

## BIOLOGIA MOLECULAR

### Como garantir a qualidade nos resultados - Parte 1

O desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR) como um componente básico do laboratório de biologia molecular ocorreu muito rapidamente desde sua invenção em 1985. Desde então, mais de 15.500 artigos foram publicados em que esta técnica foi usada. Enquanto a técnica de PCR se tornou cada vez mais usada, os cientistas aprenderam rapidamente mais sobre ela e, em consequência, aprenderam que a PCR tem seus pontos fortes e suas deficiências. A PCR demonstrou seu poder de amplificar quantidades muito pequenas (por exemplo, uma única cópia) de ácidos nucleicos e de amplificar ácidos nucleicos diferentes (por exemplo, DNA e RNA). Ao mesmo tempo, a equipe do laboratório aprendeu que esta reação bioquímica tinha uma deficiência específica: uma forte susceptibilidade à contaminação com seu próprio produto. As experiências iniciais com a PCR logo mostraram que precauções adicionais eram necessárias (Lo et al. 1988; Kwok e Higuchi 1989). Este artigo é dedicado a explicar como estabelecer um laboratório de PCR cujas operações dêem resultados de confiança, ausentes de contaminação.

#### CONTAMINAÇÃO

A contaminação da PCR permanece um problema para os laboratórios que executam procedimentos forenses e procedimentos de detecção de agentes infecciosos (Pellett et al. 1999; Scherzinger et al. 1999). Há uma série de abordagens ao controle da contaminação de PCR, e o grau de exigência que é requerido em um laboratório é determinado frequentemente pelo tipo de procedimentos e exames que estão sendo executados.

#### - Aerossol de amplicon

A fonte mais importante e crucial da contaminação do produto de PCR é a geração dos aerossóis de amplicons de PCR, que é associada com a análise de pós PCR. Métodos para eliminar este aerossol vão desde um projeto físico que separe os laboratórios ao uso de pipetas

e ponteiros específicos que evitem a contaminação. A escolha do método é frequentemente dependente da frequência de amplificação de um determinado amplicon e das quantidades e concentrações dos amplicons criados pela PCR.

#### - Contaminação por amostras primárias

Além da contaminação de pós PCR, o próprio alvo (DNA ou RNA a ser pesquisado na amostra) pode ser uma fonte da contaminação. Por exemplo, as moléculas de DNA são tipicamente mais incômodas como contaminadoras porque são mais estáveis do que as moléculas de RNA.

A detecção de agentes infecciosos exige tipicamente os maiores esforços para evitar contaminação, visto que a detecção errônea de uma molécula de RNA/DNA viral causada por contaminação é definitivamente problemática.

#### - Sistemas de PCR em Tempo Real

Os sistemas de PCR em Tempo Real fornecem a medida direta da acumulação do amplicon durante a reação. Estes sistemas oferecem uma aproximação alternativa aos métodos tradicionais da análise de pós PCR. De uma perspectiva do controle de contaminação, a aquisição de dados durante a reação de amplificação (e não após) elimina a necessidade de manusear a amostra. Assim, quando estes PCRs são terminados, a detecção e a análise estão completas, os tubos da reação permanecem selados, e não há nenhum escape de amplicon. Ainda assim, o manuseio das máquinas de Real Time são uma potencial fonte de contaminação em luvas e aventais.

#### COMO PREVENIR A CONTAMINAÇÃO NUM LABORATÓRIO DE PCR

O laboratório de PCR é envolvido tipicamente com atividades que incluem: preparação da amostra, preparação da reação de PCR, execução da PCR, e a análise de pós PCR. Estas atividades

estão resumidas na Figura 1. Quando arranjadas nesta forma linear, estas atividades podem ser agrupadas em dois grupos principais: as atividades de pré PCR (preparação da amostra e preparação da PCR) e as atividades de pós PCR (execução e análise de PCR). O uso da PCR para finalidades de diagnóstico requer que algumas limitações adicionais sejam observadas para que a reação tenha resultados válidos. Quando a susceptibilidade da PCR à contaminação se tornou conhecida, Kwok e Higuchi (1989) apresentaram algumas recomendações adicionais para laboratórios que usam a PCR. Observar estas recomendações é essencial para que um laboratório de PCR seja operado com sucesso em longo prazo. Elas fazem parte de uma série de protocolos focalizados em manter um laboratório de PCR em uma condição livre de contaminação.



Para a contaminação por amplicons de PCR, o programa de controle da contaminação é baseado na remoção dos amplicons. Quando a PCR é usada em laboratórios de diagnóstico, onde uma grande variedade de microorganismos estão sendo amplificados e manipulados, o controle de contaminação deve ser bastante exigente. De fato, no laboratório de diagnóstico existem mais oportunidades para a contaminação de PCR devido à análise extremamente repetida de determinados microorganismos e do fato que as reações de PCR podem estar extremamente próximas do limite de detecção dos exames. Este fato exige cuidado especial e requer uma abordagem muito mais rigorosa para controlar a contaminação. As partes essenciais deste programa de controle de contaminação incluem a separação espacial das atividades pré e pós PCR uso de equipamentos de proteção individual específicos para cada área (aventais, luvas, toucas, propés etc.), uso da luz (UV) ultravioleta, uso de reagentes aliquotados, uso de controles positivos e negativos além do uso de um ou mais métodos de controle de contaminação que utilizam reagentes químicos (hipoclorito, peróxido de hidrogênio, álcool). O problema maior da contaminação por amplicons é que ela não pode ser vista, sentida, ou detectada a olho nu antes que ela aconteça. O uso das proteções mencionadas acima, a conscientização da equipe do laboratório e a limpeza constante das áreas de trabalho asseguram uma abordagem vigilante e pró-ativa em relação à contaminação de PCR.

## Separação Física

Como ilustrado na Figura 1, a fonte principal de contaminação na área pré PCR são os amplicons gerados na área pós PCR. Separando a fonte dos amplicons (a área pós PCR) das atividades de pré PCR, o potencial para a contaminação é significativamente reduzido. Esta separação é ilustrada melhor na Figura 2. Os processos de extração de amostras e preparação de reagentes também devem ser feitos separadamente, afastados da área pós PCR. A preparação de reagentes deve ocorrer dentro de uma capela ou fluxo laminar, equipada preferivelmente com uma luz UV. As paredes da capela devem ser limpas com uma solução de hipoclorito 1% antes do preparo dos reagentes. Os materiais que contêm amplicons de PCR não podem em hipótese alguma ser acumulados em áreas que sejam freqüentadas por pessoal envolvido na extração de amostras. E mais importante, a pessoa que manipula amplicons não deve jamais voltar à área de extração de amostras.

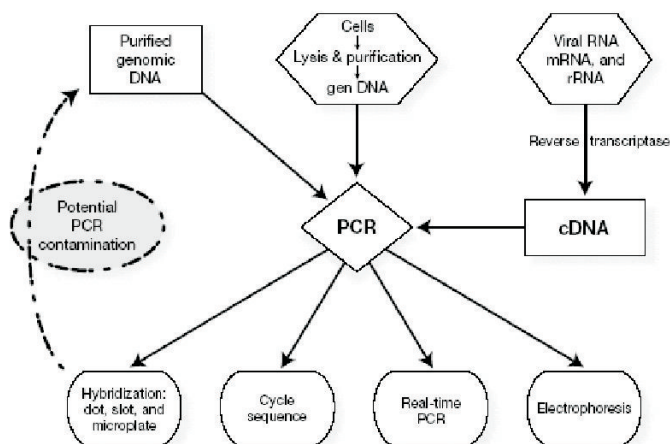


Figura 1: Esquema de processamento de amostras e análise de um laboratório

## Como arrumar o espaço no laboratório

Como mencionado acima, o arranjo ideal do laboratório de PCR deve ter as áreas pré e pós PCR situadas em áreas fisicamente separadas (veja Fig. 2), cada uma com recursos dedicados. Ambas as áreas devem possuir fontes de água destilada separadas, bem como centrífugas, freezers, refrigeradores exclusivos, além de separar também o armazenamento dos materiais descartáveis para uso. Mesmo os telefones, os computadores, e outras comunicações eletrônicas devem também ser dedicados.

No laboratório de diagnóstico, o menu de atividades é focalizado na extração e no processamento da amostra. Há uma demanda muito grande para detectar e quantificar quantidades extremamente baixas de DNA/RNA em amostras biológicas, e isso exige uma necessidade muito maior de impedir a contaminação do amplicon. Nestes casos as áreas separadas oferecem os melhores resultados contra contaminação. As reações em Tempo Real são mais seguras, pois não há necessidade de abrir os recipientes de PCR e o material é descartado selado. Entretanto, pode haver situações onde as placas individuais necessitam ser analisadas independentemente da reação em Tempo Real, fazendo com que estes recipientes sejam abertos. Isto propicia a contaminação por amplicons e deve sempre acontecer na área pós PCR.

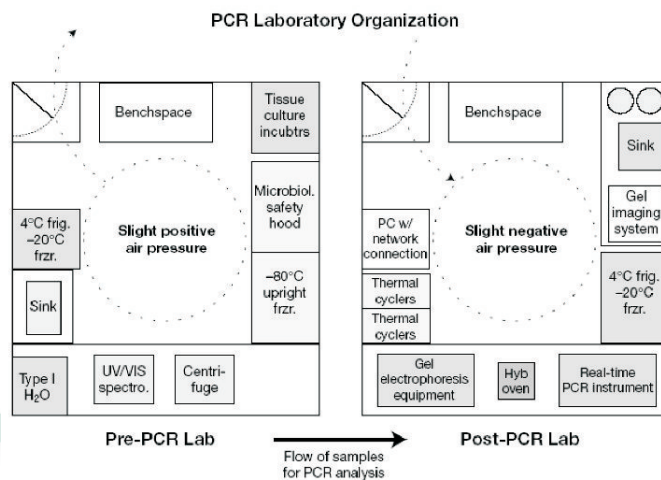


Figura 2: Organização de um laboratório de PCR em áreas pré e pós.