

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA AMBIENTE NA ANÁLISE DO TERMOCICLADOR

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

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

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

e-mail: easantos@inca.gov.br

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

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

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

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

Introdução

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

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

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

Materiais e métodos

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

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

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

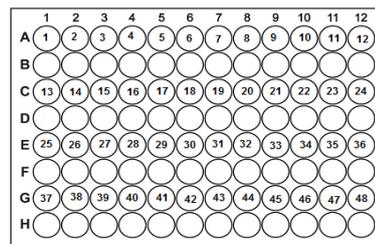


Figura 1: Esquema das posições dos 48 sensores.



Figura 2: Experimento TA com os 48 sensores.

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

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

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

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

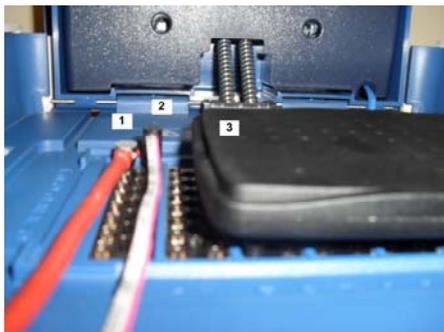


Figura 3: Exemplo de conexão de sensores ao bloco térmico do termociclador, nos três experimentos: sensor experimento TTF (1), sensor experimento TPF (2) e placa com sensores do experimento TA (3).

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



Figura 4: Experimento TTF com os 3 sensores.

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

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

uniformidade dos 37 equipamentos nas três temperaturas, por experimento. As estimativas de IC95% foram analisadas com relação aos valores de referência preconizados pelos fabricantes de termocicladores com tolerância de +/- 0,25°C para a exatidão e variação máxima de 0,5°C para a uniformidade.

Resultados

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

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

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

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

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

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

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

A Figura 5 apresenta o diagrama de caixa para as medidas de uniformidade obtidas para os três experimentos nas três temperaturas. Ilustra que às adaptações realizadas nos sensores usados no experimento TTF, além de apresentarem valores mais próximos ao padrão do fabricante quando comparados aos outros experimentos, permitem melhor visualização de equipamentos com valores discrepantes de uniformidade (Figura 4 – TTF), não identificados nos experimentos TA e TFP, por exemplo, equipamentos: 20, 11, 34 e 10.

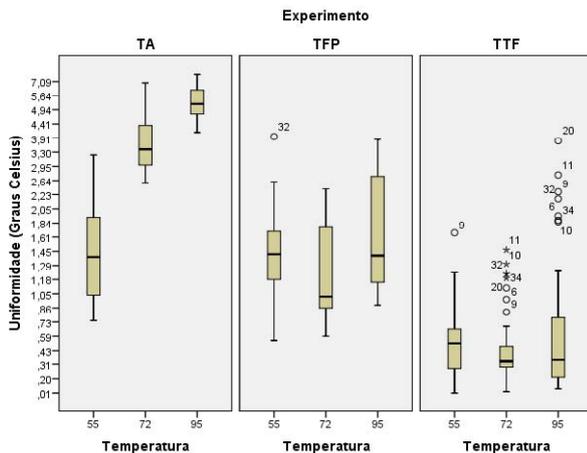


Figura 5: Diagrama de caixa das medidas de uniformidade para os três experimentos por temperatura.

Discussão

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

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

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

Neste sentido os resultados do estudo demonstraram que é recomendável verificar a temperatura dos termocicladores com a tampa totalmente fechada, sem influência do ambiente. Os sensores modificados para as análises de temperatura com TTF foram capazes de medir a temperatura com exatidão aceitável. Em síntese, a condição TTF demonstrou resultados melhores do que os obtidos nas condições TA e TFP; e com capacidade para reconhecer equipamentos com necessidades de correção.

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

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

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

Agradecimentos

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

Referências

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