciador para a influenza A pandêmica), HA (gene da hemaglutinina), NA (neuraminidase), INFA

(iniciador para a influenza A sazonal), MP (gene da proteína de matriz) e RNP (gene humano RNaseP).

Por meio da mesma metodologia descrita acima (Kit Qiamp Viral RNA Mini Kit Qiagen), também foi realizado o PCR em tempo real para os modelos de duplex propostos. Foram processados 57 RNAs positivos para H1N1, 16 RNAs positivos para InfA sazonal e 14 RNAs negativos para H1N1 e InfA sazonal extraídos durante o ano de 2009 com o kit Qiamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen). Cada amostra foi submetida a três reações singleplex e, também a reações duplex e triplex de amplificação, sendo elas: H1N1/RNP,MP/RNP, INFA+MP/RNP.

Neste primeiro momento, foram testados os oligonucleotídeos e sondas NA, H1N1, HA e os duplexs NA+H1N1, HA+NA+H1N1 e HA+NA, todos desenhados pelo IBMP, testados frente ao modelo “H1N1 CDC”. Evidenciou-se que houve 24 % de discordâncias em relação aos desenhos preconizados pelo IBMP (quadro 4.2).

Quadro 4.2: Resultados Discordantes Obtidos com os Oligonucleotídeos Específicos para H1N1 Pandêmico em 2010 (IBMP) em relação aos resultados previamente obtidos com o padrão de referência CDC2009. Resultado expresso em número de amostras discordantes. (-) nenhuma discordância.

Total de Amostras	H1N1 CDC	NA IBMP	H1N1 IBMP	HA IBMP	NA + H1N1 IBMP	HA + NA + H1N1 IBMP	HA + NA IBMP	Total
116	-	10	4	14	1	3	4	28

O quadro 4.3 demonstra que ocorreram discordâncias em relação aos desenhos preconizados pelo IBMP em 31 % de amostras quando comparado ao modelo preconizado como padrão. Os testes foram realizados com os oligonucleotídeos INFA e MP e o duplex INFA+MP, todos desenhados pelo IBMP, e testados frente ao oligonucleotídeo “INFA CDC”.

Quadro 4.3: Resultados Discordantes Obtidos com os Oligonucleotídeos Específicos para H1N1 Pandêmico em 2010 (IBMP) em relação aos resultados previamente obtidos com o padrão de referência CDC 2009. Resultado expresso em número de amostras discordantes. (-) nenhuma discordância.

Total de Amostras	INFA CDC	M1 IBMP	INFA IBMP	INFA + M1 IBMP	Total
116	-	18	18	16	36

Foi feita a reação com o oligonucleotídeo RNP (quadro 4.4), sintetizado pelo IBMP, frente ao oligonucleotídeo “RNP CDC”. O resultado demonstra que houve 1,7% de discordâncias em relação ao desenho preconizado pelo IBMP.

Quadro 4.4: Resultados Discordantes Obtidos com os Oligonucleotídeos Específicos para H1N1 Pandêmico em 2010 (IBMP) em relação aos resultados previamente obtidos com o padrão de referência CDC2009 . Resultado expresso em número de amostras discordantes. (-) nenhuma discordância.

Total de Amostras	RNP IBMP	RNP CDC	Total
116	2	-	2

Mediante os resultados apresentados onde foi possível observar um ganho no tempo de processamento e a diminuição do número de amostras discordantes quando utilizado o ensaio no formato duplex. A bibliografia disponível corrobora com esta estratégia. Mediante a resposta obtida, foi formatada a possibilidade de uso de ensaios duplex em busca de um melhor resultado na detecção da influenza pandêmica

Os ensaios de validação do formato Duplex do teste trazem duas importantes vantagens: a diminuição do número de reações de quatro para duas por paciente, e a realização concomitante das reações de detecção e controle em um mesmo tubo. Tais procedimentos tinham como objetivo trazer mais confiabilidade ao teste, gerando a possibilidade do controle da reação em tempo real, simultaneamente à ocorrência da reação do diagnóstico.

4.3 Padronizações de ensaios Duplex

Estes resultados, apresentados a seguir, obtiveram uma avaliação satisfatória durante a análise da proposta de kit Brasileiro. Neste momento, foi decidido que o primeiro protocolo de validação deveria ser efetuado já na plataforma completa adquirida para o projeto, e que os resultados discordantes seriam analisados pelos dois protocolos. Vale ainda salientar que, no mesmo período, foram avaliados a reprodutibilidade das reações desenhadas para o teste Brasileiro e os controles para as reações de identificação dos alvos moleculares de influenza incluídos no projeto,

com a utilização da metodologia de “armored” RNA, desenvolvida pela equipe do IBMP/ICC/PR. Mediante resultados obtidos anteriormente nas avaliações singleplex, a utilização de um conjunto de oligonucleotídeos MP/INFA para a confirmação da influenza sazonal e um conjunto específico para H1N1 foi a melhor estratégia para a padronização de ensaios duplex.

4.3.1. Avaliação de reações duplex H1N1/RNP e INFA-M1/RNP

Utilizou-se RNA previamente extraído de 87 amostras coletadas durante a pandemia de 2009, processadas e analisadas pelo Laboratório de Doenças Respiratórias do Instituto Oswaldo Cruz. O objetivo foi avaliar as reações duplex de PCR em tempo real para vigilância epidemiológica de H1N1 pandêmica, desenvolvida pelo IBMP, e comparar os resultados obtidos com o protocolo preconizado pelo CDC, executado pelo Laboratório de doenças respiratórias do Instituto Oswaldo Cruz, durante o ano de 2009. Fica evidenciada a eficiência do modelo de RNP, testados como controle interno da reação para a verificação de amplificação. Essa situação chancela sua inclusão nos oligonucleotídeos a partir dessa parte da dissertação.

No quadro abaixo (Quadro 4.5) segue a análise dos dados obtidos com os testes dos oligonucleotídeos H1N1 e RNP, desenhados pelo IBMP, que foram avaliados frente ao oligonucleotídeo “swINFA e swH1N1 CDC”. Podemos observar que, em relação aos resultados obtidos com o modelo “swINFA e swH1N1 CDC”, houve 8 % de discordâncias com as sequências definidas pelo IBMP.

Quadro 4.5: Resultados Discordantes Obtidos com os Oligonucleotídeos Específicos para H1N1 Pandêmico em 2010 (IBMP) e 2009 (CDC) com o duplex H1N1/RNP (H1N1 IBMP) e com os singleplex swH1N1 E swINFA (H1N1 CDC) realizados em 2009. Resultado expresso em número de pacientes discordantes. (-) nenhuma discordância.

Total de amostras	swH1N1 E swINFA CDC	H1N1 IBMP	Total
87	-	7	7

Houve 21,5 % de resultados discordantes frente aos desenhos preconizados pelo IBMP com os testes dos oligonucleotídeos MP IBMP e o duplex INFA + MP, ambos desenhados pelo IBMP (quadro 4.6).

Quadro 4.6: Resultados Discordantes Obtidos com os Oligonucleotídeos Específicos para H1N1 Pandêmico em 2010 (IBMP) e 2009 (CDC) do duplex MP/RNP E INFA+MP/RNP (MP IBMP, INFA+MP IBMP) e com o singleplex INFA (INFA CDC) realizado em 2009. Resultado expresso em número de pacientes discordantes. (-) nenhuma discordância.

Total de Amostras	INFA CDC	M1 IBMP	INFA + M1 IBMP	Total
116	-	9	7	25

Utilizando o duplex H1N1/RNP, temos 8 % de resultados discordantes em relação ao protocolo do CDC realizado em 2009. Dentre as amostras amplificadas com o duplex M1/RNP, 7,75 %, apresentaram resultado diferente do obtido até o momento. Nesse conjunto, seis, que eram positivas quando analisadas pelo protocolo do CDC em 2009, foram consideradas negativas segundo o protocolo IBMP e três que eram consideradas negativas pelo protocolo do CDC, foram consideradas positivas pelo protocolo do IBMP.

O duplex INFA+MP(M1)/RNP gerou 6 % de resultados discordantes, todos referentes a amostras supostamente negativas conforme o resultado fornecido pelo laboratório de Doenças Respiratórias do Instituto Oswaldo Cruz em 2009, e que foram consideradas positivas com a utilização do protocolo/reagentes IBMP. Esse dado indica uma possível amplificação inespecífica ocasionada pela utilização da combinação de oligonucleotídeos. Com base nestes resultados, foi definido que o modelo Brasileiro teria como base os alvos moleculares identificados pelos conjuntos H1N1 (específico para influenza H1N1 pandêmica), MP (Região do gene da matriz (M1)-específico para influenza A), além do controle interno da reação para a verificação de amplificação, que vem a ser o mesmo preconizado pelo CDC (gene Humano RNP).

4.3.2. Análise de reprodutibilidade do modelo escolhido.

Para a análise de reprodutibilidade do método, foi efetuada a extração e realizado o teste de PCR em tempo real de réplicas de um pool de 10 amostras sabidamente positivas, com o objetivo de verificar a reprodutibilidade dos resultados obtidos com a extração. Como descrito no início dos resultados, o equipamento escolhido também realiza o PCR setup automatizados na plataforma selecionada e o objetivo era a verificação da eficiência do mesmo também.

Para a verificação da condição descrita acima, efetuou-se o protocolo de experimentos, repetido em três testes consecutivos: uma extração de 5 alíquotas de 200ul cada de um pool de amostras positivas para H1N1 e de uma amostra de água RNase free. O PCR em tempo real foi realizado com 6 amostras extraídas (alíquotas do pool positivo descrito acima e uma da amostra RNase FREE) no Labturbo, cada um em duplicata e amplificadas com o conjunto de oligonucleotídeos 1 (H1N1/RNP) e com o conjunto de oligonucleotídeos 2 (MP/RNP) no equipamento LionCub.

O quadro 4.7 apresenta a média dos resultados positivos (expressos em Ct) das três extrações realizadas, com seus desvios-padrão e coeficientes de variação. Fica demonstrada a reprodutibilidade do modelo de extração com a variação de apenas 2 Ct entre os testes realizados em condições idênticas às descritas acima. Ainda vale ressaltar que os coeficientes de variação foram sempre próximos de 0, o que demonstra a baixa variabilidade verificada entre as extrações.

Quadro 4.7: Resultados das três extrações realizadas com 5 duplicatas das amostras positivas com as médias, desvios-padrão (DESVPAD) E o coeficiente de variação (CV) dos protocolos sugeridos. Legenda: Ct-Ciclo “threshold”.

Extração realizada no LabTurbo	Ct H1N1	Ct MP	Ct RNP1 Oligos 1	Ct RNP2 Oligos 2
Extração 1				
Média Pool Positivo	32,52	33,05	26,8	26,94
Desvpad Pool Positivo	1,88	1,63	0,36	0,39
Cv Pool Positivo	0,058	0,049	0,013	0,014
Extração 2				
Média Pool Positivo	32,66	34,52	29,06	29,54
Desvpad Pool Positivo	1,5	1,63	0,36	0,23
Cv Pool Positivo	0,046	0,047	0,012	0,008
Extração 3				
Média Pool Positivo	34,73	36,56	28,6	29,14
Desvpad Pool Positivo	2,79	2,56	0,32	0,25
Cv Pool Positivo	0,08	0,07	0,011	0,009
Média das Extração 1,2 e 3				
Média Pool (+)	33,3	34,71	28,15	28,54
Média Desvio Padrão Pool (+)	2,05	1,93	0,34	0,29
Média Cv Pool (+)	0,06	0,06	0,01	0,01

A figura 4.1 expressa os dados obtidos entre as três extrações citadas no quadro 4.7, é possível observar que, entre as 3 extrações, obteve-se uma variação de, aproximadamente, 2 Ct.

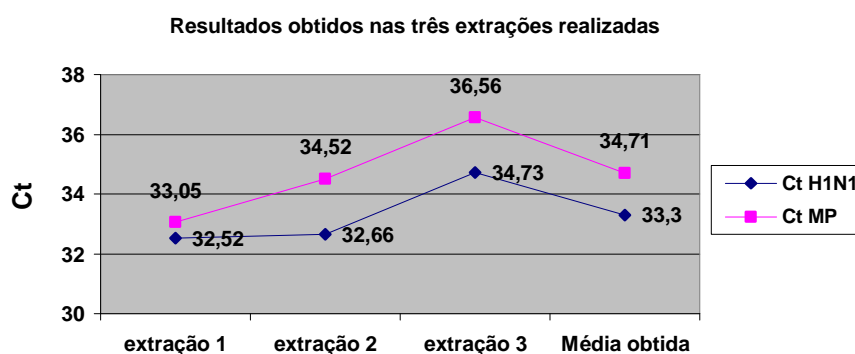


Figura 4.1: Resultados das três extrações realizadas com dados expostos no quadro 4.7, referentes as sondas dos oligonucleotídeos H1N1 e MP.

Como os resultados negativos (água RNase FREE) apresentaram uma amplificação que não era esperada em todas as alíquotas testadas, suspeitou-se de uma contaminação do equipamento durante os processos de extração. Efetuou-se uma limpeza segundo as instruções do fabricante no equipamento Labturbo e no laboratório. Esse teste teve como objetivo identificar e resolver o suposto problema de contaminação durante a extração com o Labturbo. A extração e o PCR em tempo real de amostras negativas (tampão de eluição e meio SM, descritos anteriormente no capítulo de materiais e métodos), juntamente com a extração de pool de amostras positivas e pool de amostras negativas foram processadas, com o uso do Labturbo e com a realização de PCR em tempo real do material extraído no LionCub. Após a realização de cada teste, foi realizada a limpeza no interior do equipamento Labturbo, assim como em todo o laboratório, conforme descrito na metodologia, tendo sido, em seguida, realizado um novo teste.

Foram realizados 3 testes (quadro 4.8 e 4.9 e Extração 1,2 e 3 do quadro 4.13) com o seguinte protocolo: Extração de 12 alíquotas com 200ul cada de tampão de eluição (CCEB) e 6 alíquotas com 200ul de meio SM no Labturbo e o PCR em tempo real de 18 amostras extraídas, 1 amostra de controle positivo e 1 amostra de controle negativo previamente submetidas à extração e 1 NTC (*non template control*), constituído de tampão de eluição. Para esse teste, a amplificação foi efetuada apenas com conjunto de oligonucleotídeos 1 (H1N1/RNP) no equipamento Lioncube. Ressalte-se ainda que, entre a realização dos protocolos de extração detalhados, foram realizados os procedimentos de limpeza mecânica descritos na metodologia. A eficácia do protocolo de limpeza mecânica, realizada no intervalo de cada teste

realizado, descrita na metodologia se reflete no decréscimo das contaminações, conforme verificado nos quadros 4.8 e 4.9.

Quadro 4.8: Resultados obtidos com o oligonucleotídeo RNP nos testes realizados entre as limpezas mecânicas sugeridas no protocolo descrito na metodologia, com suas respectivas porcentagens. Amostra: tampões CCEB e meio de cultura SM

	Total CCEB	Amostras contaminadas CCEB	% contaminação CCEB	Total SM	Amostras contaminadas SM	% contaminação SM
Teste 1	12	4	33,00%	6	4	67,00%
Teste 2	12	4	33,00%	6	0	0 %
Teste 3	12	1	15 %	6	0	0 %

Quadro 4.9: Resultados obtidos com o oligonucleotídeo H1N1 nos testes realizados entre as limpezas mecânicas sugeridas no protocolo descrito na metodologia, com suas respectivas porcentagens. Amostra: tampões CCEB e meio de cultura SM.

	Total CCEB	Amostras contaminadas CCEB	% contaminação CCEB	Total SM	Amostras contaminadas SM	% contaminação SM
Teste 1	12	1	7,5 %	6	1	15 %
Teste 2	12	0	0 %	6	0	0 %
Teste 3	12	0	0 %	6	0	0%

A figura 4.2 ilustra os resultados obtidos nos quadros 4.8 e 4.9, mostrando o decréscimo das contaminações e demonstrando a eficácia da limpeza mecânica sugerida. Infere-se daí que grande parte das contaminações poderia ter sido originada a partir das contaminações cruzada entre as amostras. A descrição do gráfico é apresentada na legenda ao lado, que traz, em detalhes, o conteúdo de cada linha, com seus respectivos percentuais.

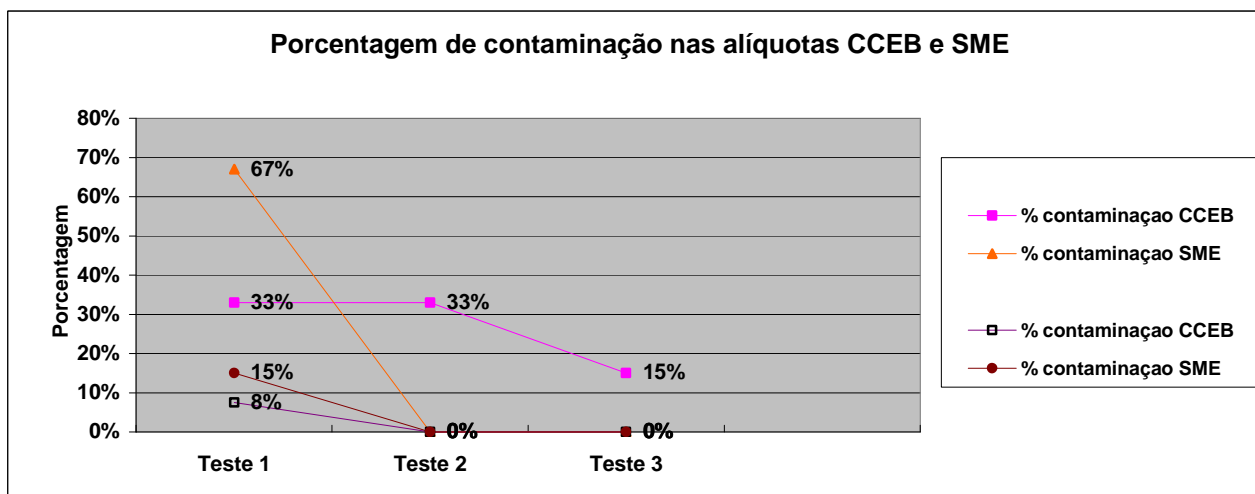


Figura 4.2: Resultados obtidos com o oligonucleotídeo RNP (linhas rosa e laranja) e H1N1 (linhas vermelha e violeta), demonstrado nos quadros 4.8 e 4.9, com as respectivas porcentagens de contaminação obtida nas alíquotas de CCEB e SM nos testes realizados entre as limpezas mecânicas sugeridas no protocolo descrito na metodologia, com suas respectivas porcentagens.

O quarto teste (Extração 4 do quadro 4.13) foi realizada no Labturbo, com a extração de 10 alíquotas de 200ul cada de um pool de amostras positivas para H1N1 (Positiva), 10 alíquotas de 200ul cada de um pool de amostras negativas para H1N1 e InfA sazonal (Negativa) e 4 alíquotas de 200ul cada de tampão de eluição (CCEB). O PCR em tempo real: 24 amostras extraídas, 1 amostra de RNA do controle positivo e 1 NTC (*non template control*), constituído de tampão de eluição (CCEB). A amplificação foi realizada apenas com conjunto de oligonucleotídeos 1 (H1N1/RNP) no LionCub.

Neste teste, 50 % das amostras negativas apresentaram Ct que seriam considerados positivos na avaliação dos resultados, devido aos critérios de Threshold e “cut off” estabelecidos na metodologia, levando à necessidade de repetição do protocolo para a confirmação da descontaminação do equipamento Labturbo. Foi feita uma nova limpeza mecânica, conforme o procedimento descrito na metodologia.

Foi realizada uma nova extração (Extração 5 do quadro 4.13) de 24 alíquotas de 200ul cada de tampão de eluição (CCEB) e efetuado o PCR em tempo real de 24 amostras extraídas, 1 amostra de RNA do controle positivo e 1 NTC (*non template control*), constituído de tampão de eluição (CCEB), com amplificação apenas com conjunto de oligonucleotídeos 1 (H1N1/RNP) e reação efetuada no LionCub conforme descrito na metodologia. Neste teste, observou-se somente a contaminação de uma Amostra da extração realizada.

Verificou-se o decréscimo da taxa de contaminação à medida que as limpezas foram feitas, não tendo sido observado qualquer aumento da contaminação, mesmo após a extração de amostras positivas. A reprodutibilidade obtida com a extração de 10 réplicas do pool positivo para H1N1 foi satisfatória com valores de CV (coeficiente

de variação) iguais a 1,78% para H1N1 e 1,40% para RNaseP e o pool de amostras negativas apresentou, em metade dos casos, um valor de Ct positivo, podendo indicar que, dentre as amostras utilizadas para fazer o pool, havia amostras falso-negativas, ou que houve contaminação do mesmo durante seu preparo.

A metodologia do Labturbo tornou a ser repetida. Foi realizada a extração e PCR em tempo real de pool de amostras positivas, pool de amostras negativas e de amostras “brancas”, simultaneamente. O objetivo foi a verificação de não-ocorrência de contaminação durante o processo de extração e PCR setup dentro do Labturbo, bem como a aferição da reprodutibilidade dos resultados obtidos com a extração e o PCR setup automatizados e, ainda, a confirmação da qualidade dos reagentes de extração IBMP quanto à capacidade de gerar resultados reprodutíveis e quanto à inexistência de contaminantes.

Foi realizado um teste com a extração (Extração 6 e 7 do quadro 4.13) de 10 alíquotas de 200ul cada de um pool de amostras positivas para H1N1, 2 amostras “brancas” (CCEB) , realizado-se um PCR em tempo real das 12 amostras extraídas com 1 amostra de controle positivo previamente submetida à extração e 1 NTC (*non template control*), constituído de tampão de eluição. Foi realizada a amplificação com conjunto de oligonucleotídeos 1 (H1N1/RNP) e 2 (MP/RNP) , com a reação de PCR em tempo real no Lioncube, como descrito na metodologia, e cujos resultados são apresentados no quadro 4.10.

Quadro 4.10: Resultados obtidos com os oligonucleotídeos H1N1/RNP e MP/RNP no protocolo de teste realizado com pool positivo e alíquotas de CCEB. Os resultados estão expressos em Ct.

Pool positivo	Ct H1N1	Ct MP	Ct RNaseP
Média Pool Positivo	27.07	28.72	26.93
Desvpad Pool Positivo	0.28	0.26	0.32
Cv %	1.03	0.92	1.19

A reprodutibilidade obtida com a extração de 10 réplicas do pool positivo para H1N1 foi satisfatória, com valores de CV variando entre 0,92% a 1,19% e a ausência de amplificação das amostras “brancas” sugere a incoerência de contaminação durante os processos de extração e PCR “setup”.

Era ainda necessário proceder à extração e ao teste de PCR em tempo real de pool de amostras positivas para H1N1, pool de amostras negativas para H1N1 e InfA sazonal, simultaneamente à extração, com o PCR em tempo real, de pool de amostras positivas e amostras “brancas” (CCEB). Esse ensaio tinha como objetivo a verificação

de inoerência de contaminação durante o processo de extração e PCR “setup” dentro do Labturbo, a aferição da reprodutibilidade dos resultados obtidos com a extração e o PCR “setup” automatizados, e, ainda, a reprodução da rotina de trabalho enfrentada pelos usuários do teste na rede de vigilância. Foram efetuadas 4 extrações independentes (Extrações 8,9,10 e 11 do quadro 4.13) de 12 alíquotas de 200ul cada de um pool de amostras positivas para H1N1 (Pool positivo) e 12 alíquotas de 200ul cada de um pool de amostras negativas para H1N1 e InfA sazonal (Pool negativo), com a realização do PCR em tempo real das 24 amostras extraídas. Estas foram amplificadas com o conjunto de oligonucleotídeos 1 (H1N1/RNP) e o conjunto de oligonucleotídeos 2 (MP/RNP) no equipamento LionCub conforme protocolo descrito na metodologia (quadro 4.11).

Quadro 4.11: Resultados obtidos com os oligonucleotídeos H1N1/RNP e MP/RNP no protocolos de testes realizados com pool positivo e negativo. A referida tabela demonstra o resultado das quatro repetições propostas no protocolo detalhado acima. Os resultados em vermelho indicam a amplificação de amostras negativas. Os resultados estão expressos em Ct.

EXTRAÇÃO 1				
	Ct H1N1	Ct MP	Ct RNP Oligos 1	Ct RNP Oligos 2
Média Pool positivo	24,57	26,31	21,52	25,22
Média Pool Negativo	28,7	29,47	21,52	25,22
EXTRAÇÃO 2				
	Ct H1N1	Ct MP	Ct RNP Oligos 1	Ct RNP Oligos 2
Média Pool positivo	24,57	26,31	21,52	25,22
Média Pool Negativo	28,29	28,77	21,52	25,22
EXTRAÇÃO 3				
	Ct H1N1	Ct MP	Ct RNP Oligos 1	Ct RNP Oligos 2
Média Pool positivo	24,57	26,31	21,52	25,22
Média Pool Negativo	28,56	29,99	21,52	25,22
EXTRAÇÃO 4				
	Ct H1N1	Ct MP	Ct RNP Oligos 1	Ct RNP Oligos 2
Média Pool positivo	24,57	26,31	21,52	25,22
Média Pool Negativo	28,57	29,47	21,52	25,22

Concluimos que continua ocorrendo uma amplificação não esperada nas amostras de pool negativo. Realizamos um quinto teste (Extração 12 do quadro 4.13), substituindo as amostras negativas por amostras do CCEB. Seguem, abaixo, os resultados obtidos (quadro 4.12), onde foi possível observar o decréscimo de amostras contaminadas frente às 4 primeiras extrações realizadas com apenas uma amostra contaminada.

Quadro 4.12: Resultados obtidos com os oligonucleotídeos H1N1/RNP e MP/RNP no protocolo de teste número cinco preconizado acima e realizado com pool positivo e alíquotas de CCEB. Os resultados estão expressos em Ct.

EXTRAÇÃO 5				
	Ct H1N1	Ct MP	Ct RNP Oligos 1	Ct RNP Oligos 2
Média Pool Positivo	25,85	27,62	26,13	26,72
Amostras CCEB contaminadas	1	–	–	–

Verifica-se que o pool negativo do quadro 4.11 apresentou amplificação, e que o teste feito com amostras “brancas” (CCEB) revelou a amplificação (contaminação em alguma etapa) de uma das 12 alíquotas utilizadas, corroborando a necessidade da limpeza mecânica preconizada no protocolo. A partir deste momento, o procedimento de limpeza mecânica passa a ser obrigatório no início de cada extração.

A reprodutibilidade na realização das extrações propostas foi satisfatória para todas as extrações e amplificações (coeficiente de variação-CV-entre 1 e 2%). O aumento do nessa situação pode ser atribuído à falta de centrifugação dos tubos de PCR antes da colocação dos mesmos no equipamento de amplificação (LionCub), o que pode também justificar a não-amplificação de uma amostra. Esse procedimento foi realizado em todos os demais testes ora apresentados.

Segue abaixo um resumo das extrações efetuadas neste tópico, com as respectivas amostras utilizadas, além dos resultados obtidos (quadro 4.13).

Teste Extração	Número de amostras		SM	Pool positivo	Pool negativo	RNAse Free	Resultado esperado	Comentários
	CCEB							
Teste 1	12	6	6	1	1	1	Amplificação de positivos e ausência de amplificação no controles negativos (água RNAse FREE)	Amplificação de resultados negativos, realizado protocolo de limpeza conforme metodologia
Teste 2	12	6	6	1	1	1	Amplificação de positivos e ausência de amplificação no controles negativos (água RNAse FREE)	Amplificação de resultados negativos, realizado protocolo de limpeza conforme metodologia
Teste 3	12	6	6	1	1	1	Amplificação de positivos e ausência de amplificação no controles negativos (água RNAse FREE)	Amplificação de resultados negativos, realizado protocolo de limpeza conforme metodologia
Teste 4	4	-	-	10	10	-	Amplificação de positivos e ausência de amplificação no controles negativos, além da ausência de amplificação nos tampões CCEB	50 % das amostras negativas apresentaram amplificação. repetição do protocolo de limpeza
Teste 5	24	-	-	-	-	-	Ausência de amplificação nos tampões CCEB	Somente uma amostra apresentou amplificação
Teste 6	2	-	-	10	-	-	Reprodutibilidade da amostras positivas	Reprodutibilidade satisfatória e ausência de contaminação nas amostras de tampão CCEB
Teste 7	2	-	-	10	-	-	Reprodutibilidade da amostras positivas	Reprodutibilidade satisfatória e ausência de contaminação nas amostras de tampão CCEB
Teste 8	-	-	-	12	12	-	Amplificação de positivos e ausência de amplificação no controles negativos, além da ausência de amplificação nos tampões CCEB	Amplificação de amostras negativas
Teste 9	-	-	-	12	12	-	Amplificação de positivos e ausência de amplificação no controles negativos, além da ausência de amplificação nos tampões CCEB	Amplificação de amostras negativas
Teste 10	-	-	-	12	12	-	Amplificação de positivos e ausência de amplificação no controles negativos, além da ausência de amplificação nos tampões CCEB	Amplificação de amostras negativas
Teste 11	-	-	-	12	12	-	Amplificação de positivos e ausência de amplificação no controles negativos, além da ausência de amplificação nos tampões CCEB	Amplificação de amostras negativas. Suspeita-se do pool de amostras negativas. Fica evidenciada a necessidade de limpeza mecânica
Teste 12	12	-	-	12	-	-	Amplificação de positivos e ausência de amplificação no controles negativos, além da ausência de amplificação nos tampões CCEB	Somente uma amostra de tampão CCEB apresentou amplificação.

Quadro 4.13: Resultados obtidos nas 12 extrações realizadas no tópico 4.3, com as respectivas amostras utilizadas e resultados obtidos.

4.4 - Teste com diferentes condições de master mix, e comparação entre sondas purificadas e não purificadas por HPLC.

Foi realizado um PCR em tempo real de pool de RNAs positivos para H1N1, pool de RNAs positivos para InfA sazonal e pool de RNAs negativos para H1N1 e InfA sazonal com master mix de diferentes composições e com sondas não purificadas e purificadas por HPLC, para observar se o master mix utilizado representa a melhor opção para o ensaio em questão. Foi verificado, ainda, se o processo de purificação ou não das sondas por HPLC interfere no resultado final.

As alíquotas de RNAs pool H1N1, pool InfA, pool NEG, amostras de H1N1 e mais um NTC foram amplificados em PCR em tempo real, utilizando-se 7 condições diferentes de master mix. Cada uma dessas 7 condições foi testada duas vezes, uma com o conjunto de oligonucleotídeos 1 (H1N1/RNP) constituído por sondas não purificadas por HPLC e em uma reação duplex composta pelos primers H1N1 e MP e por suas respectivas sondas purificadas por HPLC. As 7 composições de master mix testadas estão descritas, a seguir, no quadro 4.14.

Quadro 4.14: Condições de concentrações de MgSO₄, dNTP, primers, sondas, *Taq* polimerase (*Taq*) e Reverse transcriptase (RT) utilizadas nos testes realizados.

	MgSO ₄ 100mM	dNTP 10mM	10uM primers	5uM sondas	<i>Taq</i> 5U/ul	RT/uL
Padrão	6mM	0,2 mM	0,4 uM	0,2 uM	0,1 U/ul	0,25 uL
Condição 1	9mM	0,2 mM	0,4 uM	0,2 uM	0,1 U/ul	0,25 uL
Condição 2	3mM	0,2 mM	0,4 uM	0,2 uM	0,1 U/ul	0,25 uL
Condição 3	6mM	0,2 mM	0,4 uM	0,2 uM	0,15 U/ul	0,25 uL
Condição 4	6mM	0,2 mM	0,4 uM	0,2 uM	0,1 U/ul	0,5 uL
Condição 5	9mM	0,2 mM	0,4 uM	0,2 uM	0,15 U/ul	0,5 uL
Condição 6	3mM	0,2 mM	0,4 uM	0,2 uM	0,15 U/ul	0,5 uL

Seguem, abaixo, os resultados obtidos com as condições de reagentes detalhadas no protocolo acima e seus respectivos resultados com a utilização de sondas não purificadas (quadro 4.15 e 4.16), onde fica evidenciado que a condição 6 é a melhor pelos valores de Ct e perfil das curvas, tanto para sondas purificadas e quanto para as não purificadas.

Quadro 4.18: Resultados obtidos em PCR em tempo real realizado com as condições de master mix descritas No quadro 4.14 com sondas purificadas para o oligonucleotídeo RNP. Resultados expressos em Ct. Na condição 4 não houve amplificação. Os resultados estão expressos em Ct. Em azul, a melhor condição verificada entre todas apresentadas.

	Padrão	1	2	3	4	5	6
POOL H1N1	26,52	27,72	26,37	27,59	-	25,79	25,63
Amostra H1N1	25,2	25,94	28,07	25,96	-	24,88	23,99
POOL INFA	26,79	27,44	26,56	27,43	-	25,93	25,27
POOL NEG	-	-	-	-	-	-	-
NTC	-	-	-	-	-	-	37,43

Em todas as condições testadas, a utilização da sonda purificada para H1N1 resultou em valores de Ct inferiores, quando comparados com os valores obtidos com a mesma sonda não purificada, sendo a média dessas diferenças igual a 3,45 Cts. Para ambos os oligonucleotídeos, a condição 4 não apresentou amplificação.

A condição 6 (3mM MgSO₄, 0,2 mM dNTP, 0,4 uM primers, 0,2 uM sondas, 0,15 U/ul *Taq* e 0,5 ul Rt) conduziu ao maior ganho, dentre todas as condições testadas, quando comparada com a condição padrão. O decréscimo foi de, aproximadamente, 1 Ct em três das quatro amplificações analisadas (o fato não foi observado para os resultados obtidos com a sonda RNP não purificada). Em um primeiro momento, não foi efetuada a alteração da composição do master mix, em virtude do tempo necessário que essa padronização iria demorar. Tal prazo era incompatível com a finalização do trabalho, posteriormente efetuaremos esta padronização da mistura de PCR em tempo real.

4.5- Comparações entre o método de extração semiautomatizado (Labturbo) e o método de extração manual (Invitrogen) e entre dois equipamentos de PCR em tempo real (LionCube e ABI 7500)

Para a comparação do modelo preconizado pelo CDC com o modelo proposto, foram utilizadas amostras em diluições seriadas com fator de diluição igual a 4, a partir de um pool de amostras positivas para H1N1. Foram usadas, para extração, o equipamento automatizado Labturbo e a posterior realização de PCR em tempo real, tanto no LIONCUB quanto no ABI 7500. O mesmo ensaio foi repetido utilizando o kit manual de extração Pure Link Viral RNA/DNA Minikit da Invitrogen, para a

comparação da eficiência de extrações manuais do modelo preconizado pelo CDC e o equipamento proposto para a utilização na rede de vigilância, que seria o LABTURBO.

Ainda acrescenta-se a realização do PCR em tempo real utilizando as sondas não purificadas por HPLC e as sondas purificadas por HPLC nos equipamentos de PCR LionCub e ABI 7500. O objetivo era efetuar uma comparação entre a eficiência do método de extração automatizado e o método manual e, ainda, um cotejo entre os equipamentos de PCR LionCub e ABI 7500, bem como entre as sondas não purificadas e purificadas por HPLC nos equipamentos de PCR LionCub e ABI 7500.

Realizou-se a extração de 12 alíquotas de 200ul consistindo em: 2 alíquotas de amostra pura, 2 alíquotas de amostra diluída 4 x , 2 alíquotas de amostra diluída 16 x, 2 alíquotas de amostra diluída 64 x, 2 alíquotas de amostra diluída 256 x, 2 alíquotas de amostra diluída 1024 x , representando cada ponto, em duplicata da reta apresentada gráficos deste tópico e duas amostras “brancas” (CCEB para a extração com o Labturbo e água RNase FREE para a extração manual) e o PCR em tempo real das amostras extraídas. Estas foram amplificadas com o conjunto de oligonucleotídeos 1 (H1N1/RNP), constituído por sondas não purificadas por HPLC, com o conjunto de oligonucleotídeos 2 (MP/RNP), também composto por sondas não purificadas, e em uma reação duplex composta pelos primers H1N1 e MP e por suas respectivas sondas purificadas por HPLC.

No primeiro teste desta etapa, foi realizada uma extração automatizada no equipamento Labturbo das alíquotas em fatores de diluição de ordem 4, sendo usada uma amostra pura, e esta mesma amostra diluída em 4, 16, 64, 256, 1024 vezes com uma amostra sabidamente negativa. Foram utilizadas sondas não purificadas do oligonucleotídeo 1(H1N1/RNP) para a realização da reação de PCR em tempo real tanto no ABI 7500 quanto no LionCube. O principal objetivo era observar se haveria uma diferença significativa nos resultados de PCR em tempo real expressos em Ct. O resultado desta reação fica evidenciado na figura 4.3, onde as linhas que representam as diluições nos pontos acima detalhados não apresentaram diferenças significativas consideráveis entre os resultados das extrações posteriormente verificadas em diferentes equipamentos de amplificação.

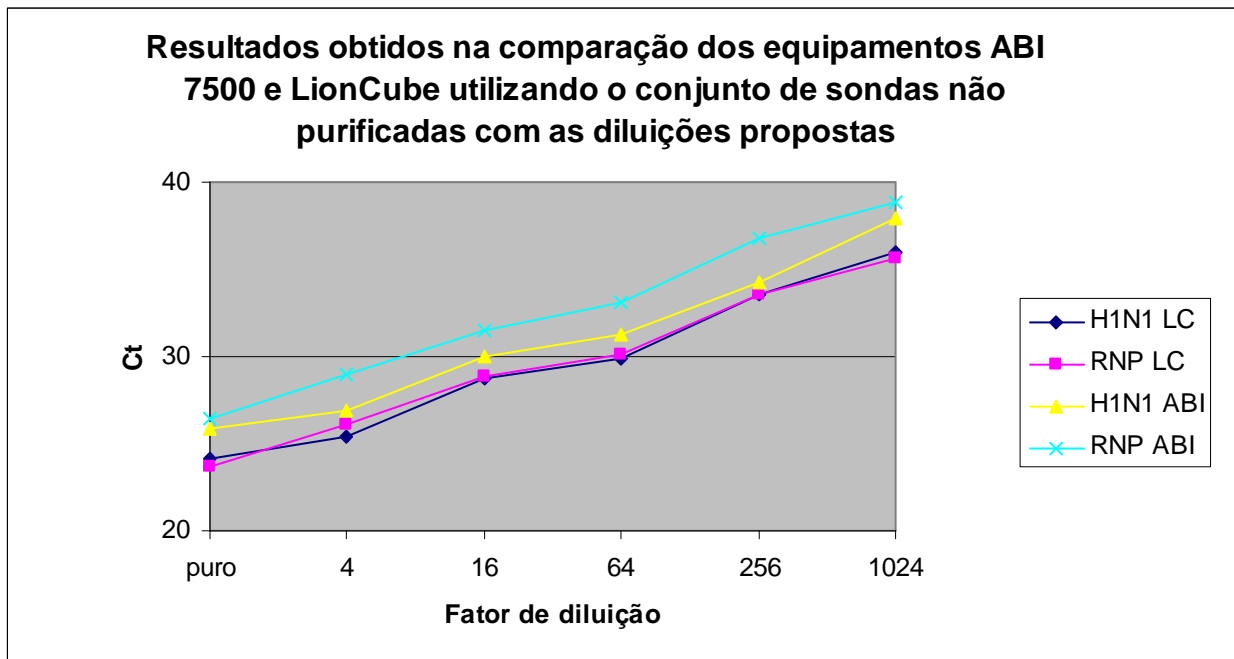


Figura 4.3: Gráfico com os resultados positivos para o oligonucleotídeo 1(H1N1\RNP), com os respectivos fatores de diluição em ordem crescente. Legenda ao lado. LC-lioncube, ABI-ABI 7500

Posteriormente, o mesmo protocolo de experimento foi repetido com o conjunto de oligonucleotídeos 2 (MP/RNP), com as sondas não purificadas, e sua amplificação foi realizada no ABI 7500 e no LionCub. O resultado desta reação fica evidenciado na figura 4.4, onde as linhas que representam as diluições nos pontos acima detalhados não apresentaram diferenças significativas consideráveis entre os resultados das extrações posteriormente verificadas em diferentes equipamentos de amplificação.

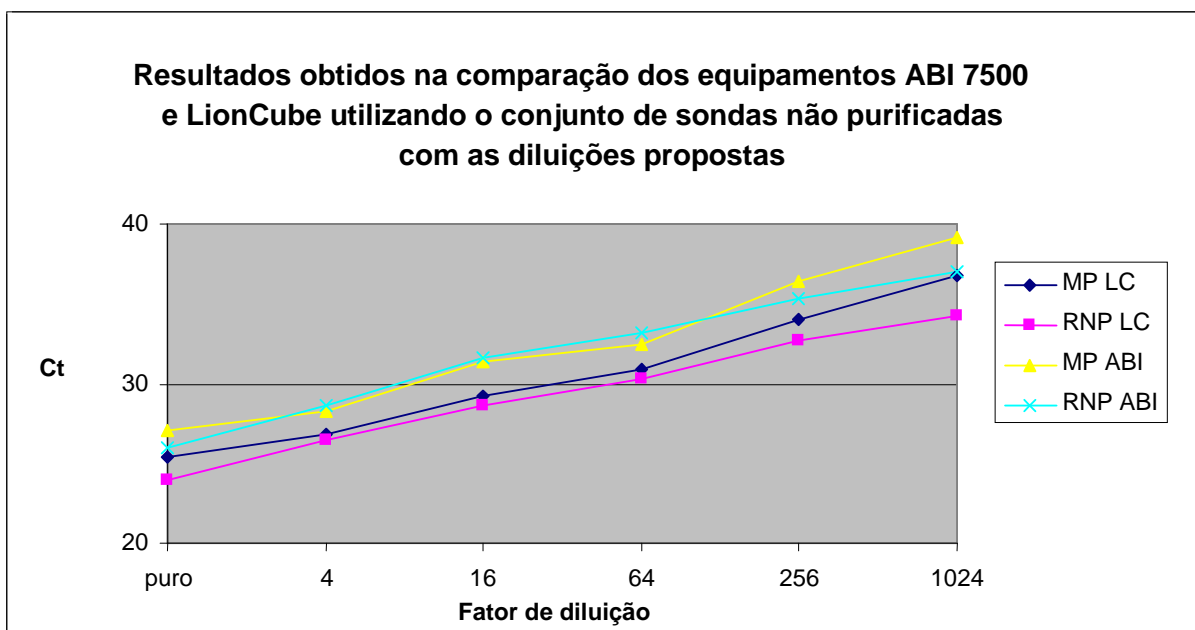


Figura 4.4: Gráfico com os resultados positivos para o oligonucleotídeo 2(MP\RNP), com os respectivos fatores de diluição em ordem crescente. Legenda ao lado. LC-lioncube, ABI-ABI 7500.

Como relatado anteriormente, o mesmo procedimento realizado nas figuras 4.3 e 4.4 com sondas não purificadas foi repetido com o oligonucleotídeo 1 composto por sondas purificadas. Este resultado está detalhado na figura 4.5, onde as linhas sobrepostas não demonstram haver diferença significativa nas amplificações.

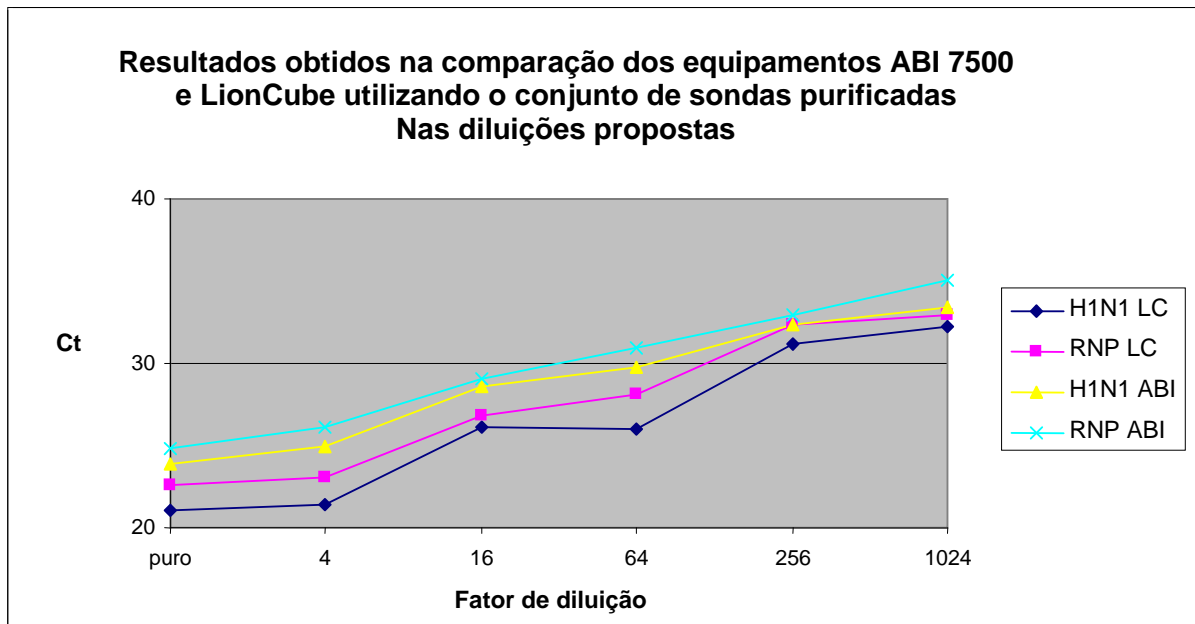


Figura 4.5: Gráfico com os resultados positivos para o oligonucleotídeo 1 (H1N1\RNP), com os respectivos fatores de diluição em ordem crescente. Legenda ao lado. LC-lioncube, ABI-ABI 7500.

Como comparativo com o modelo do CDC para o diagnóstico-padrão do H1N1, foi repetido o mesmo experimento, com os mesmos fatores de diluição e os mesmos conjuntos de sondas, tanto purificadas quanto não purificadas.

Na figura 4.6, segue o gráfico com os resultados positivos do conjunto de oligonucleotídeos 1 (H1N1\RNP) purificados, com a amplificação de PCR em tempo real realizada nos dois equipamentos, ABI 7500 e LionCube. A extração manual foi realizada segundo o protocolo do Kit InvitrogenTM, detalhado na metodologia. Apesar de ter havido um provável erro na alíquota de diluição n 64, a sobreposição das retas evidencia a eficiência de ambos os equipamentos de PCR em tempo real. Podemos confirmar tal achado também em relação à figura 4.7, onde a comparação foi feita com o oligonucleotídeo 2 (MP/RNP) não purificado.

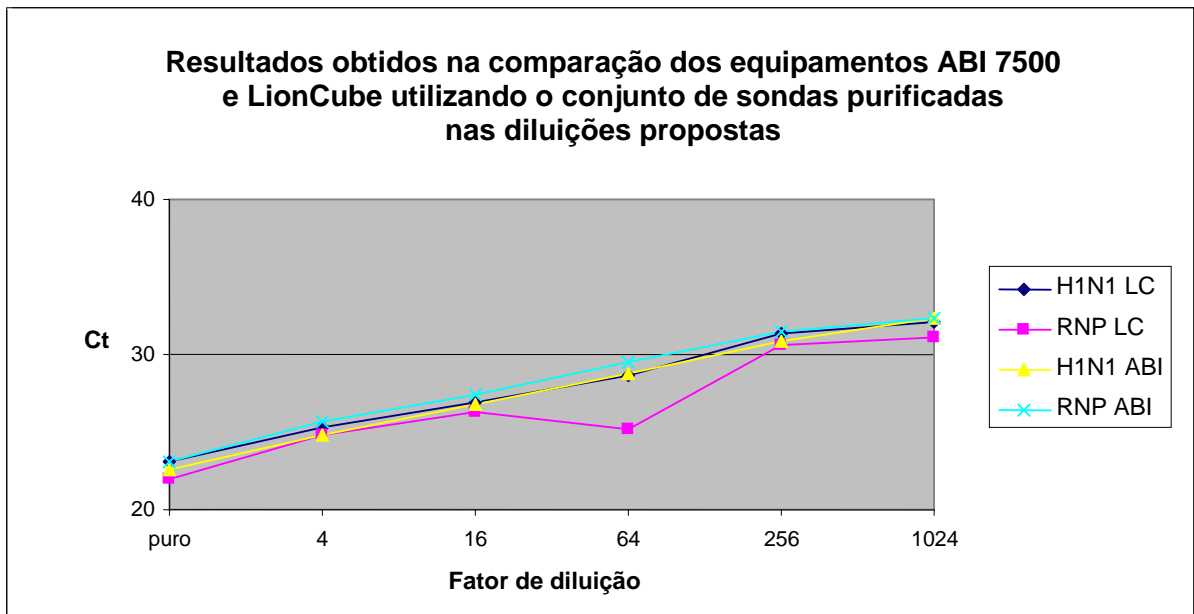


Figura 4.6: Gráfico com os resultados positivos para o oligonucleotídeo 1 (H1N1\RNP), extraídos por extração manual com os respectivos fatores de diluição em ordem crescente. Legenda ao lado. LC-lioncube, ABI-ABI 7500.

Segue, abaixo, um novo teste, realizado sob as mesmas condições de extração e amplificação da figura 4.6, mas, desta vez, com o conjunto de oligonucleotídeos 2 não purificados (figura 4.7).

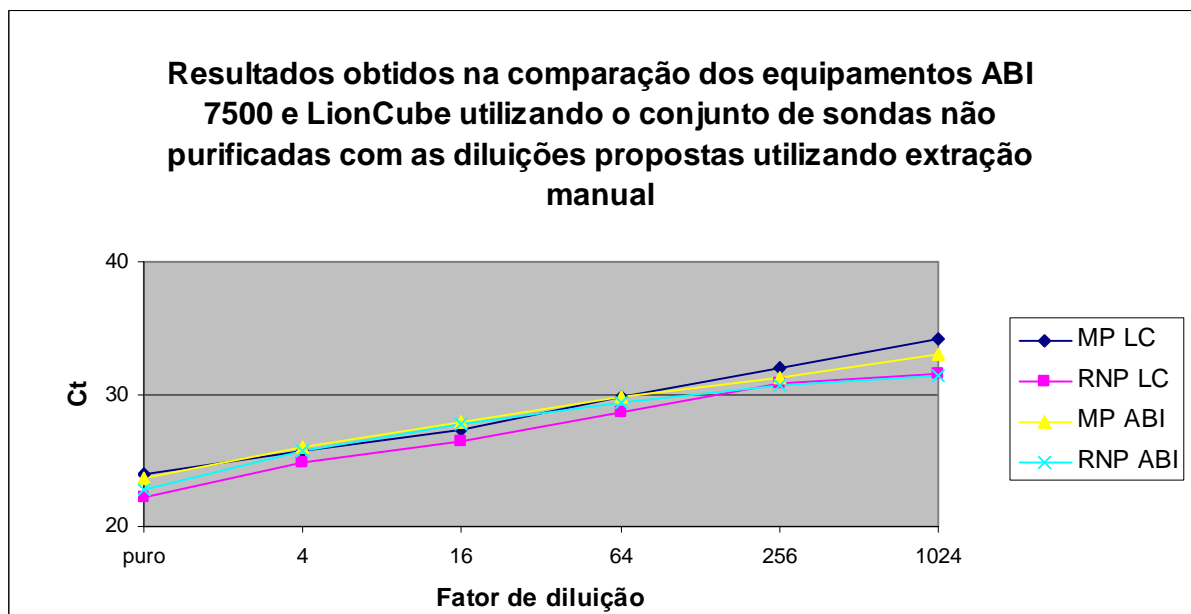


Figura 4.7: Gráfico com os resultados positivos para o oligonucleotídeo 2 (MP\RNP), extraídos por extração manual com os respectivos fatores de diluição em ordem crescente. Legenda ao lado. LC-lioncube, ABI-ABI 7500.

Foi efetuado o mesmo protocolo, realizado sob as mesmas condições de extração e amplificação da figura 4.6, com o conjunto de oligonucleotídeos 1 de sondas purificadas. Apesar do provável erro ocorrido durante o processamento da amostra na diluição 64, a sobreposição das retas evidencia que não há diferenças

significativas entre os equipamentos de PCR em tempo real descritos na metodologia. (figura 4.8).

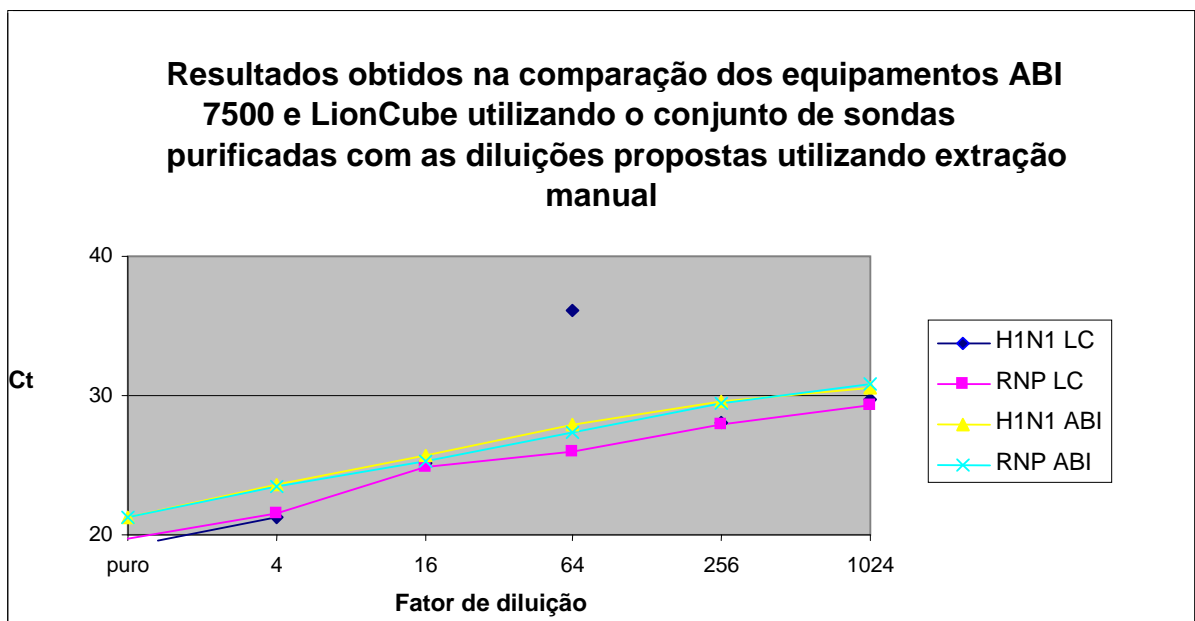


Figura 4.8: Gráfico com os resultados positivos para o oligonucleotídeo 1 (H1N1\RNP), extraídos por extração manual e amplificados com sondas purificadas com os respectivos fatores de diluição, em ordem crescente. Legenda ao lado. LC-lioncube, ABI-ABI 7500.

Como um dos principais objetivos do trabalho consiste no estabelecimento de modelo alternativos, mais ágeis e simples que o preconizado pelo CDC, segue, na figura 4.9 abaixo, um comparativo de extração manual e semiautomatizada, em amplificação realizada no Lioncube com o conjunto de oligonucleotídeos 1 com sondas purificadas. A sobreposição das retas evidencia que não há diferenças significativas entre as extrações manuais e semi-automatizadas propostas no trabalho, e que sua utilização foi uma decisão acertada no decorrer do trabalho, pois se agrega a rastreabilidade e a redução de tempo para o usuário.

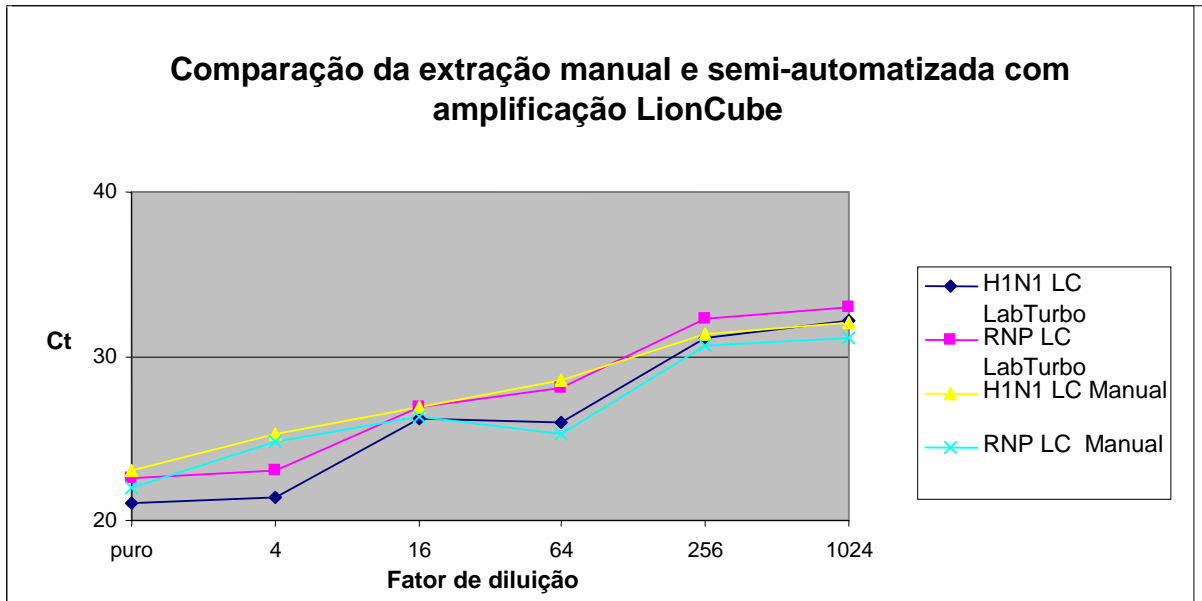


Figura 4.9: gráfico com os resultados positivos para o oligonucleotídeo 1 (H1N1\RNP), extraídos por extração manual e semiautomatizada, e amplificados com sondas purificadas com os respectivos fatores de diluição em ordem crescente. Legenda ao lado.

5 - DISCUSSÃO

Há mais de 60 anos, a comunidade científica tem trabalhado no aperfeiçoamento de técnicas mais eficientes para o diagnóstico. Apesar do êxito, logo no início, das técnicas sorológicas no desempenho desse papel, com o advento da biologia molecular, foram introduzidas novas perspectivas no âmbito do desenvolvimento tecnológico de ensaios, tais como a identificação de vírus e bactérias e a quantificação de patógenos. Os diagnósticos por técnicas moleculares estão presentes na maioria dos hospitais e laboratórios, devido às suas características de eficiência, sensibilidade rapidez e qualidade. Um diagnóstico rápido e eficiente é uma ferramenta que, muitas vezes, significa um tratamento mais eficaz devido a possibilidade de administrar fármacos específicos, aumentando a qualidade de vida do paciente, e levando a um melhor prognóstico e até à cura. (Ratcliff et al., 2007 Bustin, 2000; Vernet, 2004).

Como inicialmente descrito neste trabalho, as tendências das novas tecnologias para o diagnóstico laboratorial estão voltadas para testes que permitam a detecção simultânea de diversos patógenos e suas tipagens, em um grande número de amostras, com simples execução, com sistemas automatizados ou semiautomatizados, e que forneçam resultados em um curto período de tempo (Dunbar et al, 2003).

A escolha de um modelo de diagnóstico molecular pela técnica de PCR em tempo real com o sistema Taqman®, associado a uma matriz de extração semiautomatizada, torna-se uma escolha compatível com o desenvolvimento científico e tecnológico atual, aliando a capacidade de acurácia necessária, para ensaios moleculares, à possibilidade de transferência de tecnologia. Fica evidenciado, no decorrer da dissertação, que o objetivo é o fornecimento de uma matriz diagnóstica que atenda aos requisitos citados na figura 3.1, e, ainda, a real possibilidade de agregação da tecnologia envolvida ao complexo industrial da Saúde (Temporão et al,2003).

A metodologia de PCR em tempo real se consolida, cada vez mais, como um método diagnóstico (Mackay et al., 2002; Niesters, 2001), o que deve ser atribuído à facilidade de execução dos ensaios, à menor necessidade de manipulação, e à simultaneidade entre detecção do alvo e a ocorrência da reação diagnóstica. A

ausência de manipulação após a etapa de amplificação, além de conferir maior reprodutibilidade, possibilita a obtenção dos resultados em um curto período de tempo (Laue et al., 1999; Ratcliff et al., 2007; Shu et al., 2003). Essa técnica é considerada mais sensível e específica, além de mais rápida, do que as técnicas tradicionais de amplificação e, portanto, extremamente apropriada para o diagnóstico molecular em laboratórios clínicos (Bustin, 2000; Vernet, 2004). Além das vantagens já citadas, a PCR em tempo real também possui a característica de ser um ensaio qualitativo e quantitativo, possibilitando a quantificação do RNA ou DNA adicionado no início da reação, e, portanto, a determinação da carga viral, em uma ampla faixa de concentrações (Niesters, 2001).

Na área de diagnóstico, a necessidade de inovação é constante, constituindo um requisito obrigatório para o desenvolvimento voltado para a Saúde Pública e o correto investimento dos recursos. É importante ressaltar que os parceiros tecnológicos envolvidos nesse trabalho têm, como motivação principal, a efetiva utilização dos recursos públicos. Uma ferramenta utilizada para atingir esse objetivo é a transferência de tecnologia, que visa à nacionalização dos processos, agregando conhecimento, diminuindo dependências e custos, e viabilizando o desenvolvimento de produtos de ponta na área diagnóstica.

Em Ferreira, 2005, tivemos um exemplo claro de agregação de tecnologia e diminuição de custos, com a transferência do HIV Statpak da empresa Chembio para Bio-Manguinhos. Essa iniciativa gerou economia, além de trazer uma nova plataforma tecnológica para o parque de desenvolvimento de produtos desta unidade. Esta iniciativa mostrou-se tão eficiente que, nos últimos 7 anos, outros 5 contratos de transferência para testes de HIV, Leishmaniose, Sífilis e Leptospirose foram assinados, e estão em processo de execução, com a nova plataforma DPP (*Dual Path Platform*).

A partir do início da pandemia de influenza de 2009, evidenciou-se a necessidade de uma alternativa diagnóstica para o modelo CDC, devido a diversos atrasos no fornecimento de insumos para a detecção em ensaios *in house* do vírus. Ficou claro que o diagnóstico em território nacional, em um país com dimensões continentais, só seria possível com uma matriz nacionalizada, sem dependência de multinacionais, minimizando as questões alfandegárias para o fornecimento de insumos. Ressalta-se, ainda, que o custo e atrasos do modelo CDC registrados no início da pandemia inviabilizaram a implementação de uma ampla rede diagnóstica que pudesse atender plenamente ao SUS, acarretando enormes atrasos na entrega dos resultados aos pacientes, no auge da pandemia. Esses atrasos eram de aproximadamente 30-40 dias

após o previsto, causando deficiência no tratamento dos pacientes acometidos pela infecção.

A premência de um diagnóstico rápido, eficiente e preciso se deve à reação da população frente à infecção pela influenza A H1N1, que tem como principal mecanismo de transmissão à via aérea (Perez-Padilha, 2010). Embora, em sua maioria, os quadros não evoluam para óbito, sua disseminação (tanto pelo ar como pelo contato) em todas as faixas de idade e de renda, assim como a sua rápida propagação, potencializam cobranças da população em relação à assistência médica e diagnóstica. A infecção pela Influenza A H1N1 acarreta graves problemas de atendimento nas redes pública e privada de saúde, além de implicar na incapacitação momentânea do indivíduo para a realização de suas atividades profissionais, sobretudo quando esta evolui para um quadro de superinfecção.

O modelo do CDC foi preconizado como padrão-ouro no diagnóstico durante a pandemia. Segundo Whiley e colaboradores, em um trabalho publicado em 2009, o uso desse modelo para o diagnóstico e a diferenciação da Influenza A H1N1 e de outras influenzas sazonais é eficiente em 98 % dos casos. Por esse motivo, ele também foi usado como padrão-ouro no decorrer dessa dissertação, onde foram observados índices similares em comparação ao modelo brasileiro, conforme apresentado nos quadros 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6.

O consórcio formado pelo IBMP e Bio-Manguinhos planejou e executou o projeto de nacionalização do diagnóstico de Influenza A H1N1, com a transferência de tecnologia de uma matriz de extração semiautomatizada associada a insumos, mistura de PCR, RT (*reverse transcriptase*) e oligonucleotídeos produzidos nacionalmente. Os resultados preliminares da prova de conceito e validação dos insumos de extração, de RT-PCR e dos oligonucleotídeos supracitados foram satisfatórios, quando comparados aos insumos preconizados pelo CDC, conforme observado nos quadros 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6. Estes resultados indicam a viabilidade do uso desse desenho nacional, pois os seus níveis de sensibilidade e especificidade são compatíveis com aqueles obtidos no protocolo do CDC. Além disso, a padronização dos ensaios levou a ganhos na eficiência da reação, como, por exemplo, a utilização de sondas purificadas pela técnica de HPLC e a otimização do master mix. Essa análise fica evidenciada quando se é analisado o perfil das curvas no equipamento de PCR em tempo real.

Os resultados obtidos com os equipamentos permitem extrapolar para novas matrizes de análise, onde outros critérios podem ser reanalisados, ficando evidenciada a necessidade de sistemas de extração, com testes que comprovem de maneira indiscutível a ausência de contaminação cruzada, evento que gerou uma carga

desnecessária de trabalho no decorrer desta dissertação. O risco de resultados falso-positivos e falso-negativos deve ser minimizado, pois tais achados produzirão impactos diretos sobre direção a ser seguida, e ainda implicarão na geração de dados errôneos para a rede de vigilância epidemiológica.

Em relação à assistência técnica, os critérios adotados na escolha dos parceiros devem ser mais rígidos, gerando compromissos e responsabilidades mais claros e objetivos na correção de problemas que ocorram durante os processos de padronização. Se isso já tivesse sido adotado durante este processo, os problemas de contaminação cruzada poderiam ter sido minimizados.

Vale a pena salientar que a estimativa de custo de realização deste diagnóstico é significativamente inferior (U\$10/teste – incluídas as plataformas de equipamentos e seu pacote de serviços) ao custo efetivo aferido na primeira onda da pandemia (20 U\$/teste), com uma redução significativa de 50 % do valor inicial do teste. Essa redução do custo deve-se a transferência de tecnologia da Biotools para o IBMP dos insumos da realização de PCR em tempo real, como master mix, tampões de extração e enzima RT. Em Saúde Pública, a influenza A é uma patologia impactante em termos de custo e atendimento, de modo que o seu diagnóstico correto pode levar a ações eficazes de tratamento e à visualização do quadro epidemiológico nacional. Essa diminuição de custo pode representar o acesso de centenas de pessoas a uma melhoria na qualidade de vida, bem como uma diminuição nos impactos sociais causados pela Influenza durante sua infecção.

Todas as empresas participantes (Applied Biosystem, Biotools, BioMeuriex, Promega e Qiagen) também tiveram de esclarecer as questões relacionadas à propriedade intelectuais em território brasileiro, auxiliando nas negociações para a identificação de parceiros que permitam agregar conhecimento e capacitação tecnológica e que, por outro lado, não impliquem em impedimentos em relação a patentes. Devem, também, ser economicamente compatíveis com a realidade nacional em termos de custo e investimentos. A Biotools, como relatado nos resultados, foi a empresa que, naquele momento, respondeu mais efetivamente aos critérios estabelecidos, e ainda que ofereceu o mais amplo pacote de transferência de tecnologia de insumos e de plataformas de extração e PCR em tempo real. A grande lição que pode ser proposta e acrescentada em futuras matrizes de decisão é a realização de testes preliminares dos candidatos com a adição de avaliação prática para os processos decisórios. Assim, acrescentamos como sugestão uma vasta pesquisa nas documentações e publicações relacionadas aos equipamentos, para verificar se estes atendem prontamente ao uso a que serão destinados.

Logo após a liberação dos recursos e assinatura do contrato, a saber, em Março de 2010, iniciou-se o processo de importação de 8 (oito) equipamentos de extração e 8 (oito) de detecção, além dos insumos necessários. O cronograma para embarque das máquinas foi estabelecido para entrega ao longo do mês de Abril, visando aproximar o início do projeto ao prazo originalmente proposto. No decorrer deste período, os locais onde os equipamentos seriam instalados foram visitados e vistoriados, a fim de identificar se as instalações físicas e elétricas eram compatíveis com os equipamentos, ou se necessitariam de adaptações.

Após as instalações dos equipamentos, foi dada continuidade aos objetivos propostos. Com base nos resultados observados nos quadros 4.4, 4.5 e 4.6, fica evidenciado que a utilização de reações duplex com o controle interno da RNP foi uma decisão acertada, pois este modelo diminuiu o número de resultados discordantes. Essa combinação mostrou ser, ao longo do trabalho, a mais eficaz, tanto para o diagnóstico da doença, quanto para a observação e diferenciação da linhagem pandêmica. Nas comparações efetuadas no desenvolvimento deste trabalho, esse modelo constituiu o meio mais eficiente do diagnóstico da Influenza A H1N1. Para os oligonucleotídeos específicos de Influenza A, o conjunto M1 e o conjunto INFA IBMP apresentaram resultados discordantes equivalentes quando comparado ao padrão de referência preconizado pelo CDC. Contudo, apesar de terem apresentado praticamente o mesmo número de resultados discordantes, os valores de Ct obtidos com o conjunto MP foram, para a maioria dos casos, inferiores aos valores obtidos com o conjunto InfA IBMP, indicando uma maior sensibilidade e eficiência da reação. Segundo Carr e colaboradores, em estudo publicado no ano de 2009, a escolha do Gene M1 diminui a ocorrência de resultados discordantes por reações cruzadas inespecíficas, corroborando com os resultados deste trabalho. Sua utilização junto à variante pandêmica resulta em um modelo satisfatório para a diferenciação da influenza circulante.

Ao longo da execução do trabalho, com o sinal de background observado nos resultados, levantou-se a suspeita da possibilidade de contaminação na etapa de extração (devido a aerossóis observados durante esta etapa). Esse fato causou a vinda de um técnico da empresa taiwanesa, que forneceu um protocolo de limpeza, a ser executada antes da etapa de extração. A limpeza mecânica realizada antes de cada extração foi um fator importante para a obtenção de resultados satisfatórios. Essa situação foi fundamental para que se descartassem outras possibilidades que foram levantadas durante o processo, como, por exemplo, a degradação das sondas utilizadas e a inespecificidade dos oligonucleotídeos

Com base nestes resultados, foi definido que o “modelo Brasileiro” de oligonucleotídeos teria como base os alvos moleculares identificados pelos conjuntos H1N1 (específico para influenza H1N1 pandêmica), MP (específico para influenza A, referente ao gene M1, que é altamente conservado), além do controle preconizado pelo CDC (gene Humano RNP). Apesar de representarem um desafio para o desenvolvimento, metodologias que permitam a realização de testes *multiplex* são altamente aplicáveis, pois implicam na redução de custos, trabalho e tempo de processamento (Dunbar, 2006).

A reprodutibilidade das extrações realizadas no Labturbo foi verificada na figura 4.1, onde a variação de Cts entre as extrações 1 e 2 foi insignificante sob o prisma estatístico (menor que 0,02) e, apesar de um provável erro de procedimento na extração 3, a variação continua sendo de apenas 2 Cts, resultado altamente satisfatório para a verificação da reprodutibilidade. O possível erro na etapa de extração não comprometeu o resultado, e apesar da diferença observada, as médias são satisfatórias, não tendo sido evidenciada qualquer necessidade de reprodução do protocolo estabelecido. A figura 4.2 demonstra a eficiência da extração e da amplificação em testes realizados com pool de amostras positivas, como detalhado anteriormente nos resultados, pela sobreposição dos pontos na figura em questão. Fica também evidenciado, nos resultados obtidos, que os coeficientes de variação foram baixos, sempre próximos de zero, o que torna a variabilidade do método reduzida e sua reprodutibilidade e repetibilidade satisfatórios.

As alterações efetuadas no master mix apresentaram diferenças consideráveis nos resultados mostrados (ganho de 1 Ct), embora, num primeiro momento, tenha sido descartada uma nova otimização destes insumos, pois o tempo de realização necessário para a padronização destas novas concentrações não seria compatível com os prazos estipulados para a conclusão do trabalho objeto desta dissertação. Pela experiência adquirida na padronização do kit NAT HIV-HCV, apesar de novas padronizações resultarem em êxito no resultado final, este processo demanda tempo para a certificação desta, devendo ser tal padronização finalizada no futuro.

Como parte do processo de análise e de decisões para o modelo escolhido para a avaliação da sensibilidade e da especificidade, foi realizado um teste com amostras com diferentes concentrações, como verificado no item 4.5. A utilização de diluições seriadas é uma das maneiras mais eficientes de avaliar a extração e a amplificação, tendo se apresentado como uma importante ferramenta para a aferição da reprodutibilidade da extração. O uso de sondas purificadas por HPLC, que é uma

técnica cromatográfica de alta eficiência para purificações, afastou completamente a possibilidade de degradação das sondas, e esses resultados podem ser evidenciados no tópico 4.5, com a diminuição dos Ct com o uso de sondas purificadas. Durante o desenvolvimento do Kit NAT HIV/HCV de Bio-Manguinhos, observou-se a necessidade de utilização de sondas purificadas por HPLC, já que se tratava de um kit diagnóstico, onde reprodutibilidade e sensibilidade são premissas essenciais (Yeung, 2004). Os resultados obtidos nesta dissertação corroboram os que foram obtidos ao longo do projeto NAT (Nucleic Acid Test) e Kit NAT HIV/HCV de Bio-Manguinhos. Cabe ressaltar que parâmetros e valores de reprodutibilidade e especificidade ainda estão sendo calculados e definidos, não havendo ainda dados suficientes para o estabelecimento destes valores.

A comparação da extração manual e do equipamento de extração proposto, assim como a avaliação dos equipamentos de amplificação (ABI 7500 e LionCub), evidenciaram que o modelo proposto nesse trabalho é tão eficiente quanto o proposto no protocolo do CDC. O conjunto de equipamentos escolhidos apresenta vantagens inegáveis como, por exemplo, o ganho de escala de trabalho, já que cada extração tem a capacidade de processamento de 24 amostras em 1 hora e 30 minutos, além da diminuição dos riscos de erro humano, por tratar-se de um equipamento semiautomatizado, e da redução do custo final da reação. Como vantagem adicional, ainda se obtém um ensaio duplex. O teste de PCR em tempo real é uma ferramenta que permite a detecção de mais de um alvo molecular e sua capacidade deve ser explorada, com o propósito de levar à obtenção de resultados mais eficientes.

Em relação à amplificação dos ácidos nucléicos, os resultados demonstraram claramente que não existem diferenças entre as amplificações realizadas tanto no ABI 7500, quanto no LionCub, atestando, assim, que o modelo escolhido de equipamentos e insumos pode substituir com a mesma confiabilidade o modelo preconizado pelo CDC, como ferramenta diagnóstica para a detecção de infecções causadas pelo Influenza A H1N1.

Trabalhos como esse consolidam o modelo de desenvolvimento tecnológico adotado por Bio-Manguinhos nos últimos anos, principalmente na área de reativos para diagnóstico, estabelecendo uma forte atuação em biologia molecular. Com a obtenção de registro do Kit NAT HIV/HCV, concedido no último ano, estabelece-se, pela primeira vez no Brasil, um modelo de diagnóstico nacionalizado, com a incorporação de insumos nacionalizados, em escala industrial, para a formação de uma rede de diagnóstico molecular do Sistema Único de Saúde. Essa cadeia não

fomenta apenas o desenvolvimento, mas também agrega conhecimentos para todas as etapas envolvidas na produção de imunobiológicos, como, por exemplo, produção, garantia de qualidade e controle de qualidade, permitindo, ainda, a consolidação do quadro técnico envolvido. Acrescente-se ainda que a disseminação do conhecimento não ocorre apenas na etapa de fabricação do produto, mas durante toda a prestação de serviços envolvida nesse processo, tornando imperiosa a capacitação de profissionais na área de assistência técnica, com o treinamento e preparo destes.

Apesar de toda a crítica referente à atuação das empresas públicas no desenvolvimento de novas tecnologias, fica evidenciado que, graças ao corpo técnico capacitado, ao apoio institucional, e aos recursos, poderão ser gerados produtos inovadores, com a adaptação necessária à nossa realidade. Este trabalho permite vislumbrar a padronização de novos ensaios para o modelo de vigilância epidemiológica, uma vez que o conhecimento obtido poderá ser utilizado para a melhoria do formato final do modelo H1N1 e, futuramente, para outros ensaios de interesse do Ministério da Saúde para o combate a outras patologias como, por exemplo, Dengue, Leishmaniose, e outros que possam ser igualmente viáveis e dotadas de características que permitam essa adaptação.

6 - CONCLUSÃO

A situação da rede de diagnóstico implementada até o momento do início deste trabalho era deficiente nas ações de confirmação de casos de influenza A H1N1, e apesar da relevância desta patologia no cenário da saúde pública brasileira, não foram tomadas medidas suficientes para o fornecimento de uma estrutura adequada, e nem para a capacitação de recursos humanos para a realização do referido diagnóstico diferencial. Pelos objetivos propostos, conclui-se que:

- O modelo proposto, com o uso de um duplex com controle interno da reação de amplificação (RNP), é eficiente para o diagnóstico da influenza A H1N1 e para sua diferenciação em relação a influenzas sazonais circulantes.
- Foi identificada, testada e definida uma matriz de ácido nucléico semiautomatizada para o protótipo de diagnóstico de Influenza A H1N1, o Labturbo, da empresa Taigen, representada pela Biotools.
- Foi identificado, testado e definido um equipamento de PCR em tempo real, LionCube, da empresa BioTools, destinado ao protótipo de diagnóstico de Influenza A H1N1.
- Foram definidos critérios, tendo sido formada uma matriz de decisão que avalia custos, assistência técnica, propriedade intelectual, rastreabilidade, sensibilidade e facilidade de execução dos ensaios, resultado na definição do parceiro para a transferência de tecnologia de equipamentos e insumos.
- Ficou estabelecido um protótipo de Kit diagnóstico para o diagnóstico e diferenciação da influenza A H1N1, que possui eficiência similar ao CDC.
- Esta proposta de modelo será aplicada a outros desenvolvimentos de ensaios moleculares para a rede de vigilância epidemiológica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Berensmeier S. **Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids.** Applied Microbiology and Biotechnology. 2006; 73(3):495-504.

Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, **Boletim epidemiológico, Caderno especial Influenza.** Núcleo de comunicação. Ano 10:2, 2010.

Buckingham L and Flaws ML. **Molecular diagnostics: fundamentals, methods & clinical applications.** 2007.

Bustin SA. **Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.** Journal of Molecular Endocrinology. 2000; 25:169-93.

Carr JC, Gunson R, Maclean A, Coughlan S, Fitzgerald M, Scully M, O'Herlincy B, Ryan J, O'Flanagan D, Connel J, Carman WF, Hall WW. **Development of a real time RT-PCR for detection of Swine-lineage Influenza A (H1N1) virus infection.** Journal of clinical virology. 2009;45:196-199.

Center of Diseases Control(CDC), **Influenza A**, [capturado em junho de 2010], [On-line], disponível em www.cdc.com.br/flu,

Center of Diseases Control(CDC), **CDC Realtime RT-PCR swine flu**, [capturado em junho de 2010], [On-line], disponível em http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR_SwineH1Assay-2009_20090430.pdf

Cikos S, Koopel J. **Transformation real-time PCR fluorescence data to target gene quantity.** Analytical Biochemistry. 2009; 384:1-10.

Csako, Gyorgy. **Present and future of rapid and/or high-throughput methods for nucleic acid testing.** Clinical Chimica Acta. 2006; 363:6-31.

Dunbar SA, Vander Zee CA, Oliver KG, Karem KL, Jacobson JW. **Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP system.** Journal of Microbiological Methods. 2003; 53(2):245-52.

Ferreira AGP. **Processo de transferência da tecnologia de produção do teste rápido de HIV-1 e HIV-2 em Bio-Manguinhos: um modelo para a incorporação de novas tecnologias.**2005

Flutracker , **Mapa da distribuição de casos de Influenza A H1N1**, , [Capturado em março de 2011] .[On-line] Disponível em http://flutracker.rhizalabs.com/flu/by_status_and_num.html.

Forrest LH, Webster RG. **Perspectives on influenza evolution and the role of research.** Animal Health Research Reviews. 2010; 11(1): 3-18.

Fouchier RAM, Bestebroer TM, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME. **Detection of Influenza A Viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene.** Journal of clinical microbiology. 2000; 38:4096-4101.

Freeman WM, Robertson DJ, Vrana KE. **Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis.** Biotechniques. 2000; 29(5):1042-6, 1048-55.

Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom, Balish A, Sessions WM, Xu X, Skepner E. **Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) Influenza Viruses circulating in humans.** Science. 2009; 325:197-201.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. **Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences.** Biotechnology (N Y). 1992; 10(4):413-7.

Laue T, Emmerich P, Schmitz H. **Detection of dengue virus RNA in patients after primary or secondary dengue infection by using the TaqMan automated amplification system.** Journal of Clinical Microbiological. 1999; 37(8):2543-7.

Lee LG, Connell CR, Bloch W. **Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes.** Nucleic Acids Research. 1993; 11:21(16):3761-6.

Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. **Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization.** PCR Methods.1995 ;4(6):357-62.

Loureiro B. **Surto de Influenza equine ocorrido em 2001 no estado do Rio de Janeiro: caracterização do vírus e avaliação do esquema vacinal**, 2004.

Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. **Real-time PCR in virology**. Nucleic Acids Reseach. 2002; 15; 30(6):1292-305.

McHardy AC, Adams. **The role of genomics in tracking the evolution of influenza A Virus**. PLoS Pathog. 2009; 5(10):10.1371.

Mullis KB, Faloona FA. **Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction**. Methods Enzymology. 1987; 155:335-50.

Nicholson KG, Webster RG, Hay AJT. **Textbook of Influenza**, 1998.

Niesters HG. **Standardization and quality control in molecular diagnostics**. Expert Review Molecular Diagnostics. 2001; 1(2):129-31.

Perez-Padilha R, de la Rosa-Zamboni D, Ponce de Leon S, Hernandez M, Quiñones-Falconi F, Bautista E, Ramirez-Venegas A, Rojas-Serrano J, Ormsby CE, Corrales A, Higuera A, Mondragon E, Cordova-Villalobos JA. **Pneumonia and respiratory failure from swine-origin Influenza A H1N1 in Mexico**. New England Journal of medicine. 2009; 361:680-689.

Poesch C. **Desenvolvimento e avaliação dos métodos moleculares para dengue**. 2007

Ratcliff RM, Chang G, Kok T, Sloots TP. **Molecular diagnosis of medical viruses**. Current Issues Molecular Biology. 2007; 9(2):87-102.

Schintzler, S. **Originate of swine virus A/H1N1: An Review**. Virus Gene. 2009; 59:279-292

Shu PY, Chang SF, Kuo YC, Yueh YY, Chien LJ, Sue CL, Lin TH, Huang JH. **Development of group- and serotype-specific one-step SYBR green I-based real-time reverse transcription-PCR assay for dengue virus**. Journal of Clinical Microbiological. 2003; 41(6):2408-16.

Sullivan JS, Jacobson RM, Dowdle RW, Poland GA. **2009 H1N1 influenza**. Mayo Clinic Proceedings. 2010; 85 (1):64-76.

Temporão JG, Buss PM, Gadelha, CAG. **Projeto Inovação em Saúde**. Revista Rio de Janeiro. 2003; 11: 89-200.

Vernet G. **Molecular diagnostics in virology**. Journal of Clinical Virology. 2004; 31(4):239-47

Wen J, Legendre LA, Bienvenue JM, and Landers JP. **Purification of nucleic acids in microfluidic devices**. Analytical Chemistry Feature. 2008; 80:6472-9.

Whiley MD, Bialasiewicz S, Bletchly C, Faux CE, Harrower B, Gould AR, Lambert SB, Nimmo GR, Nissen MD, Sloots TP. **Detection of novel influenza A (H1N1) virus by real-time RT-PCR**. Journal of clinical virology. 2009; 45:203-209.

World Health organization. **WHO manual of influenza diagnostics**. 2002

Yeh H, Yates MV, Chen W, Mulchandani A. **Real-time molecular methods to detect infectious viruses**. Seminars in Cell & Developmental Biology. 2009; 20:49-54.

Yeung A.T., Holloway B.P, Adams P. S., Shipley G.L. **Evaluation of dual-labeled fluorescent DNA probe purity versus performance in a real-time PCR**. Biotechniques. 2004; 36(2):266-275.