

JÚLIO CÉSAR GARCIA

**DIAGNÓSTICO FITOSSANITÁRIO POR PCR EM TEMPO-REAL:
REQUISITOS BÁSICOS PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Vegetal, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

G216d
2013
Garcia, Júlio César, 1966-
Diagnóstico fitossanitário por PCR em tempo-real :
requisitos básicos para validação de métodos / Júlio César
Garcia. – Viçosa, MG, 2013.
ix, 104 f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Robert Weingart Barreto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Fitopatologia - Diagnóstico. 2. Pragas agrícolas -
Controle. 3. Reação em cadeia de polimerase. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Entomologia. Programa de
Pós-Graduação em Mestrado Profissional em Defesa Sanitária
Vegetal. II. Título.

CDD 22 ed. 632

JÚLIO CÉSAR GARCIA

**DIAGNÓSTICO FITOSSANITÁRIO POR PCR EM TEMPO-REAL:
REQUISITOS BÁSICOS PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação do Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 16 de dezembro de 2013

Luiz Artur Costa do Valle
(Co-orientador)

José Maurício Pereira

Robert Weingart Barreto
(Orientador)

*Aos meus pais Sylvio e Helenita e à minha
irmã Janaína pela dedicação, amor e apoio.*

*À minha esposa Valéria e à minha
filha Juliana pelo amor, carinho e
compreensão ao longo de nossa jornada.*

AGRADECIMENTOS

Ao Grande Arquiteto do Universo por ter me guiado e protegido ao longo dessa caminhada.

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento por patrocinar e permitir a minha participação no Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Vegetal.

À Universidade Federal de Viçosa por ter me aceitado como aluno em um de seus programas de pós-graduação.

Ao Prof. Robert Weingart Barreto pela paciência e orientação no Mestrado.

Ao Dr. José Maurício Pereira pelo apoio e compreensão na reta final do Mestrado.

Ao Dr. Luiz Artur Costa do Valle pela participação na banca de defesa.

Ao amigo e irmão Nilson César Castanheira Guimarães pelas contribuições e incentivo desde o início desse trabalho.

Aos colegas do LANAGRO-MG pelo incentivo e apoio ao longo dessa etapa.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
é apenas uma gota d’água no mar.*

*Mas o mar não seria menor se lhe faltasse
uma gota?”*

(Madre Teresa de Calcutá)

SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	IX
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	7
CAPÍTULO 1	9
MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE FITOPATÓGENOS E SUAS IMPLICAÇÕES NA QUALIDADE DE REAÇÕES DE PCR EM TEMPO-REAL.....	9
1.0 - INTRODUÇÃO	9
2.0 - EXTRAÇÃO DE DNA DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS	14
3.0 - EXTRAÇÃO DE DNA DE FITOPLASMAS E DE FITOBACTÉRIAS.....	17
4.0 - EXTRAÇÃO DE RNA E DNA DE FITOVÍRUS	19
5.0 - REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO 2	29
PCR EM TEMPO-REAL PARA DETECÇÃO DE FITOPATÓGENOS	29
E A HARMONIZAÇÃO DAS INFORMAÇÕES DAS PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS	29
1.0 - INTRODUÇÃO	29
2.0 - PCR EM TEMPO-REAL PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS	36
3.0 - PCR EM TEMPO-REAL PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FITOPLASMAS E DE FITOBACTÉRIAS.....	37
4.0 - PCR EM TEMPO-REAL PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FITOVÍRUS E DE VIRÓIDES.....	39
5.0 – PADRONIZAÇÃO DAS INFORMAÇÕES DAS PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS	42
6.0 - REFERÊNCIAS:.....	47
CAPÍTULO 3	54
REGULAÇÃO DA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO BASEADOS EM PCR EM TEMPO-REAL NO BRASIL E NO MUNDO.....	54
1.0 - INTRODUÇÃO	54
2.0 - REGULAÇÃO DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE PCR NO BRASIL	58

3.0 - REGULAÇÃO DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS NO MUNDO.....	60
3.1 - REGULAÇÃO DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO NOS ESTADOS UNIDOS	64
3.2 - REGULAÇÃO DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO NA AUSTRÁLIA E NOVA ZELÂNDIA	66
3.3 - REGULAÇÃO DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO NA UNIÃO EUROPÉIA	73
4.0 - REFERÊNCIAS	76
CAPÍTULO 4	80
PROPOSTA DE REQUISITOS BÁSICOS PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO FITOSSANITÁRIO POR PCR EM TEMPO-REAL A SEREM UTILIZADOS POR LABORATÓRIOS OFICIAIS E CREDENCIADOS DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA	80
1.0 - INTRODUÇÃO	80
2.0 - PROPOSTA DE REQUISITOS BÁSICOS PARA VALIDAÇÃO MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO FITOSSANITÁRIO POR PCR EM TEMPO-REAL	82
3.0 - REFERÊNCIAS	87
CONCLUSÕES GERAIS	89
ANEXOS	91
<i>ANEXO 1: Termos e definições utilizados na validação de métodos.....</i>	<i>91</i>
<i>ANEXO 2: Exemplo de verificação de desempenho de método normalizado de diagnóstico fitossanitário por PCR em tempo-real em conformidade com a proposta formulada na dissertação.</i>	<i>98</i>
<i>ANEXO 3: Links para acesso à legislação e às normas do MAPA citadas no texto.</i>	<i>103</i>

RESUMO

GARCIA, Júlio César, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2013. **Diagnóstico fitossanitário por PCR em tempo-real: requisitos básicos para validação de métodos.** Orientador: Robert Weingart Barreto. Coorientador: José Maurício Pereira.

O setor agropecuário brasileiro vem exigindo políticas e serviços públicos cada vez mais ágeis e eficazes a fim de aumentar sua competitividade em uma economia globalizada. Diante desse desafio, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA vem buscando inovar e aprimorar continuamente a qualidade dos seus processos e serviços a fim de atender satisfatoriamente as crescentes demandas do setor produtivo e da sociedade brasileira. Dentro da área laboratorial do MAPA, o aprimoramento dos processos e serviços prestados foi acelerado com a exigência da implantação de sistemas de gestão da qualidade baseados norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 “Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração” em seus laboratórios oficiais e credenciados, bem como a acreditação dos mesmos junto ao INMETRO. Nesse processo, a validação de métodos de ensaio é um requisito técnico importante uma vez que pode afetar diretamente a qualidade dos resultados. A falta de diretrizes que indiquem os principais fatores a serem verificados nas validações de métodos de diagnóstico fitossanitário por PCR em tempo-real (qPCR) juntamente com a falta de padronização das publicações científicas que tratam do tema vêm dificultando a validação adequada desse tipo de método. A qPCR é uma técnica de biologia molecular que vem sendo largamente utilizada na detecção e identificação de diversos fitopatógenos por sua rapidez, seletividade, sensibilidade, ampla faixa dinâmica de quantificação e possibilidade de automação das análises. No entanto, alguns fatores podem impactar negativamente a qualidade dos ensaios, tais como: a qualidade do DNA extraído, a presença de inibidores de PCR nas amostras, a qualidade dos iniciadores e sondas utilizados, dentre outros. Por esse motivo, alguns países e blocos econômicos têm regulado a implantação da norma ISO/IEC 17025 e a validação de métodos de detecção e identificação de fitopatógenos por técnicas moleculares. Dentre os principais parâmetros a serem observados nas validações de

métodos de PCR destacam-se: sensibilidade, seletividade, especificidade, repetibilidade e reprodutibilidade.

ABSTRACT

GARCIA, Júlio César, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2013. **Real-time PCR plant health diagnostics: basic requirements for method validation.** Advisor: Robert Weingart Barreto. Co-Advisor: José Maurício Pereira.

The Brazilian agribusiness sector has been demanding more agile and efficient policies and public services in order to increase its competitiveness in a globalized economy. Confronted by this challenge, the Ministry of Agriculture, Livestock and Foodsupply - MAPA has been trying to innovate and continually improve the quality of its processes and services in order to respond to the growing demands of the productive sector and of the Brazilian society. In the laboratory field, MAPA has been demanding that its official and approved laboratories implement quality management systems in conformity with the ISO/IEC 17025 standard "General requirements for the competence of testing and calibration laboratories" and be accredited by the Brazilian National Institute of Metrology, Quality and Technology (INMETRO). In this process, method validation is a key technical requirement since it can directly affect the quality of the analytical results. The lack of guidelines which indicate the main parameters to be checked in the validation of plant diagnostic methods by real-time PCR (qPCR) and the lack of consensus in the scientific literature have been compromising proper validations of this kind of method. The qPCR is a molecular biology technique which has been extensively used in the detection and identification of plant pathogens due to its rapidity, selectivity, sensibility, broad dynamic range and automation capabilities. However, some factors may impact the quality of qPCR results, such as: DNA quality, PCR inhibitors, primer and probe quality, etc. Thus, some countries and trade blocs have been regulating the implementation of the ISO/IEC 17025 standard and the validation of molecular diagnostic methods for the detection and identification of plant pathogens. The main parameters to be checked in the validation of PCR methods are: sensibility, selectivity, specificity, repeatability and reproducibility.

INTRODUÇÃO GERAL

Políticas e serviços públicos mais ágeis e eficazes são exigências do setor agropecuário brasileiro a fim de aumentar sua competitividade em uma economia globalizada. Para atender adequadamente a essa demanda, foram promovidas alterações na estrutura organizacional do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio da publicação de dois decretos federais (BRASIL, 2005a; BRASIL, 2010) e da elaboração de um planejamento estratégico para os anos futuros (BRASIL, 2006a; BRASIL, 2009). Nesse processo, o MAPA definiu como sua nova missão promover o desenvolvimento sustentável e a competitividade do agronegócio em benefício da sociedade brasileira e como sua visão de futuro ser reconhecido pela qualidade e agilidade na implementação de políticas e na prestação de serviços para o desenvolvimento sustentável do agronegócio (BRASIL, 2009). Em decorrência disso e para que esses objetivos realmente possam ser atingidos, o MAPA precisa inovar e melhorar continuamente a qualidade dos seus processos e serviços a fim de atender satisfatoriamente as crescentes demandas do setor produtivo e da sociedade brasileira.

Com esse foco, o MAPA passou a exigir que seus laboratórios oficiais, credenciados e reconhecidos implantassem sistemas de gestão da qualidade (SGQs) como forma de aumentar a confiabilidade das análises realizadas para fins de fiscalização. Esse processo iniciou-se com a publicação da Instrução Normativa nº24 (BRASIL, 2001), que, dentre outras exigências: i) condicionou o credenciamento ou reconhecimento dos laboratórios à aprovação dos seus respectivos SGQs pelo MAPA, após auditorias *in loco*; ii) exigiu que a área física, instalações e equipamentos dos laboratórios fossem compatíveis com as análises realizadas; e iii) que os métodos de análise a serem utilizados nas análises fiscais fossem devidamente reconhecidos ou validados. Em 2003, alguns artigos dessa Instrução Normativa foram alterados pela publicação da Instrução Normativa nº 51 (BRASIL, 2003). A partir de 2007, a Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial (CGAL) do MAPA adotou como um de seus objetivos estratégicos, aumentar e garantir a confiabilidade dos resultados de análise emitidos por seus laboratórios oficiais e credenciados por meio da exigência da implantação de sistemas de gestão da qualidade baseados na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 “Requisitos

gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração” (ABNT, 2005), através da publicação da Instrução Normativa nº1 (BRASIL, 2007). A partir de 2011, a CGAL começou a exigir a acreditação (reconhecimento formal de competência técnica) pelo Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO) do escopo de interesse de laboratórios oficiais e credenciados do MAPA, através da publicação das Instruções Normativas nº 34 (BRASIL, 2011a) e nº 40 (BRASIL, 2011b). Em 2013, essas instruções normativas foram revogadas pela Instrução Normativa nº 57 (BRASIL, 2013), que, dentre outras mudanças, i) acrescentou novos termos à lista de definições da Instrução Normativa nº 1 (BRASIL, 2007), tais como: avaliador, especialista, organismo de normalização, dentre outros; ii) detalhou os procedimentos para a realização de extensão de escopo, alteração de responsabilidade técnica, alteração do nome empresarial e da área física dos laboratórios; iii) especificou as atribuições do responsável técnico do laboratório, atribuindo ao mesmo a responsabilidade por todas as etapas da análise, resultados emitidos e assinatura dos relatórios de ensaio; iv) estabeleceu o prazo máximo de 30 dias para comprovar a implantação de todas as não-conformidades evidenciadas nas auditorias do MAPA.

Convém ressaltar que a publicação de todas essas instruções normativas estimulou laboratórios oficiais e credenciados a investir mais na implantação ou no aperfeiçoamento de seus sistemas de gestão da qualidade a fim de evitar a perda de seu credenciamento junto ao MAPA.

A norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 apresenta requisitos gerenciais e técnicos que servem de referência para laboratórios interessados em garantir a qualidade e a confiabilidade de seus resultados analíticos. Trata-se de uma norma genérica e voluntária que pode ser aplicada a qualquer tipo de laboratório de ensaio ou calibração. No caso específico dessa dissertação, os laboratórios de interesse do MAPA são o que realizam análises de diagnóstico fitossanitário.

Uma das principais atividades do MAPA no campo da defesa sanitária vegetal é a vigilância agropecuária internacional que tem por objetivo impedir a entrada e a disseminação de pragas que constituam ou possam constituir ameaças à agropecuária nacional, garantindo a sanidade dos produtos e a qualidade dos insumos agropecuários importados e exportados. Dentro do MAPA, a regulamentação da vigilância sanitária vegetal fica a cargo do Departamento de

Sanidade Vegetal (DSV), que também executa análises de risco de pragas, além de definir regras para o trânsito e a quarentena vegetal (BRASIL, 2010a). As exigências fitossanitárias definidas pelo DSV são normas e medidas que têm por objetivo proteger a cadeia produtiva, evitar a introdução e a disseminação de pragas e doenças no território nacional (BRASIL, 2005b). O MAPA também desenvolve programas para a prevenção e controle fitossanitários com o objetivo de erradicar, controlar e evitar a disseminação de pragas com distribuição restrita que podem causar danos irreparáveis às cadeias produtivas do agronegócio brasileiro. Como exemplos desse tipo de programa destacam-se o “Plano de Contingência da Monília ou Monilíase”, causada pelo fungo *Moniliophthora roreri*, que é uma das mais devastadoras doenças do cacaueteiro; o “Programa Nacional de Erradicação da *Cydia pomonella*”, que é uma das pragas mais importantes da macieira e o “Programa de Controle da Sigatoka-Negra”, causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis*, que é a doença mais importante da bananeira e dos plátanos na maioria das regiões produtoras de banana do mundo. A programação, promoção, orientação e controle da execução desses planos e programas no nível dos estados fica a cargo dos Serviços de Sanidade Vegetal (SSVs) das Superintendências Federais de Agricultura (SFAs) do MAPA (BRASIL, 2010b).

A operacionalização da vigilância agropecuária, por sua vez, é de responsabilidade do Sistema de Vigilância Agropecuária Internacional - VIGIAGRO (BRASIL, 2006b), vinculado à Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), que atua na inspeção e na fiscalização do trânsito internacional de vegetais, seus produtos e subprodutos. Esse sistema é executado pelas Superintendências Federais de Agricultura por meio dos Serviços de Gestão da Vigilância Agropecuária (VIGIAGRO/DT-UF), dos Serviços de Vigilância Agropecuária (SVA) e das Unidades de Vigilância Agropecuária (UVAGROs), localizadas nos portos, aeroportos, postos de fronteira e estações aduaneiras interiores (EADI).

Nesse contexto, a detecção e a identificação de pragas realizadas por laboratórios de diagnóstico fitossanitário representam importantes instrumentos de ação da vigilância agropecuária. A fiscalização do MAPA identifica possíveis ameaças e coleta amostras para envio a laboratórios oficiais ou credenciados para concluir o desembaraço aduaneiro, a liberação para consumo ou a comercialização dos produtos, conforme legislação específica (BRASIL, 2006b). Atualmente, a rede

de diagnóstico fitossanitário do MAPA é composta por 23 laboratórios, sendo 3 oficiais e 20 credenciados com diferentes escopos analíticos (MAPA, 2013).

Diante do grande risco de introdução de novas pragas provocado pelo aumento do comércio internacional, principalmente de produtos agrícolas, muitos laboratórios de diagnóstico fitossanitário de países desenvolvidos vêm buscando não só a implantação de sistemas robustos de gestão da qualidade baseados na norma ISO/IEC 17025, mas também a acreditação de seus métodos de diagnóstico (ALEXANDER *et al.*, 2008; THRANE; SCHEEL, 2005; THRANE, 2008). Essa recente busca por reconhecimento formal da qualidade pode ser explicada pela pressão exercida por clientes e órgãos reguladores (THRANE, 2008), bem como pelos impactos negativos que diagnósticos imprecisos podem ter na colocação de produtos agrícolas no comércio internacional, na defesa agropecuária e no meio ambiente. Por esse motivo, a realização de diagnósticos fitossanitários rápidos e precisos passou a ser uma ação fundamental na prevenção de epidemias, na rápida aplicação de estratégias de mitigação de pragas e nas ações de vigilância em escala local, regional e global (MILLER *et al.*, 2009).

A acreditação de métodos de detecção e identificação de pragas pode trazer diversos benefícios para laboratórios de diagnóstico fitossanitário. Segundo THRANE e SCHEEL (2005), os benefícios internos seriam a maior atenção na qualidade e satisfação de seus funcionários durante a execução de suas rotinas diárias em decorrência da padronização de diagnósticos e de processos, além do detalhamento de tarefas e de responsabilidades. Externamente, a acreditação garante uma maior credibilidade aos diagnósticos e pode representar uma vantagem competitiva para o laboratório na captação de novos clientes que valorizem a qualidade de resultados analíticos.

Um requisito técnico importante de sistemas de gestão da qualidade baseados na ISO/IEC 17025 é a validação de métodos, que nada mais é do que a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (ABNT, 2005). Consiste em evidenciar que o método validado atende ao propósito para o qual será utilizado (*fit-for-purpose*). No entanto, esse requisito constitui-se num dos maiores entraves à implantação da norma ISO/IEC 17025 em laboratórios de diagnóstico fitossanitário em virtude das diversas limitações existentes nesse tipo de análise, tais como: i) a

dificuldade de se obter controles positivos vivos de pragas quarentenárias A1 (ainda ausentes no país); ii) a carência de protocolos de validação adequados para a diagnose de fitopatógenos; iii) o número reduzido de ensaios de proficiência específicos para fitopatógenos; dentre outros.

Métodos moleculares para diagnóstico de fitopatógenos podem ser muito sensíveis, seletivos e capazes de detectar o DNA-alvo de um fitopatógeno em meio a diferentes tipos de DNA. Contudo, para que possam ser confiáveis a ponto de serem utilizados rotineiramente, esses métodos devem atender a critérios mínimos de desempenho e serem submetidos a um processo de validação adequado ao escopo do diagnóstico (EPPO, 2010). Em virtude disso, alguns critérios mínimos de desempenho vêm sendo propostos nesse tipo de validação, tais como: sensibilidade, especificidade, seletividade, repetibilidade e reprodutibilidade dos métodos avaliados (EPPO, 2010).

Dentre os métodos moleculares, a PCR tempo-real (qPCR) é uma técnica molecular que possibilita o monitoramento instantâneo e a quantificação da reação em cadeia da polimerase (PCR) por meio de compostos fluorescentes (fluoróforos). Apesar de serem ferramentas poderosas, métodos baseados em PCR tempo-real podem levar a resultados incorretos. Por exemplo, falsos resultados positivos podem ser causados por contaminações cruzadas de amostras, enquanto que falsos resultados negativos costumam ocorrer pela presença de inibidores de PCR ou pela ocorrência de condições subótimas da reação de amplificação de DNA. Em decorrência disso, o estabelecimento de critérios para validação de métodos de diagnóstico fitossanitário baseados na qPCR são fundamentais para se conhecer previamente as limitações dos métodos existentes, seu alcance e confiabilidade.

Esta dissertação tem por objetivo conduzir uma avaliação crítica dos processos de validação e adoção de metodologias para diagnose de fitopatógenos por PCR em tempo-real no Brasil e no mundo. Com base nessa experiência já existente, formular uma proposição de requisitos básicos para validação de métodos de diagnóstico fitossanitário por PCR em tempo-real a serem utilizados no Brasil por laboratórios oficiais e credenciados em ações de fiscalização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA.

O trabalho que se segue é apresentado em quatro capítulos que abordarão os seguintes temas: i) Métodos de extração de DNA de fitopatógenos e suas

implicações na qualidade de reações de PCR em tempo-real; ii) PCR em tempo-real para detecção de fitopatógenos e a harmonização das informações das publicações científicas; iii) Regulação da validação de métodos de diagnóstico baseados em PCR em tempo-real no Brasil e no mundo; e iv) Proposta de requisitos básicos para validação de métodos de diagnóstico fitossanitário por PCR em tempo-real a serem utilizados por laboratórios oficiais e credenciados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, B. J. R.; Flynn, A. R.; Gibbons, A. M.; Clover, G. R. G.; V. E. Herrera, V. E. New Zealand perspective on ISO 17025 accreditation of a plant diagnostic laboratory. **EPPO Bulletin**, v. 38, n. 2, p. 172-177, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **NBR ISO/IEC 17025**: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005.

BRASIL. Instrução Normativa nº24, de 07 de junho de 2001. Aprova as Normas Gerais de Credenciamento e Reconhecimento de Laboratórios da Área Animal e Vegetal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 jun. 2001. Seção 1, p. 10.

BRASIL. Instrução Normativa nº 51, de 27 de junho de 2003. Altera a redação de alguns artigos da Instrução Normativa nº 24, de 7 de junho de 2001. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 jun. 2003. Seção 1, p. 4.

BRASIL. Decreto nº 5.351, de 21 de janeiro de 2005. Aprova a estrutura regimental e o quadro demonstrativo dos cargos em comissão e das funções gratificadas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 jan. 2005a. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Instrução Normativa nº 9, de 17 de março de 2005. Atribui ao Departamento de Sanidade Vegetal (DSV) as responsabilidades e funções inerentes à Organização Nacional de Proteção Fitossanitária - ONPF do Brasil. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 21 mar. 2005b. Seção 1, p. 30.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano estratégico**. 1. ed. Brasília, DF, 2006a, 38 p.

BRASIL. Instrução Normativa nº 36, de 10 de novembro de 2006. Aprova o Manual de Procedimentos Operacionais da Vigilância Agropecuária Internacional. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 nov. 2006b. Seção 1, p. 3.

BRASIL. Instrução Normativa nº1, de 16 de janeiro de 2007. Estabelece critérios para o credenciamento, reconhecimento, extensão de escopo e monitoramento de laboratórios no MAPA de forma a integrarem a Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 17 jan. 2007. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano estratégico**. 2. ed. Brasília, DF, 2009, 52 p.

BRASIL. Decreto nº 7.127, de 4 de março de 2010a. Aprova a estrutura regimental e o quadro demonstrativo dos cargos em comissão e das funções gratificadas do

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 5 mar. 2010. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Portaria nº 428, de 9 de junho de 2010b. Aprova o Regimento Interno das Superintendências Federais de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14jun. 2010. Seção 1, p. 35.

BRASIL. Instrução Normativa nº 34, de 14 de julho de 2011a. Acrescenta ao Anexo da Instrução Normativa nº 1, de 16 de janeiro de 2007, o inciso XVI no art. 7º e os artigos 33, 34 e 35, as seguintes redações. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 15 jul. 2011. Seção 1, p. 2.

BRASIL. Instrução Normativa nº 40, de 30 de agosto de 2011b. Altera a redação do art. 36 ao Anexo da Instrução Normativa nº 1, de 16 de janeiro de 2007. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 31 ago. 2011. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Instrução Normativa nº 57, de 11 de dezembro de 2013. Estabelece os critérios e requisitos para o credenciamento e monitoramento de laboratórios pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 dez. 2013. Seção 1, p. 5.

EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION - EPPO. Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant test activity. **EPPO Bulletin**, v. 40, p. 5-22, 2010.

MAPA. Laboratórios de diagnóstico fitossanitário. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/laboratorios/laboratorios-por-area-de-analise/diagnostico-fitossanitario>>. Acesso em: 29 set. 2013.

MILLER, Sally A.; BEED, Fen D.; HARMON, Carrie Lapaire. Plant disease diagnostic capabilities and networks. **Annual Review of Phytopathology**, v. 47, p. 15-38, 2009.

THRANE, C.; SCHEEL, C. Organization of quality assurance in diagnostics at the Danish NPPO. **EPPO Bulletin**, v. 35, n. 1, p. 113-115, 2005.

THRANE, Charlotte. Quality assurance in plant health diagnostics—the experience of the Danish Plant Directorate. **European Journal of Plant Pathology**, v. 121, n. 3, p. 339-346, 2008.

CAPÍTULO 1

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE FITOPATÓGENOS E SUAS IMPLICAÇÕES NA QUALIDADE DE REAÇÕES DE PCR EM TEMPO-REAL

1.0 - INTRODUÇÃO

A PCR em tempo-real (qPCR é) uma técnica de biologia molecular que tem sido largamente utilizada na detecção e quantificação de diversos fitopatógenos (MCCARTNEY *et al.*, 2003, OKUBARA; SCHROEDER; PAULITZ, 2005; SCHENA *et al.*, 2013; VIEIRA *et al.*, 2011). A qPCR vem sendo considerada uma técnica mais adequada do que a PCR convencional em diagnósticos laboratoriais moleculares por possuir caráter quantitativo, apresentar maior sensibilidade e ser realizada em ensaios com menores riscos de contaminação cruzada (sem a etapa de pós-PCR) (CANKAR *et al.*, 2006). O uso da qPCR também permitiu o aumento do grau de automação e reduziu o tempo de análise, introduzindo, no entanto, novos tipos de inibidores da PCR, especialmente, aqueles que afetam o sinal da fluorescência emitido por sondas marcadas (HEDMAN; RÅDSTRÖM, 2013). Em decorrência disso, laboratórios de diagnóstico que utilizam a qPCR não devem desprezar a importância da qualidade e da pureza do DNA extraído e não devem limitar a diagnose exclusivamente à aplicação da qPCR como método de exame das amostras.

O princípio básico da extração consiste na liberação das moléculas de DNA da matriz analisada e na simultânea ou subsequente purificação dos inibidores da PCR (ISO, 2005b). Na maioria das vezes, a escolha do melhor método de extração configura-se em um equilíbrio entre o custo do processo, a quantidade de DNA e a remoção de compostos inibidores da PCR (CANKAR *et al.*, 2006). Um método ideal de extração deve permitir a obtenção de DNA com boa qualidade, baixas concentrações de inibidores da PCR e ser ao mesmo tempo barato, rápido e simples para permitir seu uso em larga escala por diferentes operadores (SCHENA *et al.*, 2013). Ao afetarem a eficiência da PCR, esses inibidores pioram o limite de detecção e a precisão da quantificação de DNA (HEDMAN; RÅDSTRÖM, 2013;

WILSON, 1997). Em alguns tipos de amostras vegetais, por exemplo, a coprecipitação do DNA extraído com a mucilagem presente na matriz pode inibir a ação da enzima *Taq*® polimerase (JOSE; USHA, 2000; GHOSH *et al.*, 2009).

A inibição da PCR tem sido a causa mais comum de problemas verificados nessa reação, quando há material genético suficiente para a ocorrência da amplificação de DNA (ALAEDDINI, 2012). Esse tipo de inibição pode gerar falsos resultados negativos uma vez que nem todos os analistas costumam utilizar controles internos (materiais de referência, controles positivos, controles negativos, etc.) para avaliar a qualidade das reações de amplificação (WILSON, 1997). Além disso, a alta sensibilidade da PCR também pode favorecer a ocorrência de falsos resultados positivos, mesmo em níveis baixos de contaminação cruzada (RYS; PERSING, 1993; VANEECHOUTTE; VAN ELDERE, 1997).

O método mais comumente utilizado na extração de DNA de folhas, grãos, sementes, rações e alimentos processados é o método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio). Contudo, além de ser demasiadamente longo, o protocolo original desse método utiliza reagentes tóxicos e carcinogênicos tais como o fenol e o clorofórmio. A solução-tampão básica do método original é composta pela mistura de soluções de CTAB 2%; de NaCl 1,4 M; de EDTA 20 mM; de tris-HCl 100 mM e pH final 8,0 (DEMEKE; JENKINS, 2010). Muitas adaptações do método CTAB já foram propostas considerando os diferentes tipos de matrizes de onde o DNA será extraído (Tabela 1). Geralmente, essas adaptações consistem na alteração, adição ou exclusão de algum reagente em virtude do tipo de análise de DNA que será realizada posteriormente. Em reações de PCR tempo-real, por exemplo, as enzimas RNase A e RNase T1 podem ser acrescentadas para remover RNAs presentes nas amostras (DEMEKE; JENKINS, 2010).

Tabela 1: Variações de métodos de extração de DNA pelo método CTAB (DEMEKE; JENKINS, 2010)

Método CTAB	Principais etapas executadas no processo	Referências
Método CTAB (original)	CTAB de extração + clorofórmio / álcool isoamílico + lavagem com solução 2-propanol / etanol 70% + resuspensão do DNA com solução-tampão TE	DOYLE & DOYLE, 1987

Tabela 1 (continuação)

CTAB + CsCl	CTAB de extração / mercaptoetanol + clorofórmio / álcool isoamílico + adicionar ao sobrenadante 1/10 volume de CTAB 10% / NaCl 0,7 M + clorofórmio / álcool isoamílico + CTAB 1% / Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) / EDTA 10 mM + dissolução dos ácidos nucleicos em solução de CsCl + diálise para remover o CsCl, particionamento para remover o brometo de etídio ou uso de etanol para precipitar o DNA	MURRAY & THOMPSON, 1980
CTAB + NaCl	CTAB de extração + clorofórmio + CTAB de precipitação + resuspensão do DNA em solução de NaCl 1,2 M + lavagem com clorofórmio + 2-propanol / etanol 70% + ressuspensão do DNA em água deionizada estéril. (método utilizado em PCRs qualitativas de soja e milho geneticamente modificados)	LIPP <i>et al.</i> , 1999
CTAB + PTB (polypyrimidine tract binding protein)	Solução-tampão de CTAB de extração / mercaptoetanol / PTB + solução de etanol / álcool isoamílico + precipitação com 2-propanol + dissolver os pellets de DNA em tampão de homogeneização. Repetir o processo pelo menos uma vez. Método utilizado em amostras de alimentos (farinha de soja, pão de milho, biscoitos) e figos (secos e processados)	BERNARDO <i>et al.</i> , 2005 BERNARDO <i>et al.</i> , 2007
CTAB + Genomic Tip 20	CTAB de extração / RNase A / proteinase K + clorofórmio (2x) + CTAB de precipitação + resuspensão do DNA em solução de NaCl 1,2 M + clorofórmio + etanol absoluto para precipitação + lavagem com etanol 70% + ressuspensão do DNA em água ultrapura + filtragem na coluna "Genomic Tip 20" para precipitação posterior. Método utilizado em farinha de milho.	CORBISIER <i>et al.</i> , 2007
CTAB + SDS (dodecil sulfato de sódio)	CTAB de extração / RNase A / SDS + acetato de potássio + lavagem com 2-propanol para precipitação / etanol 70% + ressuspensão do DNA em tampão TE / H ₂ O + solução de <i>clean-up</i> (com CTAB) + dissolução do DNA em H ₂ O + uso de acetato de sódio e etanol para precipitar o DNA + lavagem com etanol 70% + dissolução dos pellets de DNA em tampão TE. Não se utiliza fenol ou clorofórmio. (Não foi testado na detecção de amostras geneticamente modificadas).	NIU <i>et al.</i> , 2008
CTAB (ISO)	CTAB de extração / solução α -amilase / RNase A / proteinase K + clorofórmio + lavagem com 2-propanol para precipitação / etanol 70% + ressuspensão do DNA em H ₂ O ou tampão TE. (Método utilizado na extração de DNA de cereais e alimentos).	ISO 21571:2005
CTAB / clorofórmio + NaCl / clorofórmio	CTAB de extração / RNase A / proteinase K + clorofórmio (2x) + CTAB de precipitação + ressuspensão do DNA em 0,5x de tampão TE + tratamento com RNase A + adição de igual volume de solução de NaCl + clorofórmio + etanol absoluto para precipitação + lavagem com etanol 70% + dissolução do DNA em 0,5x de tampão TE. (Método utilizado em farinha de milho).	SHOKERE; HOLDEN; RONALD JENKINS, 2009
CTAB + kit de purificação Zymo ou CTAB + kit de purificação Qtip 100	CTAB de extração / proteinase K / mercaptoetanol + fenol / clorofórmio / álcool isoamílico (1x) + clorofórmio / álcool isoamílico (2x) + lavagem com 2-propanol / etanol 70% + tratamento com RNase A e RNase T1 + ressuspensão do DNA em tampão TE + uso de kits de purificação (Zymo ou Qtip 100). (Método utilizado na extração de DNA de farinha de soja).	DEMEKE; RATNAYAKA; PHAN, 2009
CTAB + resina Wizard® + coluna microSpin	CTAB de extração / proteinase K / RNase A + clorofórmio + CTAB de precipitação / solução NaCl 1,2 M + clorofórmio + precipitação com 2-propanol + purificação com o sistema de clean-up de DNA Wizard® + purificação com colunas S-300 HR microSpin. (Método utilizado em sementes de soja e milho moidos).	JRC, 2009
CTAB + PEG (polietilenoglicol)	CTAB de extração / mercaptoetanol / proteinase K + fenol / clorofórmio / álcool isoamílico (3x) + precipitação com 2-propanol + tratamento com tampão TE / RNase + clorofórmio / álcool isoamílico (3x) + precipitação com tampão TE / PEG + ressuspensão em tampão TE ou água. (Método utilizado em sementes de canola).	MAZZARA <i>et al.</i> , 2007
CTAB + Ultra e microfiltração	CTAB de extração com polivinilpirrolidona (PVP) + clorofórmio / álcool isoamílico (1x) + tratamento do sobrenadante com RNase A + clorofórmio / álcool isoamílico (1x) + ressuspensão em tampão TE + ultra e micro filtrações (Nanosep MF 0.2 + Pall Nanosep 30 K). (Método utilizado em sementes de milho).	JRC, 2007

Fonte:DEMEKE; JENKINS, 2010.

Segundo HEDMAN e RÅDSTRÖM (2013), os inibidores da qPCR podem ser categorizados de acordo com o seus mecanismos de inibição em três grupos distintos, sendo eles: i) a inibição da DNA polimerase por degradação, desnaturação ou indiretamente pela formação de quelatos com íons Mg^{2+} (cofator da polimerase); ii) a inibição de ácidos nucleicos ou nucleotídeos por alteração da temperatura de fusão (“melting”) dos primers (iniciadores) ou da conformação da molécula de DNA; e iii) a inibição da fluorescência pela formação de precipitados que bloqueiam o sinal emitido pelas sondas marcadas ou interajam diretamente com os fluoróforos.

Além de interferirem na lise celular durante a extração do DNA, os inibidores também podem degradar ou capturar o DNA extraído (WILSON, 1997). Um resumo com os principais inibidores e seus respectivos mecanismos de inibição é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Principais moléculas e íons inibidores da PCR (adaptada de HEDMAN; RÅDSTRÖM, 2013)

Tipo de inibidor	Molécula ou íon	Fonte	Mecanismo	Referência
Inibidores da polimerase	NaOH	Extração de DNA	Degradação do DNA e desnaturação da polimerase pelo pH	ROSSEN <i>et al.</i> , 1992
	NH ₄ Ac	Extração de DNA	Alteração da composição iônica	ROSSEN <i>et al.</i> , 1992
	LiCl	Meio de cultura	Alteração da composição iônica	ROSSEN <i>et al.</i> , 1992
	MgCl ₂	Meio de cultura	Alteração do nível de Mg^{2+} na PCR	ROSSEN <i>et al.</i> , 1992
	Ácido Fúlvico	Solo	Ligação com a polimerase	KREADER, 1996
	Ácido Tânico	Solo	Ligação com a polimerase	KREADER, 1996
	Fenol	Solo e purificação de DNA	Desnaturação da polimerase ou ligação com a polimerase via pontes de hidrogênio	KATCHER; SCHWARTZ, 1994
Inibidores de ácidos nucleicos	Celulose e nitrocelulose	Filtros de amostragem	Ligação com o DNA	BEJ <i>et al.</i> , 1991
	Etanol	Extração de DNA	Precipitação do DNA	ROSSEN <i>et al.</i> , 1992
	Brometo de etídio	Extração de DNA	Ligação com o DNA	ROSSEN <i>et al.</i> , 1992
	Isopropanol	Extração de DNA	Precipitação do DNA	ROSSEN <i>et al.</i> , 1992
	Poli(etilenoglicol) (PEG)	Extração de DNA	Precipitação do DNA	ROSSEN <i>et al.</i> , 1992
	SYBR Green I	Corante de detecção de DNA	Alta afinidade para ligação com DNAs em dupla fita	GUDNASON <i>et al.</i> , 2007
	SYTOX Orange	Corante de detecção de DNA	Alta afinidade para ligação com DNAs em dupla fita	GUDNASON <i>et al.</i> , 2007

Tabela 2: (continuação)

	TO-PRO-3	Corante de detecção de DNA	Alta afinidade para ligação com DNAs em dupla fita	GUDNASON <i>et al.</i> , 2007
				TSAI; OLSON, 1992a
				TSAI; OLSON, 1992b
Inibidores de Fluorescência	Ácidos húmicos	Solo	Redução da fluorescência, interação direta com a polimerase e anelamento com primers	KREADER, 1996 ZIPPER <i>et al.</i> , 2003 SUTLOVIC <i>et al.</i> , 2008

Fonte: HEDMAN, Johannes; RÅDSTRÖM, Peter. Overcoming inhibition in real-time diagnostic PCR. In: **PCR Detection of Microbial Pathogens**. New York, Humana Press, 2013. p. 17-48.

As várias combinações de DNA polimerases e soluções-tampão utilizadas nas reações de PCR são afetadas de formas diferentes pelas diversas moléculas inibidoras da PCR (ABU AL-SOUD; RÅDSTRÖM, 1998; BAAR *et al.*, 2011; WOLFFS *et al.*, 2004). Amostras com baixas concentrações do DNA-alvo, por exemplo, são mais severamente inibidas do que aquelas com maiores concentrações (ROUSSEL *et al.*, 2005). Diante desses fatos, é altamente recomendável que laboratórios oficiais e credenciados de diagnóstico sigam os critérios pré-estabelecidos nas normas oficiais existentes adotadas para o país ou protocolos internacionais para avaliação da qualidade do DNA extraído antes da realização das reações de qPCR.

O primeiro critério a ser considerado nesse tipo de avaliação é verificar se a quantidade total de DNA será suficiente para garantir a amplificação da sequência-alvo (HUBNER *et al.*, 2001; KAY; VAN DEN EEDE, 2001). O segundo é avaliar se os potenciais inibidores da PCR presentes nas matrizes das amostras (polissacarídeos, proteínas, compostos fenólicos e outros metabólitos secundários vegetais) também foram coextraídos com o DNA de interesse (HOLDEN *et al.*, 2003; PEIST *et al.*, 2001; ROSSEN *et al.*, 1992; WILSON, 1997). Essa avaliação pode ser feita por meio da realização de testes em que os resultados de reações de qPCR realizadas com extratos puros do DNA-alvo são comparados com resultados de amostras contendo o DNA-alvo junto com a matriz em que ele está contido. Além disso, alguns reagentes das soluções-tampão utilizadas na extração de DNA também podem inibir a reação da PCR (ROSSEN *et al.*, 1992). O efeito dessas inibições pode ser tanto o bloqueio completo da reação de amplificação do DNA, quanto o aumento do valor do ciclo-limite de comparação da qPCR (Ct ou Cq) ou até mesmo a redução da eficiência da amplificação (KUBISTA *et al.*, 2006).

Convém ressaltar que, além da pureza, a integridade estrutural do DNA extraído também pode afetar a qualidade da reação. O termo UFP (unidades formadoras de PCR) foi cunhado justamente para diferenciar o DNA-alvo intacto daquele danificado ou não-amplificável (CANKAR, 2006; HOLST-JENSEN; BERDAL, 2004), já que, quanto mais fragmentado estiver o DNA, menores serão as chances de amplificar corretamente a sequência-alvo da análise.

Outro aspecto que pode favorecer a inibição da PCR é a composição de bases nitrogenadas das sequências amplificadas (amplicons) (PRUVOST; GEIGL, 2004). Há fortes evidências de que amplicons com baixo conteúdo de guanina (G) e de citosina (C), assim como primers com baixa temperatura de fusão (T_m) são mais afetados pelos inibidores da PCR do que amplicons com alto conteúdo de GC e com alta T_m (HUGGETT *et al.*, 2008).

Outra importante causa de inibição da PCR pode ser a presença de outros DNAs (não-alvos) extraídos que bloqueiem espacialmente o anelamento dos primers ou ofereçam sítios não-específicos de ligação (TEBBE; VAHJEN, 1993).

Em virtude do longo tempo do processo e dos riscos envolvidos na execução do método CTAB, diversos kits comerciais para extração de DNA foram desenvolvidos e se encontram disponíveis no mercado. Nas extrações de DNA vegetal, a maioria dos kits comerciais utiliza detergentes para romper a parede celular como primeira etapa do processo. As enzimas RNase A e proteinase K são rotineiramente utilizadas na eliminação de RNAs e de proteínas, respectivamente (DEMEKE; JENKINS, 2010).

2.0 - EXTRAÇÃO DE DNA DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Fungos possuem paredes celulares que dificultam a lise celular e a recuperação do DNA por métodos convencionais de extração (MAAROUFI *et al.*, 2004). Ao contrário das células de mamíferos e de bactérias, as paredes celulares da maioria dos fungos são formadas por espessas camadas de quitina, (1-3)- β -d-glucano, (1-6)- β -glucano, lipídeos e peptídeos (LATGÉ, 2007). Alguns fungos também podem apresentar uma camada de melanina altamente resistente à luz UV, à digestão enzimática e à ruptura química (KARAKOUSIS *et al.*, 2006).

Além disso, a extração de DNA de fungos costuma ser um processo problemático porque a maioria dos protocolos disponíveis incluem primeiramente o

crescimento do micélio em meio líquido (impossível para fungos biotróficos – grupo que inclui grupos importantes de fitopatógenos tais como os agentes de oídios, míldios e ferrugens), depois uma maceração com nitrogênio líquido, uma etapa adicional de lise envolvendo ruptura mecânica ou sonicação, com posterior digestão enzimática (AL-SAMARRAI; SCHMID, 2000; ALAEY *et al.*, 2005).

As técnicas mais comumente utilizadas na extração de ácidos nucleicos de fungos são o uso de enzimas para degradação da parede celular (EINSELE *et al.*, 1997; WILLIAMSON *et al.*, 2000) e a maceração física com gelo seco ou nitrogênio líquido (AL-SAMARRAI; SCHMID, 2000; GRIFFIN *et al.*, 2002; LOEFFLER *et al.*, 2001). Para muitas espécies de fungos, alguns procedimentos simples de lise celular, tais como ciclos sequenciais de congelamento e degelo ou a incubação a quente com detergentes e proteases, não proporcionam altos rendimentos de DNA (FREDRICKS; SMITH; MEIER, 2005).

Outros procedimentos alternativos incluem a ruptura física das células fúngicas pela agitação das amostras com microesferas ou particulados em tubos fechados (MULLER *et al.*, 1998) e a digestão enzimática dos polissacarídeos da parede celular com a formação de esferoplastos (células parcialmente sem parede) seguida dos procedimentos convencionais de lise (GLEE *et al.*, 1987). FAGGI, PINI e CAMPISI (2005), verificaram que o método de extração de DNA com esferas magnéticas é mais simples e rápido de executar do que os métodos convencionais que utilizam fenol e clorofórmio, o que facilita e agiliza a obtenção de DNA de amostras de fungos. Esses mesmos autores concluíram que o uso das esferas magnéticas também permite a padronização e a homogeneidade da extração de DNA já que requer poucos equipamentos adicionais para sua execução em laboratórios de microbiologia. AMER *et al.* (2011) desenvolveram um protocolo barato, rápido, simples e confiável para extração de DNA de fungos com as vantagens de não utilizar nitrogênio líquido, possibilitar a extração de boa quantidade e qualidade de DNA diretamente de placas de petri e que também pode ser utilizado com sucesso na extração de DNA de fungos filamentosos tanto em amostras de solo quanto em outras amostras ambientais. O procedimento consiste em incubar fungos filamentosos, por 48 horas a 25°C, em placas de petri com camada dupla de meios de cultura (uma sólida e outra líquida), sendo a base sólida composta do meio BDA (*Batata Dextrose Agar*) e a base líquida superficial composta

do meio PYG (*Peptone Yeast Glicose*); após a incubação, retirar 50 mg de micélio e transferir para microtubos tipo eppendorf de 1,5 mL para extração de DNA. A homogeneização da amostra é efetuada dentro do microtubo com o auxílio de um pistilo de plástico e de um homogeneizador do tipo Polytron® (Fisher Scientific). A composição das soluções de extração de DNA e os tempos de incubação encontram-se descritos em AMER *et al.* (2011).

A escolha do método mais adequado para extração do DNA de fungos depende da rapidez que se deseja no processo, da pureza necessária do DNA extraído e do tipo de amostra ambiental (plantas, solo, água e ar) em que será executada a extração (ATKINS *et al.*, 2004). Quando se necessita de agilidade e rapidez, por exemplo, é possível extrair o DNA removendo colônias fúngicas diretamente das placas de petri e as aquecendo num tampão de extração (KLIMYUK *et al.*, 1993). Esse procedimento possibilita a extração de DNA de um grande número de colônias simultaneamente e a obtenção de um extrato suficientemente puro para a realização da PCR (ATKINS *et al.*, 2004). Contudo, quando é necessário trabalhar com o DNA total de amostras ambientais ou se necessita de maior quantidade de DNA ou, mesmo ainda, quando os extratos necessitarem ser armazenados por um longo período, a qualidade do DNA extraído deve ser mais elevada (ATKINS *et al.*, 2004).

Por serem muito laboriosos e demorados, diversos laboratórios de microbiologia vêm substituindo métodos convencionais de extração de DNA de fungos pelo uso de kits comerciais (MOŤKOVÁ *et al.*, 2011).

Em amostras de tecidos vegetais, por exemplo, a extração de DNA de fungos pode ser realizada com kits de diversas marcas disponíveis no mercado, tais como o DNeasy® Plant Kit (Qiagen), o NucleoSpin® Plant II Kit (Macherey-Nagel), o Plant/Fungi DNA Isolation Kit (Norgen Biotek Corporation), o ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep® Kit (Zymo Research Corp.), o OmniPrep® for Fungus Kit (G-Biosciences), o DNazol® ES Kit (Life Technologies), o MagNA Pure® LC DNA Isolation Kit III (Roche Applied Science), dentre outros.

No caso de amostras de solo, também é possível extrair DNA fúngico utilizando-se o kit NucleoSpin® Soil Kit (Macherey-Nagel), o PowerSoil® DNA Isolation Kit (Mo-Bio Laboratories Inc.), o PowerMax® Soil DNA Isolation Kit (Mo-Bio

Laboratories Inc.), o ZR Soil Microbe DNA MiniPrep® Kit (Zymo Research Coop.), o Soil Isolation Kit (Norgen Biotek Corporation), dentre outros.

Para extração de DNA de fungos em amostras de água, os principais kits comerciais disponíveis são o Water RNA/DNA Purification Kit (Norgen Biotek Corporation), o PowerWater® DNA Isolation Kit (Mo-Bio Laboratories Inc.) e o E.Z.N.A.® Water DNA Kit (Omega Bio-Tek).

3.0 - EXTRAÇÃO DE DNA DE FITOPLASMAS E DE FITOBACTÉRIAS

Fitoplasmas são bactérias diminutas e sem parede celular que habitam as células crivadas do floema de plantas (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000). Fitoplasmas infectam centenas de vegetais, incluindo importantes culturas agrícolas, ornamentais e espécies florestais (BERTACCINI; DUDUK, 2009) e sua transmissão ocorre por meio de insetos vetores pertencentes às famílias Cicadellidae, Cixidae, Psyllidae, Delphacidae e Derbidae (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006). Alguns protocolos para extração de fitoplasmas em insetos vetores já foram propostos (BOSCO et al, 2002; MARZACHÌ; VERATTI; BOSCO, 1998, NAMBA, 2002). Também pode ocorrer a transmissão de fitoplasmas de plantas infectadas para plantas saudáveis por intermédio de plantas-parasitas do gênero *Cuscuta*, comumente chamadas de “cipó-chumbo” (BERTACCINI; DUDUK, 2009). A concentração de células de fitoplasmas no floema de plantas infectadas pode variar em função da estação do ano e da espécie vegetal, sendo frequentemente baixa em plantas lenhosas (MARZACHÌ, 2004).

Ao contrário da maioria dos micoplasmas humanos e animais, os fitoplasmas não são cultiváveis *in vitro* em meios de cultura sem células vivas (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000), razão pela qual técnicas moleculares são necessárias e frequentemente utilizadas na sua diagnose e caracterização (MARZACHÌ, 2004). O sucesso da PCR na detecção de fitoplasmas em amostras de campo depende, principalmente, da obtenção de extratos de ácidos nucleicos de boa qualidade e com suficiente quantidade de DNA do fitoplasma, o que nem sempre tem ocorrido (FIRRAO; GARCIA-CHAPA; MARZACHÌ, 2007).

Diferentes protocolos de extração de DNA total de fitoplasmas já foram reportados (AHRENS *et al.*, 1992; DAIRE *et al.*, 1997; GREEN; THOMPSON; MACKENZIE, 1999; PRINCE *et al.*, 1993). O objetivo principal desses protocolos

tem sido concentrar o DNA dos fitoplasmas e ao mesmo tempo reduzir a inibição enzimática provocada por polifenóis vegetais e moléculas de polissacarídeos, o que geralmente é obtido pela inclusão de uma etapa de enriquecimento dos fitoplasmas durante a extração de DNA (BERTACCINI; DUDUK, 2009).

No que tange à obtenção de ácidos nucleicos de bactérias por meio de métodos alternativos, o uso dos cartões FTA® da marca Whatman tem simplificado o manejo, o armazenamento e o processamento de ácidos nucleicos (BUSH, 2011). Cartões FTA® contêm reagentes capazes de lisar células, desnaturar proteínas e proteger ácidos nucleicos contra a ação de nucleases, oxidação e luz UV (WHATMAN, 2013). O DNA capturado nos cartões FTA® pode ser utilizado em análises subsequentes após 30 minutos da adição do DNA. De acordo com informações da fabricante (WHATMAN, 2013), dentre as diversas vantagens do uso dos cartões FTA® destacam-se: i) o DNA capturado nos cartões FTA® pode ser preservado por vários anos em temperatura ambiente, o que reduz a necessidade de freezers no laboratório; ii) os cartões FTA® podem ser utilizados com diferentes tipos de células (tecidos vegetais, fungos, bactérias, vírus); e iii) cartões FTA® podem conter indicadores que provocam a mudança de cor do cartão logo após a aplicação das amostras para facilitar a diferenciação de amostras incolores já aplicadas nos cartões.

Quanto ao uso dos cartões FTA® em laboratórios de diagnóstico fitossanitário, BUSH (2011) relatou que os ácidos nucleicos contidos em materiais incubados, tecidos vegetais ou suspensão de amostras podem ser rapidamente extraídos dos cartões, permitindo ao laboratório utilizar imediatamente as amostras ou armazenar para análise futura. Isso evita que laboratórios de diagnóstico fitossanitário com grande fluxo de análises tenham que manter as amostras incubadas ou repicar culturas até que a equipe do laboratório tenha tempo disponível para iniciar a extração de DNA. Os cartões FTA® são excelentes para o arquivamento de amostras e de controles positivos, bem como para posterior sequenciamento do DNA armazenado. Os ácidos nucleicos presentes nos cartões FTA® podem ser transportados interestadualmente sem a necessidade de autorização dos órgãos competentes já que se encontram inativados nesse formato. BUSH (2011) utilizou a tecnologia dos cartões FTA® para o armazenamento de DNA de *Clavibacter*

michiganensis subsp. *michiganensis* para diagnósticos do cancro bacteriano do tomate.

Na extração de DNA de fitobactérias, dentre os principais kits comerciais disponíveis no mercado destacam-se: o Plant/Fungi DNA Isolation Kit (Norgen Biotek Corporation), o ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep® Kit (Zymo Research Coop.), o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Coop.), o BiOstic® Bacteremia DNA Isolation Kit (Mo-Bio Laboratories Inc.), o ZR Soil Microbe DNA MiniPrep® Kit (Zymo Research Coop.), GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit (Vivantis), dentre outros.

4.0 - EXTRAÇÃO DE RNA E DNA DE FITOVÍRUS

A utilização de RNA de baixa qualidade pode comprometer seriamente os resultados de etapas subsequentes da análise molecular, etapas essas que costumam ser laboriosas, demoradas e caras (IMBEAUD *et al.*, 2005; RAEYMARKERS, 1993). A qualidade do RNA purificado é variável e bastante instável durante períodos longos de armazenamento (BUSTIN *et al.*, 2005). Segundo FLEIGE e PFALLF (2006), os extratos purificados de RNA total devem ser: i) livres de proteínas; ii) livres de DNA genômico; iii) livres de RNA degradado (a razão 28S:18S deve estar entre 1,8 e 2,0 e com baixa quantidade de fragmentos curtos de RNA); iv) livres de inibidores da enzima transcriptase reversa e da PCR; v) livres de compostos que possam se complexar com cofatores essenciais da PCR tais como o Mg^{2+} e Mn^{2+} ; e vi) livres de nucleases que podem degradar o RNA durante longos armazenamentos.

Em razão disso, a confiabilidade de métodos moleculares para detecção de vírus pode ser prejudicada por compostos inibidores de PCR tais como ácido húmico, ácido fúlvico, RNases, DNases, dentre outros, que podem induzir à ocorrência de falsos resultados negativos (ABBASZADEGAN *et al.*, 1993; GIBSON *et al.*, 2012; GRIFFIN *et al.*, 2003; HATA *et al.*, 2011; ROCK; ALUM; ABBASZADEGAN, 2010; WYN-JONES *et al.*, 2011).

Métodos de concentração e extração de ácidos nucleicos de vírus frequentemente utilizam kits comerciais de extração em vez de métodos “in-house” que carecem de reprodutibilidade e possuem diferentes controles de qualidade nos laboratórios. Diversos kits utilizados atualmente na extração de ácidos nucleicos

virais foram originalmente desenvolvidos para uso em análises clínicas e oferecem excelentes taxas de recuperação em amostras com baixos níveis de inibidores de PCR (IKER *et al.*, 2013).

Dentre os kits comerciais para extração de ácidos nucleicos virais disponíveis no mercado destacam-se: o PowerViral® Environmental RNA/DNA Isolation Kit (Mo-Bio Laboratories Inc.), o QIAamp® Viral RNA (Qiagen), o ZR Viral DNA/RNA Kit® (Zymo Research Corp.), o PureLink® Pro 96 Viral RNA/DNA Purification Kit (Life Technologies), o MagJET® Viral DNA and RNA Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) e o ExiPrep® Viral DNA/RNA Kit (Bioneer Corp.).

O kit ideal para uma boa extração de ácidos nucleicos de vírus deve oferecer uma recuperação constante do DNA e RNA virais, ser aplicável a uma ampla gama de amostras, ser capaz de eficientemente remover inibidores frequentemente presentes nesse tipo de amostra, ter um bom custo-benefício e ser relativamente rápido (IKER *et al.*, 2013).

Diante de tantas situações diferentes e opções disponíveis para a obtenção de ácidos nucleicos de fitovírus, a validação dos protocolos de extração e de purificação DNA/RNA representa uma etapa crucial do processo, bem como o uso dos controles adequados da reação (positivo, negativo, DNA puro de concentração conhecida, etc.) para garantir o sucesso da qPCR.

5.0 - REFERÊNCIAS

ABBASZADEGAN, Morteza *et al.* Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1318-1324, 1993.

AHRENS, U. *et al.* Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16 S rRNA gene. **Phytopathology**, v. 82, n. 8, p. 828-832, 1992.

AL-SAMARRAI, T. H.; SCHMID, J. A simple method for extraction of fungal genomic DNA. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 53-56, 2000.

AL-SOUD, Waleed Abu; RÅDSTRÖM, Peter. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. **Applied and environmental microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3748-3753, 1998.

ALAEDDINI, Reza. Forensic implications of PCR inhibition—a review. **Forensic Science International: Genetics**, v. 6, n. 3, p. 297-305, 2012.

ALAEY, MITRA *et al.* Comparing study between four different methods of genomic DNA extraction from *Cyclamen persicum* Mill. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 7, p. 882-884, 2005.

AMER, Osama E. *et al.* Non-liquid nitrogen-based method for isolation of DNA from filamentous fungi. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 65, p. 14337-14341, 2011.

ATKINS, Simon D. *et al.* Fungal molecular diagnostics: a mini review. **Journal of Applied Genetics**, v. 45, n. 1, p. 3-15, 2004.

BAAR, Claudia *et al.* Molecular breeding of polymerases for resistance to environmental inhibitors. **Nucleic acids research**, v. 39, n. 8, p. e51-e51, 2011.

BEJ, A. K. *et al.* Polymerase chain reaction-gene probe detection of microorganisms by using filter-concentrated samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 12, p. 3529-3534, 1991.

BERNARDO, G. Di *et al.* Methods to improve the yield and quality of DNA from dried and processed figs. **Biotechnology progress**, v. 21, n. 2, p. 546-549, 2005.

BERNARDO, G. Di *et al.* Comparative evaluation of different DNA extraction procedures from food samples. **Biotechnology progress**, v. 23, n. 2, p. 297-301, 2007.

BERTACCINI, Assunta; DUDUK, Bojan. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. **Phytopathologia mediterranea**, v. 48, n. 3, p. 355-378, 2009.

BOSCO, Domenico *et al.* DNA-based methods for the detection and the identification of phytoplasmas in insect vector extracts. **Molecular biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 9-18, 2002.

BUSH, Elizabeth. Advantages of using FTA cards in the diagnostic lab. **NPDN News**, v. 6, n. 3, p. 3-4, 2011.

BUSTIN, S. A. *et al.* Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. **Journal of molecular endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 597-601, 2005.

CANKAR, Katarina *et al.* Critical points of DNA quantification by real-time PCR—effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. **BMC biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 37, 2006.

CORBISIER, Philippe *et al.* Toward metrological traceability for DNA fragment ratios in GM quantification. 1. Effect of DNA extraction methods on the quantitative determination of Bt176 corn by real-time PCR. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 9, p. 3249-3257, 2007.

DAIRE, X. *et al.* Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribosomal DNA. **European Journal of Plant Pathology**, v. 103, n. 6, p. 507-514, 1997.

DEMEKE, Tigst; JENKINS, G. Ronald. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 396, n. 6, p. 1977-1990, 2010.

DEMEKE, Tigst; RATNAYAKA, Indira; PHAN, Anh. Effects of DNA extraction and purification methods on real-time quantitative PCR analysis of roundup ready soybean. **Journal of AOAC International**, v. 92, n. 4, p. 1136-1144, 2009.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.F. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

EINSELE, Hermann *et al.* Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1353-1360, 1997.

FAGGI, E.; PINI, G.; CAMPISI, E. Use of magnetic beads to extract fungal DNA. **Mycoses**, v. 48, n. 1, p. 3-7, 2005.

FIRRAO, Giuseppe; GARCIA-CHAPA, Meritxell; MARZACHÌ, Cristina. Phytoplasmas: genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 12, p. 1353-1375, 2007.

FLEIGE, Simone; PFAFFL, Michael W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, n. 2, p. 126-139, 2006.

FREDRICKS, David N.; SMITH, Caitlin; MEIER, Amalia. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 10, p. 5122-5128, 2005.

GHOSH, Raju *et al.* An improved method of DNA isolation suitable for PCR-based detection of begomoviruses from jute and other mucilaginous plants. **Journal of Virological Methods**, v. 159, n. 1, p. 34-39, 2009.

GIBSON, K. E. *et al.* Measuring and mitigating inhibition during quantitative real time PCR analysis of viral nucleic acid extracts from large-volume environmental water samples. **Water research**, v. 46, n. 13, p. 4281-4291, 2012.

GLEE, Pati M. *et al.* Methods for DNA extraction from *Candida albicans*. **Analytical biochemistry**, v. 164, n. 1, p. 207-213, 1987.

GREEN, Margaret J.; THOMPSON, Dan A.; MACKENZIE, Donald J. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction. **Plant Disease**, v. 83, n. 5, p. 482-485, 1999.

GRIFFIN, Dale W. *et al.* A rapid and efficient assay for extracting DNA from fungi. **Letters in applied microbiology**, v. 34, n. 3, p. 210-214, 2002.

GRIFFIN, Dale W. *et al.* Pathogenic human viruses in coastal waters. **Clinical microbiology reviews**, v. 16, n. 1, p. 129-143, 2003.

GUDNASON, Haukur *et al.* Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. **Nucleic acids research**, v. 35, n. 19, p. e127, 2007.

HATA, Akihiko *et al.* Validation of internal controls for extraction and amplification of nucleic acids from enteric viruses in water samples. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4336-4343, 2011.

HEDMAN, Johannes; RÅDSTRÖM, Peter. Overcoming inhibition in real-time diagnostic PCR. In: **PCR Detection of Microbial Pathogens**. Humana Press, 2013. p. 17-48.

HOLDEN, Marcia J. *et al.* Evaluation of extraction methodologies for corn kernel (*Zea mays*) DNA for detection of trace amounts of biotechnology-derived DNA. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2468-2474, 2003.

HOLST-JENSEN, Arne; BERDAL, Knut G. The modular analytical procedure and validation approach and the units of measurement for genetically modified materials in foods and feeds. **Journal of AOAC International**, v. 87, n. 4, p. 927-936, 2004.

HUBNER, Philipp *et al.* Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. **Journal of AOAC International**, v. 84, n. 6, p. 1855-1864, 2001.

HUGGETT, Jim F. *et al.* Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon. **BMC research notes**, v. 1, n. 1, p. 70, 2008.

IKER, B. C. *et al.* Evaluation of commercial kits for the extraction and purification of viral nucleic acids from environmental and fecal samples. **Journal of virological methods**, v. 191, n. 1, p. 24-30, 2013.

IMBEAUD, Sandrine *et al.* Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 6, p. e56-e56, 2005.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO. **ISO 21570:2005 - Foodstuffs: Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Quantitative nucleic acid based methods**. Switzerland: ISO, 2005a. 103 p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO. **ISO 21571:2005 – Foodstuffs: Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Nucleic acid extraction**. Switzerland: ISO, 2005b. 43 p.

JOINT RESEARCH CENTER. **Maize seeds sampling and DNA extraction - Report on the validation of a DNA extraction method from maize seeds**. 03 april 2007. Disponível em: <gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/MIR604_DNAExtr.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2013.

JOINT RESEARCH CENTER. **Report on the Validation of a DNA Extraction - Method for Soybean Seeds**. 22 January 2009. Disponível em: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/356043-5_DNAExtr_report.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2013.

JOSE, Joyce; USHA, R. Extraction of geminiviral DNA from a highly mucilaginous plant (*Abelmoschus esculentus*). **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 18, n. 4, p. 349-355, 2000.

KARAKOUSIS, Angelo *et al.* An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. **Journal of microbiological methods**, v. 65, n. 1, p. 38-48, 2006.

KATCHER, H. L.; SCHWARTZ, I. A distinctive property of Tth DNA polymerase: enzymatic amplification in the presence of phenol. **Biotechniques**, v. 16, n. 1, p. 84-92, 1994.

KAY, Simon; VAN DEN EEDE, Guy. The limits of GMO detection. **Nature Biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 405-405, 2001.

KLIMYUK, Victor I. *et al.* Alkali treatment for rapid preparation of plant material for reliable PCR analysis. **The Plant Journal**, v. 3, n. 3, p. 493-494, 1993.

KOCH, Walter H. Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 9, p. 749-761, 2004.

KREADER, Carol A. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 1102-1106, 1996.

KUBISTA, Mikael *et al.* The real-time polymerase chain reaction. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, n. 2, p. 95-125, 2006.

LATGÉ, Jean - Paul. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 279-290, 2007.

LEE, Ing-Ming; DAVIS, Robert E.; GUNDERSEN-RINDAL, Dawn E. Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 221-255, 2000.

LIPP, M. *et al.* IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. **Journal AOAC International**, v. 82, p. 923-928, 1999.

LOEFFLER, Juergen *et al.* Nucleic Acid Sequence-Based Amplification of *Aspergillus* RNA in Blood Samples. **Journal of clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1626-1629, 2001.

MAAROUFI, Younes *et al.* Comparison of different methods of isolation of DNA of commonly encountered *Candida* species and its quantitation by using a real-time PCR-based assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 7, p. 3159-3163, 2004.

MARZACHÌ, C.; VERATTI, F.; BOSCO, D. Direct PCR detection of phytoplasmas in experimentally infected insects. **Annals of Applied Biology**, v. 133, n. 1, p. 45-54, 1998.

MARZACHÌ, Cristina. Molecular diagnosis of phytoplasmas. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 43, n. 2, p. 228-231, 2004.

MAZZARA M., *et al.*; Event-Specific Method for the Quantification of Oilseed Rape Line RT73 Using Real-Time PCR - Validation Report and Protocol - Seeds Sampling and DNA Extraction of Oilseed Rape - 07 february 2007. Disponível em: <http://bookshop.europa.eu/en/event-specific-method-for-the-quantification-of-oilseed-rape-line-rt73-using-real-time-pcr-pbLBNA22918/downloads/LB-NA-22918-EN/C/LBNA22918ENC_002.pdf?FileName=LBNA22918ENC_002.pdf&SKU=LBNA22918ENC_PDF&CatalogueNumber=LB-NA-22918-EN-C>. Acesso em: 20 ago. 2013.

MCCARTNEY, H. Alastair *et al.* Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. **Pest Management Science**, v. 59, n. 2, p. 129-142, 2003.

MOŤKOVÁ, Petra *et al.* Comparison of methods for isolating fungal DNA. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 29, n. Special Issue, p. S76-S85, 2011.

MÜLLER, Frank-Michael C. *et al.* Rapid extraction of genomic DNA from medically important yeasts and filamentous fungi by high-speed cell disruption. **Journal of clinical microbiology**, v. 36, n. 6, p. 1625-1629, 1998.

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic acids research**, v. 8, n. 19, p. 4321-4326, 1980.

NAMBA, Shigetou. Molecular biological studies on phytoplasmas. **Journal of general plant pathology**, v. 68, n. 3, p. 257-259, 2002.

NIU, Chen *et al.* A safe inexpensive method to isolate high quality plant and fungal DNA in an open laboratory environment. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 16, p. 2818-2822, 2008.

OKUBARA, Patricia A.; SCHROEDER, Kurtis L.; PAULITZ, Timothy C. Real-time polymerase chain reaction: applications to studies on soilborne pathogens. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 27, n. 3, p. 300-313, 2005.

PEIST, R. *et al.* PCR inhibitors in plant DNA preparations. **Qiagen news**, v. 3, p. 7-9, 2001.

PRINCE, James P. *et al.* Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. **Phytopathology**, v. 83, n. 10, p. 1130-1137, 1993.

PRUVOST, Mélanie; GEIGL, Eva-Maria. Real-time quantitative PCR to assess the authenticity of ancient DNA amplification. **Journal of Archaeological Science**, v. 31, n. 9, p. 1191-1197, 2004.

RAEYMAEKERS, Luc. Quantitative PCR: theoretical considerations with practical implications. **Analytical Biochemistry**, v. 214, n. 2, p. 582-585, 1993.

ROCK, Channah; ALUM, Absar; ABBASZADEGAN, Morteza. PCR inhibitor levels in concentrates of biosolid samples predicted by a new method based on excitation-emission matrix spectroscopy. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 24, p. 8102-8109, 2010.

ROSSEN, Lone *et al.* Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. **International journal of food microbiology**, v. 17, n. 1, p. 37-45, 1992.

ROUSSEL, Yvonne *et al.* Evaluation of DNA extraction methods from mouse stomachs for the quantification of *H. pylori* by real-time PCR. **Journal of microbiological methods**, v. 62, n. 1, p. 71-81, 2005.

RYS, P. N.; PERSING, D. H. Preventing false positives: quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products. **Journal of clinical microbiology**, v. 31, n. 9, p. 2356-2360, 1993.

SCHENA, L. *et al.* Development of quantitative PCR detection methods for phytopathogenic fungi and oomycetes. **Journal of Plant Pathology**, v. 95, n. 1, p. 7-24, 2013.

SHOKERE, Luke A.; HOLDEN, Marcia J.; RONALD JENKINS, G. Comparison of fluorometric and spectrophotometric DNA quantification for real-time quantitative PCR of degraded DNA. **Food control**, v. 20, n. 4, p. 391-401, 2009.

SUTLOVIC, Davorika *et al.* Interaction of humic acids with human DNA: proposed mechanisms and kinetics. **Electrophoresis**, v. 29, n. 7, p. 1467-1472, 2008.

TEBBE, Christoph C.; VAHJEN, Wilfried. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 8, p. 2657-2665, 1993.

TSAI, Yu-Li; OLSON, Betty H. Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 754-757, 1992a.

TSAI, Yu-Li; OLSON, Betty H. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 7, p. 2292-2295, 1992b.

VANEECHOUTTE, Mario; VAN ELDERE, Johan. The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology. **Journal of medical microbiology**, v. 46, n. 3, p. 188-194, 1997.

VIEIRA, Ana *et al.* Validation of RT-qPCR reference genes for *in planta* expression studies in *Hemileia vastatrix*, the causal agent of coffee leaf rust. **Fungal Biology**, v. 115, n. 9, p. 891-901, 2011.

WEINTRAUB, Phyllis G.; BEANLAND, LeAnn. Insect vectors of phytoplasmas. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 91-111, 2006.

WHATMAN. FTATM Nucleic Acid Collection, Storage and Purification. Disponível em: <<http://www.whatman.com/FTANucleicAcidCollectionStorageandPurification.aspx>>. Acesso em: 09 out. 2013.

WILLIAMSON, Emma *et al.* Diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients by polymerase chain reaction. **British journal of haematology**, v. 108, n. 1, p. 132-139, 2000.

WITTEWER, Carl T. *et al.* Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. **Biotechniques**, v. 22, n. 1, p. 130-139, 1997.

WILSON, Ian G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 10, p. 3741, 1997.

WOLFFS, Petra et al. Impact of DNA polymerases and their buffer systems on quantitative real-time PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 1, p. 408-411, 2004.

WYN-JONES, A. Peter *et al.* Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. **Water research**, v. 45, n. 3, p. 1025-1038, 2011.

ZIPPER, Hubert *et al.* Mechanisms underlying the impact of humic acids on DNA quantification by SYBR Green I and consequences for the analysis of soils and aquatic sediments. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 7, p. e39-e39, 2003.

CAPÍTULO 2

PCR EM TEMPO-REAL PARA DETECÇÃO DE FITOPATÓGENOS E A HARMONIZAÇÃO DAS INFORMAÇÕES DAS PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

1.0 - INTRODUÇÃO

Um dos pré-requisitos para o controle efetivo de qualquer nova praga ou doença é a capacidade de detectar e identificar rápida e corretamente seu agente causal (SCHAAD; FREDERICK, 2002). Por esse motivo, o emprego de métodos moleculares baseados em DNA para detecção, quantificação e estudos de populações de patógenos alimentares vem crescendo muito nos últimos anos (POSTOLLEC, 2011). Além de terem aprimorado nossa capacidade de detectar e identificar fitopatógenos, os diagnósticos moleculares também ampliaram nossos conhecimentos sobre a epidemiologia e ecologia destes organismos (MARTIN; JAMES; LÉVESQUE, 2000).

Com o advento da enzima Taq® (*Thermus aquaticus*) DNA polimerase em 1988, o uso da PCR (reação em cadeia da polimerase) (MULLIS, 1987) cresceu rapidamente tanto no campo da fitopatologia quanto nas demais áreas biológicas (HENSON; FRENCH, 1993). Em consequência disso, métodos baseados em PCR têm recebido atenção especial dos laboratórios de microbiologia, o que culminou na publicação de normas ISO específicas para a detecção de patógenos em alimentos (POSTOLLEC, 2011). Uma das principais aplicações da PCR na fitopatologia é a detecção de patógenos em sementes e outros materiais propagativos assintomáticos, tais como tubérculos e estacas, já que a baixa população de propágulos e o estado quiescente dos fitopatógenos nesse tipo de material dificulta sua detecção por métodos microbiológicos tradicionais (SCHAAD; FREDERICK, 2002).

A realização de uma reação de PCR pode ser dividida em três etapas. Na primeira, a fita dupla de DNA (dsDNA) é submetida a uma temperatura acima de 90°C para provocar a sua separação em fitas simples (sDNA). Na segunda etapa, a temperatura é reduzida para a faixa de 50 a 60°C para provocar o anelamento dos

primers (iniciadores) nas fitas de sDNA. Na terceira, a temperatura é elevada para a faixa de 70 a 78°C a fim de induzir a extensão dos primers nas fitas de sDNA (MACKAY, 2004). A PCR pode ser classificada em dois tipos básicos: a PCR convencional e a quantitativa (qPCR).

A qPCR, desenvolvida por HIGUCHI *et al.* (1992), é uma técnica molecular rápida, sensível e específica que pode ser utilizada no diagnóstico de fitopatógenos em amostras de plantas, solo, água e ar (OKUBARA, 2005; POSTOLLEC, 2011). A qPCR combina a sensibilidade da PCR convencional com o acompanhamento em tempo-real da amplificação do DNA por meio da emissão de fluorescências que permitem a quantificação de sequências específicas (SCHENA *et al.*, 2004). A principal diferença entre a PCR convencional e a PCR em tempo-real é que na qPCR a formação do produto final da PCR (amplicon) pode ser monitorada e registrada em tempo-real, tanto diretamente por sinais de moléculas fluorescentes e sondas complementares quanto indiretamente pela fluorescência gerada na clivagem de nucleotídeos realizada pela enzima *Taq*® polimerase (OKUBARA, 2005). Ao contrário da PCR convencional, em que o uso de amplicons constituídos por centenas de pares de bases pode reduzir a sensibilidade e a especificidade dos diagnósticos em virtude da maior probabilidade de ocorrerem erros de amplificação, a qPCR funciona melhor com amplicons curtos (de 50 a 200 pares de bases) e com concentrações maiores de MgCl₂, primers e dNTPs (LÓPEZ *et al.*, 2009).

Dentre os principais benefícios do emprego dessa técnica na realização de diagnósticos estão sua rapidez, sensibilidade e especificidade que são superiores às dos métodos microbiológicos tradicionais, além de possibilitar a detecção simultânea de diferentes microrganismos (POSTOLLEC, 2011). Além disso, a qPCR requer menos reagentes, tempo e também possibilita a realização de estudos adicionais durante a detecção, tais como a quantificação da população original, detecção de variantes de um patógeno ou de pontos de mutação de um gene (LÓPEZ *et al.*, 2009). Explicam estas vantagens da qPCR: i) rapidez: o DNA amplificado vai sendo detectado no momento em que a reação de PCR está ocorrendo, o que dispensa a etapa de pós-PCR normalmente realizada na PCR convencional; ii) escala: é possível automatizar o preparo das amostras (extração de DNA/RNA e pipetagem de reagentes nas microplacas) e aumentar significativamente o número de amostras analisadas; iii) sensibilidade: além de conseguir distinguir pequenas variações na

concentração de DNA, a qPCR também possibilita a detecção de até mesmo uma única cópia do DNA-alvo; iv) efetividade mesmo com baixas concentrações iniciais de DNA: a qPCR pode ser realizada em amostras com até mil vezes menos DNA inicial do que o necessário para uma reação de PCR convencional; e v) ampla faixa dinâmica de quantificação: é possível detectar e quantificar o DNA na faixa de 1 até 10.000.000 de cópias.

Em decorrência dessas vantagens, MACKAY *et al.* (2007) verificaram que o uso da qPCR em diagnósticos microbiológicos cresceu tanto que deixou de ser uma novidade para se tornar uma tecnologia madura e essencial no campo da microbiologia. A qPCR tem, então, provocado mudanças significativas na forma de detectar microrganismos já que os métodos microbiológicos tradicionais de identificação baseados no fenótipo e na detecção de antígenos, apesar de ainda serem úteis, vem sendo suplantados por métodos de detecção, caracterização e quantificação de ácidos nucleicos microbianos. Por outro lado, esses mesmos autores também destacaram algumas limitações que a qPCR pode ter, tais como: i) a obrigatoriedade de ter que se conhecer o genoma do microrganismo-alvo para viabilizar o desenho dos primers que serão utilizados; ii) a dificuldade em encontrar as sequências de nucleotídeos de determinados microrganismos e suas respectivas variantes nos bancos de dados disponíveis; e iii) a ocorrência de falsos resultados negativos causados por polimorfismos inesperados nos genomas analisados que podem reduzir ou impedir a ocorrência da reação de PCR.

Além dessas, outras desvantagens da qPCR também podem ser apontadas, quais sejam: i) custo do equipamento: os termocicladores de PCR em tempo-real são de cinco a dez vezes mais caros do que termocicladores para PCR convencional em virtude do custo de seus componentes óticos para detecção de fluorescência; ii) custo dos insumos: a grande sensibilidade da qPCR exige que os reagentes utilizados sejam de alta qualidade e que o preparo das soluções reagentes seja muito preciso. Por esse motivo, é muito comum a utilização de kits com os reagentes mais comuns já pré-misturados (“pre-mix”); iii) custo dos consumíveis: em virtude da alta sensibilidade dos detectores de fluorescência, as microplacas e respectivos selantes devem possuir características óticas especiais, o que torna esses consumíveis ainda mais caros do que os utilizados na PCR convencional; iv) inibição da reação da PCR: a presença de compostos inibidores

nas matrizes das amostras bem como sua ineficiente eliminação durante a extração do DNA podem reduzir a eficiência da qPCR; v) sensibilidade a erros: a alta sensibilidade da qPCR possibilita que pequenos erros analíticos impactem negativamente os resultados finais. Por isso, recomenda-se o uso constante de controles internos de reação tais como: controles positivos, controles negativos, brancos de extração e brancos de mix para a avaliação da qualidade de cada corrida de qPCR; e vi) interpretação de dados: apesar de serem mais informativos, os dados gerados pela qPCR são de análise e interpretação mais complicadas do que os resultantes de uma PCR convencional.

O mecanismo de ação de uma reação de qPCR consiste na hibridização (ligação) de sondas marcadas a regiões específicas de um amplicon que, ao serem clivadas pela ação da *Taq*® polimerase durante o processo de amplificação de DNA, emitem fluorescência que é detectada pelos sensores óticos dos termocicladores de PCR em tempo-real. A escolha dessas sondas marcadas tem impacto significativo na sensibilidade da qPCR e, portanto, deve ser criteriosamente considerada nas estratégias de otimização da reação (JOSEFSEN *et al.*, 2009).

Dois sistemas de fluorescência são comumente utilizados nas reações de qPCR: o sistema SYBR Green (WITTEWER *et al.*, 1997) e o sistema *TaqMan*® (HOLLAND *et al.*, 1991; LIVAK *et al.*, 1995).

No sistema SYBR, o corante SYBR Green I liga-se a qualquer DNA de dupla fita intercalando-se em pares de bases adjacentes, com a emissão de um sinal de fluorescência após uma excitação luminosa (Figura 1). Essa fluorescência vai aumentando proporcionalmente com o acúmulo de amplicons após cada ciclo da qPCR. Considerando-se o fato de que o corante SYBR Green I se liga a qualquer DNA de fita dupla, é essencial utilizar primers altamente específicos para a sequência-alvo do DNA a fim de evitar ligações com sequências não-específicas que também contribuem para o aumento do sinal de fluorescência e podem provocar uma superestimação do alvo (SMITH; OSBORN, 2009).

No sistema *Taqman*®, sondas de hidrólise, também conhecidas como 5'nuclease ou simplesmente *TaqMan*®, são desenhadas para complementar uma sequência do DNA-alvo localizada entre o iniciador 5'-3' ("primer forward") e o iniciador 3'-5' ("primer reverse"), preferencialmente o mais próximo possível de um dos sítios de ligação dos iniciadores. Essas sondas são marcadas na terminação 5'

com um fluoróforo fluorescente (“*reporter*”) e na terminação 3’ por um inibidor de fluorescência (“*quencher*”). Essas sondas marcadas possuem uma temperatura de “melting” (T_m) maior do que a temperatura dos iniciadores, o que permite que o anelamento das sondas ocorra antes do anelamento dos primers. Quando esses primers são estendidos, a sonda é hidrolisada pela ação de exonuclease 5’-3 da *Taq*® polimerase, provocando a separação do fluoróforo “*reporter*” do fluoróforo “*quencher*”, gerando uma imediata emissão de fluorescência, conforme se observa na Figura 2 (JOSEFSEN *et al.*, 2012). Esse aumento da fluorescência é captado em tempo-real pelo termociclador de qPCR, eliminando a etapa de pós-PCR do processo (MUNFORD *et al.*, 2006).

As sondas marcadas para qPCR também podem ser divididas, segundo JOSEFSEN *et al.* (2012), em: i) sondas de hibridização linear: ao contrário do aumento acumulativo de fluorescência observado nas amplificações com as sondas de hidrólise, o sinal das sondas de hibridização linear é gerado a cada ciclo da qPCR. Outra importante diferença, é que são utilizadas duas sondas lineares marcadas com fluoróforos distintos que são desenhadas para se ligarem ao DNA-alvo entre os sítios de anelamento dos primers forward e reverse. Na maioria dos casos, uma sonda é marcada na terminação 3’ com um fluoróforo doador e a outra sonda na 5’ com um fluoróforo receptor. Quando a hibridização ocorre, os fluoróforos das duas sondas se aproximam e o doador excita o receptor, que passa a emitir fluorescência (Figura 3).;ii) sondas conformacionais: também conhecidas como “molecular beacons” (MBs), são desenhadas para formar uma estrutura secundária em forma de grampo na qual a fluorescência do fluoróforo “*reporter*” é inibida pela proximidade com o fluoróforo “*quencher*” (Figura 4). Os MBs oferecem uma especificidade excepcional graças à estabilidade da sua estrutura em forma de grampo que garante que a sua abertura somente ocorra quando houver uma perfeita complementariedade no sítio de anelamento do DNA-alvo.

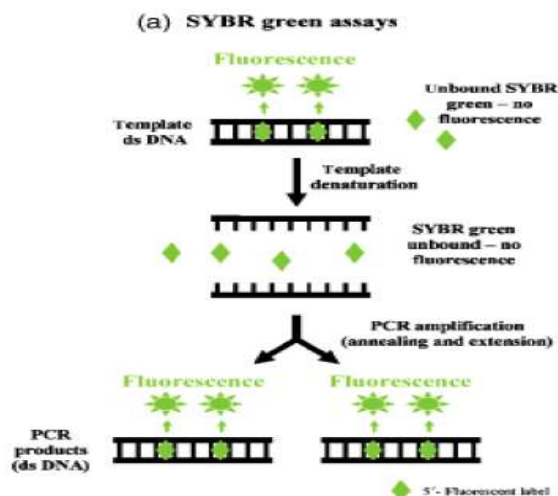


Figura 1: Mecanismo de ação do sistema SYBR Green
 Fonte: SMITH; OSBORN, 2009, p. 8.

Um dos pré-requisitos para o sucesso da qPCR é garantir que haja uma forte ligação da sonda marcada com os amplicons durante a fase de anelamento da PCR. Isso é obtido ao se desenhar a sonda com uma temperatura de “melting” (T_m) de 5 a 10°C mais alta do que a T_m dos primers (JOSEFSEN *et al.*, 2009).

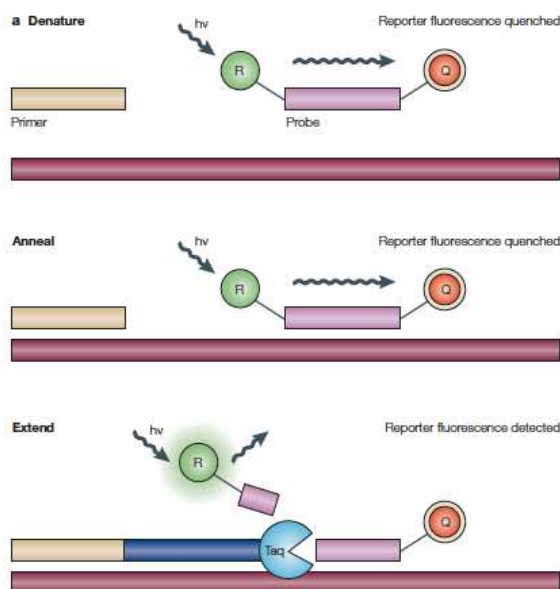


Figura 2: Mecanismo de ação das sondas TaqMan®
 Fonte: KOCH, 2004, p. 750.

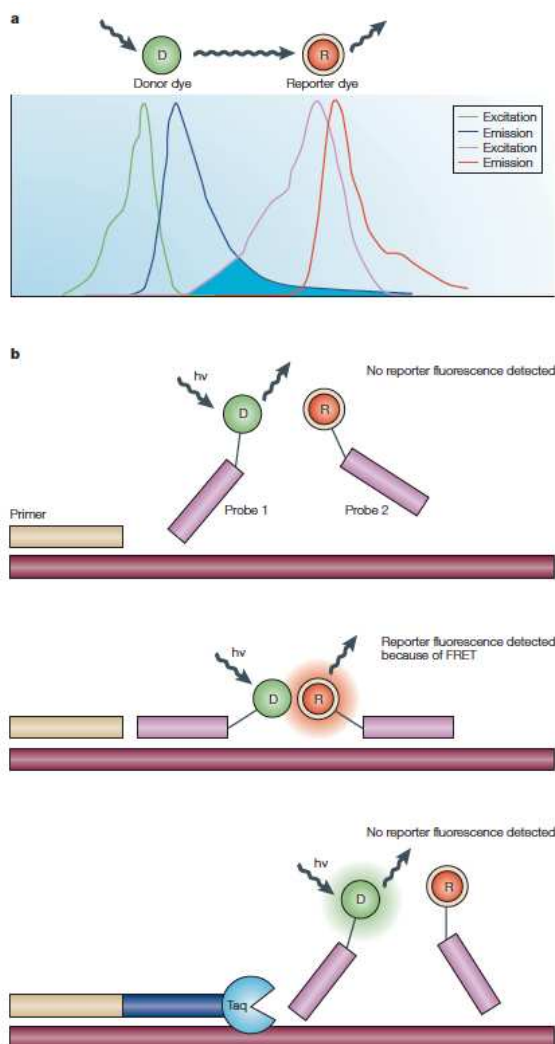


Figura 3: Mecanismo de ação das sondas de hibridização linear
Fonte: KOCH, 2004, p. 751.

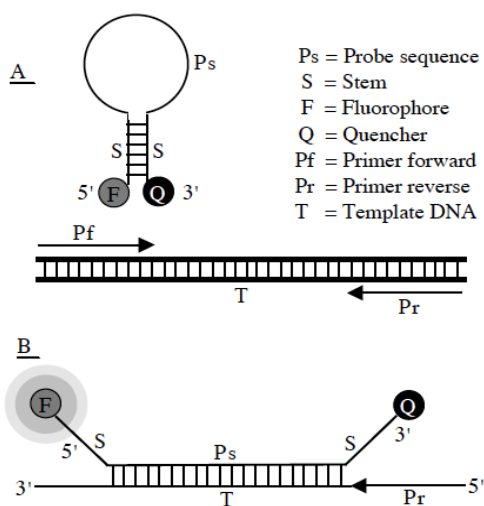


Figura 4: Mecanismo de ação de uma sonda conformacional (MB)
Fonte: SCHENA *et al.*, 2004, p. 897.

Diversas revisões e estudos científicos já foram publicados sobre métodos de detecção fitopatógenos por PCR em tempo-real (BILODEAU, 2011; COOKE *et al.*, 2007; FREDERICK, 2002; GUAN *et al.*, 2013; LOCONSOLE; SAPONARI; SAVINO, 2010; MUMFORD *et al.*, 2006; O'BRIEN *et al.*, 2009; OKUBARA *et al.*, 2005; SCHAAD; FREDERICK, 2002; SCHENA *et al.*, 2004; VINCELLI; TISSERAT, 2008; WARD *et al.*, 2004).

2.0 - PCR EM TEMPO-REAL PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Em virtude da ocorrência de pleomorfismos (alteração de fenótipo em resposta a estímulos ambientais), a taxonomia de fungos costuma ser bastante complexa, já que muitos ascomicetos podem existir (isolada ou combinadamente) tanto na sua forma sexual (teleomorfos) quanto assexual (anamorfos) (TAYLOR, 2011; WINGFIELD *et al.*, 2012). Com o uso do sequenciamento de DNA nas identificações de fungos patogênicos, foram encontrados táxons crípticos que revolucionaram nosso entendimento sobre as relações entre os fungos, além de ter sido possível propor a substituição do sistema normalmente utilizado de dupla nomenclatura pela proposta de classificação “um fungo = um nome” (WINGFIELD *et al.*, 2012).

Nas análises de genotipagem (detecção de polimorfismos) de fungos, a região do DNA oficialmente escolhida para identificação isolada ou de misturas de fungos é a região ITS (*internal transcribed spacer*) do DNA ribossômico nuclear (nrDNA) (BELLEMAIN *et al.*, 2010; SCHOCH *et al.*, 2012). A Tabela 3 contém alguns exemplos de métodos de diagnóstico de fungos fitopatogênicos por PCR em tempo-real.

Ao combinar a amplificação e a detecção do DNA-alvo em um único tubo de reação, a PCR em tempo-real (qPCR) reduz a possibilidade de contaminação ambiental por amplicons. Essa vantagem é particularmente importante nas diagnoses de doenças fúngicas em virtude da abundante presença desses microrganismos no ambiente (WENGENACK; BINNICKER, 2009). A contaminação de etapas subsequentes das reações de PCR com amplicons carregados de reações passadas representa uma significativa limitação dos ensaios de PCR convencional e Nested, limitando o uso rotineiro da PCR convencional em laboratórios de diagnóstico (WENGENACK; BINNICKER, 2009) e estimulando o uso da qPCR.

Recentemente, DEAN *et al.* (2012) elaboraram um lista dos dez fungos mais utilizados como alvos de estudos moleculares no periódico *Molecular Plant Pathology*. São eles: i) *Magnaporthe oryzae*; (ii) *Botrytis cinerea*; (iii) *Puccinia* spp.; (iv) *Fusarium graminearum*; (v) *Fusarium oxysporum*; (vi) *Blumeria graminis*; (vii) *Mycosphaerella graminicola*; (viii) *Colletotrichum* spp.; (ix) *Ustilago maydis*; (x) *Melampsora lini*, com menção honrosa para *Phakopsora pachyrhizi* e *Rhizoctonia solani*.

Tabela 3: Exemplos de diagnósticos de fungos fitopatogênicos por PCR em tempo-real (adaptada de SCHENA *et al.*, 2004)

Fungo	Cultura	Tipo de qPCR	Referência
<i>Aspergillus flavus</i>	Milho, pimenta e páprica	TaqMan®	MAYER <i>et al.</i> , 2003
<i>Colletotrichum coccodes</i>	Batata e solo	TaqMan®	CULLEN <i>et al.</i> , 2002
<i>Fusarium</i> spp.	Trigo	SYBR® Green I	SCHNERR; NIESSEN; VOGEL, 2001
<i>Fusarium solani</i> f.sp. <i>phaseoli</i>	Feijão	SYBR® Green I	FILLION <i>et al.</i> , 2003a FILLION <i>et al.</i> , 2003b
<i>Magnaporthe grisea</i>	Arroz	SYBR® Green I	QI; YANG, 2002
<i>Phakopsora pachyrhizi</i> <i>Phakopsora meibomia</i>	Soja	TaqMan®	FREDERICK <i>et al.</i> , 2002
<i>Phytophthora infestans</i>	Batata	SYBR® Green I	AVROVA <i>et al.</i> , 2003
<i>Rhizoctonia solani</i>	Batata e solo	TaqMan®	LEES <i>et al.</i> , 2002

Fonte: SCHENA *et al.*, 2004.

3.0 - PCR EM TEMPO-REAL PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FITOPLASMAS E DE FITOBACTÉRIAS

O reconhecimento da presença de doenças bacterianas em plantas pode ser relativamente fácil quando a sintomatologia típica está ocorrendo - por exemplo murcha acompanhada de exsudação de pus bacteriano, odores característicos, dentre outros. Contudo, tais sintomas nem sempre são específicos e costumam ser confundidos com sintomas de outros agentes bióticos e ou abióticos (PALACIO-BIELSA; CAMBRA; LÓPEZ, 2009).

Protocolos convencionais para detecção de fitobactérias baseados no isolamento e identificação posterior costumam ser demorados e nem sempre suficientemente específicos e sensíveis. Conseqüentemente, tais protocolos não são os mais adequados para análises de grande quantidade de amostras. Somam-se a isso, a baixa reprodutibilidade da identificação fenotípica, a frequente falta de significância filogenética de caracteres fenotípicos, falsos resultados negativos em função da ocorrência de bactérias em estresse, injuriadas ou que se encontram em estado “viável mas não-cultivável - VMNC” (LÓPEZ *et al.*, 2009).

Em decorrência disso, métodos baseados na detecção de ácidos nucleicos oferecem maior sensibilidade, especificidade e confiabilidade, além de serem mais rápidos do que métodos convencionais de detecção bactérias fitopatogênicas em diferentes hospedeiros e ambientes (PALACIO-BIELSA; CAMBRA; LÓPEZ, 2009).

Recentemente, MANSFIELD *et al.* (2012) elencaram as dez fitobactérias mais utilizadas como alvos de estudos moleculares no periódico *Molecular Plant Pathology*. São elas: i) patovares de *Pseudomonas syringae*; ii) *Ralstonia solanacearum*; iii) *Agrobacterium tumefaciens*; iv) *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; v) patovares de *Xanthomonas campestris*; vi) patovares de *Xanthomonas axonopodis*; vii) *Erwinia amylovora*; viii) *Xylella fastidiosa*; ix) *Dickeya dadantii* e *D. solani*; x) *Pectobacterium carotovorum* e *P. atrosepticum*.

Diversos protocolos de diagnóstico de fitobactérias por PCR em tempo-real vêm sendo publicados (Tabela 4). Tais protocolos utilizam tanto sondas de hidrólise (TaqMan®) quanto corantes intercalantes (SYBR® Green I).

Tabela 4: Exemplos de protocolos de PCR em tempo-real para diagnóstico de fitobactérias (adaptada de PALACIO-BIELSA; CAMBRA; LÓPEZ, 2009)

Fitobactéria	Primer Sonda DNA-alvo	Tipo de qPCR	Referência	Sinônimos / Observações
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Primers: Rol-F / Rol-R Sonda: Rol-Pr Ri-plasmídeo	TaqMan®	WELLER; STEAD, 2002	<i>Agrobacterium</i> biovar 1
<i>Burkholderia glumae</i>	Forward / Reverse	SYBR® Green I	SAYLER; CARTWRIGHT; YANG, 2006	-
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	Primers: Cms 50-2F / Cms 133 R Sonda Cms 50-53T DNA cromossômico	TaqMan® BIO + TaqMan®	SCHAAD <i>et al.</i> , 1999	BIO significa enriquecimento em meio sólido

Tabela 4: (Continuação)

<i>Clavibacter michiganensis</i> subespécies:	Primers: FPCm / RPCm			
<i>michiganensis</i> , <i>sepedonicus</i> , <i>nebraskensis</i> , <i>tesselarius</i>	Sondas: Cmi, Cmm, Cms, Cmn e Cmt ITS comum em todas as subespécies	TaqMan®	BACH <i>et al.</i> , 2003	-
<i>Erwinia amylovora</i>	Primers: P29TF / P29TR Sonda: P29TM DNA plasmídeo (pEA29)	TaqMan® SYBR® Green I	SALM; GEIDER, 2004	-
<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	Primers: Lxx82F / Lxx22R Lxx202F / Lxx331R	SYBR® Green I	GRISHAM; PAN; RICHARD JR, 2007	-
<i>Candidatus liberibacter africanus</i>	Região ITS Primers: HLB _r (reverse) (comum) HLB _a f, HLB _a m, HLB _a s (forward) (específico para cada espécie)			
<i>Ca. L. americanus</i>	COX _f , COX _r Gene da oxidase do citocromo	TaqMan®	LI; HARTUNG; LEVY, 2006	-
<i>Ca. L. asiaticus</i>	Sonda: COX _{fp} Gene da oxidase do citocromo Primers: PsF-tox / PsR-tox			
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Sonda: PsF-tox-286P Cluster cromossômico tox-argK c Primers: RSC-F / RSC-R	TaqMan®	SCHAAD; BERTHIER-SCHAAD; KNORR, 2007	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Sonda: RSC-P Fragm. DNA para o biovar 2	TaqMan® BIO	OZAKMAN; SCHAAD, 2003	Cepas da raça 3, biovar 2 são especificamente amplificadas <i>X. citri</i> pv. <i>citri</i>
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	Primers: VM1 / VM2 VM3 / VM4 VM5 / VM6	SYBR® Green I	MAVRODIEVA; LEVY; GABRIEL, 2004	<i>X. citri</i> pv. <i>aurantifolii</i> não está incluído na lista International Society of Plant Pathology (ISPP).
<i>X. citri</i> pv. <i>aurantifolii</i>	Família do gene <i>pthA</i>			

Fonte: PALACIO-BIELSA, A.; CAMBRA, M. A.; LÓPEZ, M. M., 2009.

4.0 - PCR EM TEMPO-REAL PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FITOVÍRUS E DE VIRÓIDES

O desenvolvimento e a adaptação de métodos eficientes para a rápida diagnose e controle de fitovírus é uma necessidade premente na fitopatologia tendo em vista que infecções virais afetam seriamente a qualidade e a quantidade de produtos agrícolas no mundo, especialmente em países menos desenvolvidos (LIMA *et al.*, 2012). Diversos métodos têm sido utilizados para detecção e caracterização específica de patógenos virais associados a materiais de propagação vegetal, sendo que as técnicas mais tradicionalmente utilizadas são a indexação biológica e os testes sorológicos (LÓPEZ *et al.*, 2009). Contudo, tais métodos apresentam limitações que podem levar a falsos resultados negativos uma vez que alguns isolados podem não induzir o aparecimento de sintomas, além de serem técnicas

laboriosas, caras e demasiadamente demoradas. Diante desse quadro, a PCR em tempo-real apresenta-se como uma excelente alternativa para estudos de carga viral em plantas e vetores de vírus (CHEN; HU, 2013; ZHAO *et al.*, 2013; ČEPIN *et al.*, 2010).

Apesar de a PCR em tempo-real não conseguir distinguir vírus infectivos dos não-infectivos nas amostras, o uso de dessa técnica oferece aos pesquisadores uma ferramenta de triagem altamente sensível antes da realização das dispendiosas e demoradas culturas celulares essenciais para pesquisas de exposição a vírus infectivos (IKER *et al.*, 2013). Análises para detecção de fitovírus por PCR frequentemente requerem preparação mecânica de extratos de planta ou de insetos, as quais preferencialmente devem ser realizadas em sacos plásticos individuais para evitar contaminação cruzada entre as amostras (LÓPEZ *et al.*, 2009).

Fitovírus são nucleoproteínas parasitas obrigatórios moleculares que utilizam os sistemas de síntese de ácidos nucleicos e de proteínas das células vegetais hospedeiras (REZENDE; KITAJIMA, 2011). O 9º relatório do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus elenca cerca de 900 fitovírus, sendo quase todos patogênicos (KING *et al.*, 2012). A maioria dos fitovírus possui genomas de RNA e produz uma única forma de ácido nucleico: longas cadeias de RNA de fita dupla (dsRNA) (ROOSSINCK, 2012). No entanto, apesar de vírus e viróides serem encontrados em quase 60% das plantas (WREN *et al.*, 2006), até mesmo plantas visivelmente sintomáticas podem apresentar baixos níveis de carga viral (LAPIDOT *et al.*, 2001). Nesses casos, para se fazer a identificação, as partículas virais devem ser primeiramente concentradas a fim de que possam ser efetivamente analisadas (CASHDOLLAR *et al.*, 2013; IKNER; GERBA; BRIGHT, 2012). Cabe destacar que a maioria dos fitovírus é transmitida exclusivamente por insetos e que a análise desses vetores também é fundamental em estudos sobre a diversidade dos vírus de plantas (NG *et al.*, 2011).

Ao contrário de outros microrganismos que podem ser identificados pelo seu RNA ribossomal ou por genes universais, os vírus não possuem genes em comum com similaridade suficiente para serem utilizados na identificação de novos fitovírus (ROOSSINCK, 2011). Por conta disso, as ferramentas utilizadas tradicionalmente no diagnóstico de fitovírus incluem a inoculação em plantas indicadoras (indexação), testes sorológicos (ELISA), várias técnicas de hibridização de ácidos nucleicos e a

microscopia eletrônica. O uso da PCR e da RT-PCR (PCR com transcriptase reversa) na detecção de vírus e a utilização de microarranjos (“microarrays”) com sequências específicas têm sido consideradas poderosas ferramentas de diagnóstico (BOONHAM; TOMLINSON; MUMFORD, 2007; GROOVER, 2010).

A RT-PCR é um tipo de reação em cadeia da polimerase muito utilizada na identificação de vírus de RNA, na qual o RNA-alvo é inicialmente transformado em DNA complementar (cDNA) pela enzima transcriptase reversa (RT) para ser posteriormente amplificado pela DNA polimerase (PCR). Quando essa segunda reação for de qPCR, o processo é denominado RT-qPCR.

Uma das principais limitações da RT-PCR e da RT-qPCR é a instabilidade das moléculas de RNA que se degradam facilmente durante o processo de análise e podem facilitar a ocorrência de falsos resultados negativos. Em razão disso, é fundamental armazenar corretamente as amostras a serem analisadas e obter RNAs intactos e puros (BOLLMANN *et al.*, 2012). Outro ponto crucial da RT-qPCR é a normalização dos resultados que pode influenciar profundamente as conclusões das análises de RNA, quando executadas inadequadamente (FERGUSON *et al.*, 2010), já que a quantidade e a qualidade do RNA, bem como a eficiência da reação de transcrição reversa podem afetar os resultados (WEISS; THEILE; HAEFELI, 2012). As estratégias para normalização de resultados de RT-qPCR atualmente utilizadas variam desde uma padronização da massa amostrada, como por exemplo, o peso dos tecidos ou a massa de RNA, até o uso de padrões internos e externos (BOLLMANN *et al.*, 2012). A lógica por trás dessa estratégia de normalização está na quantificação do mRNA (RNA mensageiro) de uma referência interna que esteja sujeita às mesmas condições do mRNA de interesse (BOLLMANN *et al.*, 2012). Ao se usar essa estratégia, é absolutamente essencial procurar por genes de referência cuja expressão não seja influenciada nem pelas condições experimentais (WEISS; THEILE; HAEFELI, 2012) e nem sejam diferentemente regulados em órgãos, tecidos ou células de interesse (CABIATI *et al.*, 2012). A RT-qPCR vem sendo utilizada em reações multiplex para triagem de diversos fitovírus (AGINDOTAN; SHIEL; BERGER, 2007; DAI *et al.*, 2013; LIN *et al.*, 2013; LÓPEZ-FABUEL *et al.*, 2012; MORTIMER-JONES *et al.*, 2009; MUMFORD *et al.*, 2004; PRICE *et al.*, 2010).

SCHOLTHOF *et al.* (2011) elaboraram uma lista com os dez fitovírus mais utilizados como alvos de estudos moleculares no periódico *Molecular Plant*

Pathology. São eles: i) *Tobacco mosaic virus* - TMV (mosaico-do-tabaco); ii) *Tomato spotted wilt virus* - TSWV (vira-cabeça do tomateiro); iii) *Tomato yellow leaf curl virus*- TYLCV (vírus do enrolamento e amarelecimento foliar do tomateiro); iv) *Cucumber mosaic virus* - CMV (mosaico-do-pepino); v) *Potato virus Y* - PVY (vírus Y da batata); vi) *Cauliflower mosaic virus* - CaMV (mosaico-da-couve-flor); vii) *African cassava mosaic virus* - ACMV (mosaico-africano-da-mandioca); viii) *Plum pox virus* - PPV (sharca); ix) *Brome mosaic virus* - BMV (mosaico-do-capim-bromo); e x) *Potato virus X* - PVX (vírus X da batata), com menções honrosas para o *Citrus tristeza virus* - CTV (tristeza-dos-citros), o *Potato leafroll virus* - PLRV (enrolamento-da-folha-da-batata) e o *Tomato bushy stunt virus* - TBSV (enfazamento-do-tomateiro).

5.0 –PADRONIZAÇÃO DAS INFORMAÇÕES DAS PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

Na área de fitopatologia, a validação de métodos de PCR em tempo-real vem aumentando significativamente em função da confiabilidade e alta sensibilidade desse tipo de método (CAMLOH *et al.*, 2008). Boa parte desse aumento pode ser explicado pela necessidade dos laboratórios de obter a acreditação de seus métodos de diagnóstico. A acreditação garante ao laboratório o reconhecimento formal de que seus padrões de qualidade, desempenho, capacidade técnica e competência atendem a padrões internacionais (ALEXANDER *et al.*, 2008). Segundo THRANNE e SCHEEL (2005), apesar de não ser obrigatória, a acreditação pode trazer diversos benefícios para laboratórios de diagnóstico fitossanitário, tais como: i) análises com alto padrão alta qualidade; ii) maior satisfação entre os analistas do laboratório já que a qualidade de seu trabalho técnico passa a ser mais reconhecida e valorizada; e iii) ser um diferencial competitivo para captação de novos clientes que exijam maior qualidade nos seus resultados.

A grande popularidade da qPCR tem provocado um aumento do número de publicações nas quais são reportados diversos tipos de reagentes, protocolos e descrições de métodos. Com isso, a probabilidade de ocorrência de publicações científicas com resultados inadequados ou conflitantes aumenta proporcionalmente (GARSON *et al.*, 2009).

A aparente simplicidade da tecnologia da qPCR pode justificar a falta de clareza e transparência observadas na literatura científica, já que poucas publicações têm reportado os detalhes de como os resultados informados foram

obtidos (DIE; RÓMAN, 2012). Diversos fatores podem afetar a especificidade e a eficiência da amplificação de DNA na reação de PCR. Por esse motivo, a otimização dos reagentes e do regime de ciclagem de temperatura da PCR necessitam ser ajustadas experimentalmente (HENSON; FRENCH, 1993).

Para exemplificar esse tipo de problema, BUSTIN *et al.* (2009) apontaram as principais deficiências técnicas verificadas em publicações envolvendo diagnósticos com qPCR, tais como: i) armazenamento e preparo inadequado de amostras, bem como a baixa qualidade dos ácidos nucleicos extraídos; ii) erros na escolha de primers de transcrição-reversa (RT), assim como de primers e sondas para a qPCR; e iii) análises estatísticas inadequadas que normalmente induzem a conclusões equivocadas. Os autores também enfatizaram que esses problemas podem ser exacerbados pela falta de informações que caracteriza a maioria dos estudos que utilizam qPCR, uma vez que muitas publicações não fornecem detalhes suficientes que permitam ao leitor avaliar criticamente a qualidade dos resultados apresentados ou repetir os experimentos. É bastante comum que nesses artigos sejam omitidas informações sobre origem e manuseio das amostras; integridade e qualidade do RNA; detalhes da transcrição-reversa; eficiência da PCR e os parâmetros utilizados nas análises.

Como outro exemplo desse tipo de problema, ALEMAYEHU *et al.* (2013) compararam sete métodos publicados de qPCR para detecção do agente causador da malária (*Plasmodium spp* ou *Plasmodium falciparum*) e constataram inconsistências no desempenho deles, concluindo que o uso de diretrizes que encorajem a adoção de melhores práticas laboratoriais permitirá que as interpretações dos resultados de qPCR sejam mais consistentes e menos ambíguas, facilitando a avaliação ou comparação dos ensaios reportados por diferentes autores e laboratórios.

Para tentar evitar que situações como essas continuem a ocorrer, BUSTIN *et al.* (2009) propuseram algumas diretrizes, que denominaram “Informações Mínimas para Publicação de Experimentos de PCR em Tempo-Real Quantitativa” (MIQE - *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*), para que autores, revisores e editores tivessem acesso a informações que garantissem a relevância, veracidade, repetibilidade e correta interpretação desses experimentos.

Primeiramente, BUSTIN *et al.* (2009) sugeriram uma padronização da terminologia utilizada na descrição dos experimentos que utilizem a PCR em tempo-real, propondo: i) o uso da sigla “qPCR” para descrever experimentos de PCR em tempo-real quantitativa e da sigla “RT-qPCR” para experimentos de transcriptase-reversa quantitativa, já que o uso da sigla “RT-PCR” para descrever experimentos de PCR em tempo-real estava sendo confundido com experimentos de PCR de transcriptase-reversa convencional; ii) que os genes utilizados na normalização da qPCR sejam chamados de “genes de referencia” (*reference genes*) e não “*housekeeping genes*”; iii) que as sondas TaqMan® fossem referenciadas como “sondas de hidrólise”; iv) que o termo “sonda FRET” (sonda de transferência de energia de ressonância por fluorescência) seja utilizado apenas para referenciar o mecanismo genérico de fluorescência no qual a emissão e a inibição dependem da interação entre elétrons de duas moléculas fluorescentes; v) que as sondas para os termocicladores LightCycler® (Roche Applied Science) sejam chamadas de “sondas de hibridização”; e v) que a sigla “Cq” (ciclo de quantificação) seja utilizada para definir o ciclo fraccional utilizado como referência na qPCR, já que diversos autores se referem a esse mesmo ciclo como Ct (*threshold cycle*), Cp (*crossing-point cycle*) e TOP (*take-off point*). Os autores justificam que esses termos foram definidos por fabricantes de termocicladores de qPCR apenas para diferenciação de seus produtos e não para fins de clareza ou precisão científica.

A Tabela 4 contém um resumo dos principais requisitos MIQE sugeridos para publicações científicas que envolvam o uso de qPCR.

Tabela 4: Lista de verificação do atendimento dos principais requisitos MIQE para autores, revisores e editores (adaptada de BUSTIN *et al.*, 2009)

Item a ser verificado	Importância
Dados do desenho experimental	
Definição dos grupos experimentais e de controle	Essencial
Número de amostras dentro de cada grupo	Essencial
Dados da amostra	
Descrição	Essencial
Volume ou massa das amostras processadas	Desejável
Forma de preparo das amostras	Essencial
Se congelada, informar de que forma e o tempo de congelamento	Essencial
Se alterada, com o que e em quanto tempo	Essencial
Condições e duração do armazenamento	Essencial
Dados da extração de ácidos nucleicos	
Procedimentos e equipamentos utilizados	Essencial
Nome do kit e detalhes das modificações efetuadas	Essencial
Detalhes de tratamentos com DNases ou RNases	Essencial
Verificação de contaminação (DNA ou RNA)	Essencial
Quantificação dos ácidos nucleicos	Essencial
Integridade do RNA (método e equipamento)	Essencial
RIN (Número de Integridade do RNA), RQI (Indicador de Qualidade do RNA) ou Cq dos transcritos 3' e 5'	Essencial
Teste de inibição (Cq, diluições, fortificação, outros)	
Dados da sequência-alvo da qPCR	
Símbolo do gene	Essencial
Número de acesso da sequência	Essencial
Tamanho do amplicon	Essencial
Tela da especificidade <i>in silico</i> (BLAST e outros)	Essencial
Localização de cada primer por exon ou intron (se aplicável)	Essencial
Variantes "splice" procuradas	Essencial
Dados dos oligonucleotídeos da qPCR	
Sequências dos primers	Essencial
Sequência da sonda	Desejável
Localização e identificação de modificações	Essencial
Protocolo da qPCR	
Descrição completa das condições de amplificação	Essencial
Volume de reação e quantidade de cDNA/DNA	Essencial
Concentração dos primers, sonda, Mg ⁺² e dNTPs	Essencial
Concentração e identificação da polimerase	Essencial
Identificação e marca do tampão ou kit utilizado	Essencial
Aditivos (SYBR Green I, DMSO, outros)	Essencial
Fabricante e número de catálogo da microplacas e tubos	Desejável
Parâmetros completos do termociclador	Essencial
Fabricante do termociclador	Essencial
Validação da qPCR	
Especificidade (gel, sequência, melt ou digestão)	Essencial
Para SYBR Green I, Cq do controle negativo (NTC)	Essencial
Curvas de calibração com coeficiente angular e intercepto no eixo y	Essencial
Eficiência da PCR calculada pelo coeficiente angular	Essencial
Coeficiente r ² da curva de calibração	Essencial
Faixa dinâmica linear	Essencial

Tabela 4: continuação

Varição do Cq no limite de detecção	Essencial
Evidência do limite de detecção	Essencial
Se multiplex, eficiência e limite de detecção de cada ensaio	Essencial
Análise de dados	
Software utilizado na análise da qPCR (fonte e versão)	Essencial
Método utilizado na determinação do Cq	Essencial
Disposição e identificação de outliers	Essencial
Resultados de controles negativos	Essencial
Justificativa do número e escolha dos genes de referência	Essencial
Descrição do método de normalização	Essencial
Número e estágio (transcrição reversa ou qPCR) das replicatas	Essencial
Repetitividade (variação intraensaio)	Essencial
Métodos estatísticos utilizados para avaliar os resultados	Essencial
Fonte e versão do programa estatístico	Essencial

Fonte: BUSTINet *et al.*, 2009.

A Tabela 5 relaciona os principais parâmetros a serem avaliados nos processos de validação de métodos de qPCR utilizando os requisitos MIQE.

Tabela 5: Parâmetros essenciais para validação de métodos de qPCR (BUSTIN *et al.*, 2009)

Parâmetros a serem verificados
Especificidade (gel, sequência, melt ou digestão)
Para SYBR Green I, Cq do controle negativo (NTC)
Curvas de calibração com coeficiente angular e intercepto no eixo y
Eficiência da PCR calculada pelo coeficiente angular
Coeficiente r^2 da curva de calibração
Faixa dinâmica linear
Varição do Cq no limite de detecção
Evidência do limite de detecção
Se multiplex, eficiência e limite de detecção de cada ensaio

6.0 - REFERÊNCIAS:

AGINDOTAN, B. O.; SHIEL, P. J.; BERGER, P. H. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan real-time RT-PCR. **Journal of virological methods**, v. 142, n. 1-2, p. 1, 2007.

ALEMAYEHU, Saba et al. Comparative evaluation of published real-time PCR assays for the detection of malaria following MIQE guidelines. **Malaria journal**, v. 12, n. 1, p. 277, 2013.

ALEXANDER, B. J. R. et al. New Zealand perspective on ISO 17025 accreditation of a plant diagnostic laboratory. **EPPO Bulletin**, v. 38, n. 2, p. 172-177, 2008.

AVROVA, Anna O. et al. Profiling and quantifying differential gene transcription in *Phytophthora infestans* prior to and during the early stages of potato infection. **Fungal Genetics and Biology**, v. 40, n. 1, p. 4-14, 2003.

BACH, H.-J. et al. A TaqMan-PCR protocol for quantification and differentiation of the phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subspecies. **Journal of microbiological methods**, v. 52, n. 1, p. 85-91, 2003.

BELLEMAIN, Eva et al. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. **Bmc Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 189, 2010.

BILODEAU G. J. Quantitative polymerase chain reaction for the detection of organisms in soil. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 6, n. 14, p.1-14, 2011.

BOLLMANN, Franziska et al. qRT-PCR: a method and its difficulties. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 385, n. 10, p. 949-951, 2012.

BOONHAM, Neil; TOMLINSON, Jenny; MUMFORD, Rick. Microarrays for Rapid Identification of Plant Viruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 45, p. 307-328, 2007.

BUSTIN, Stephen A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CABIATI, Manuela et al. Tissue-specific selection of stable reference genes for real-time PCR normalization in an obese rat model. **Journal of molecular endocrinology**, v. 48, n. 3, p. 251-260, 2012.

CAMLOH, Marjana et al. The flexible scope of accreditation in GMO testing and its applicability to plant pathogen diagnostics. **EPPO Bulletin**, v. 38, n. 2, p. 178-184, 2008.

CASHDOLLAR, Jennifer L. et al. Development and Evaluation of EPA Method 1615 for Detection of Enterovirus and Norovirus in Water. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 1, p. 215-223, 2013.

ČEPIN, Urška *et al.* A one-step reverse transcription real-time PCR assay for the detection and quantitation of Grapevine fanleaf virus. **Journal of virological methods**, v. 170, n. 1, p. 47-56, 2010.

CHEN, Yan; HU, Xiaoping. High-throughput detection of banana bunchy top virus in banana plants and aphids using real-time TaqMan® PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 193, n. 1, p. 177-183, 2013.

CODEX ALIMENTARIUS. **Guidelines on performance criteria and validation of methods for detection, identification and quantification of specific DNA sequences and specific proteins in foods** - CAC/GL 74-2010.

COOKE, D. E. L.; SCHENA, L.; CACCIOLA, S. O. Tools to detect, identify and monitor *Phytophthora* species in natural ecosystems. **Journal of Plant Pathology**, v. 89, n. 1, p. 13-28, 2007.

CULLEN, D. W. *et al.* Detection of *Colletotrichum coccodes* from soil and potato tubers by conventional and quantitative real-time PCR. **Plant Pathology**, v. 51, n. 3, p. 281-292, 2002.

DAI, Jin *et al.* Development of multiplex real - time PCR for simultaneous detection of three Potyviruses in tobacco plants. **Journal of applied microbiology**, v. 114, n. 2, p. 502-508, 2013.

DEAN, Ralph *et al.* The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular plant pathology**, v. 13, n. 4, p. 414-430, 2012.

DIE, Jose V.; ROMÁN, Belén. RNA quality assessment: a view from plant qPCR studies. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 17, p. 6069-6077, 2012.

FERGUSON, Bradley S. *et al.* Impact of reference gene selection for target gene normalization on experimental outcome using real-time qRT-PCR in adipocytes. **PloS one**, v. 5, n. 12, p. e15208, 2010.

FILION, M.; ST-ARNAUD, M.; JABAJI-HARE, S. H. Quantification of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* in mycorrhizal bean plants and surrounding mycorrhizosphere soil using real-time polymerase chain reaction and direct isolations on selective media. **Phytopathology**, v. 93, n. 2, p. 229-235, 2003a.

FILION, Martin; ST-ARNAUD, Marc; JABAJI-HARE, Suha H. Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 53, n. 1, p. 67-76, 2003b.

FREDERICK, Reid D. *et al.* Polymerase chain reaction assays for the detection and discrimination of the soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*. **Phytopathology**, v. 92, n. 2, p. 217-227, 2002.

GARSON, Jeremy A. *et al.* Unreliable real-time PCR analysis of human endogenous retrovirus-W (HERV-W) RNA expression and DNA copy number in multiple sclerosis. **AIDS research and human retroviruses**, v. 25, n. 3, p. 377-378, 2009.

GRISHAM, M. P.; PAN, Y.-B.; RICHARD JR, E. P. Early detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane leaves by real-time polymerase chain reaction. **Plant Disease**, v. 91, n. 4, p. 430-434, 2007.

GROVER, Veenita *et al.* Oligonucleotide-based microarray for detection of plant viruses employing sequence-independent amplification of targets. **Journal of virological methods**, v. 163, n. 1, p. 57-67, 2010.

GUAN, W. *et al.* A TaqMan-based real time PCR assay for specific detection and quantification of *Xylella fastidiosa* strains causing bacterial leaf scorch in oleander. **Journal of microbiological methods**, v. 92, n. 2, p. 108-112, 2013.

HENSON, J. M.; FRENCH, R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. **Annual review of phytopathology**, v. 31, p. 81, 1993.

HIGUCHI, Russell *et al.* Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Bio/technology**, v. 10, n. 4, p. 413-417, 1992.

HOLLAND, Pamela M. *et al.* Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 16, p. 7276-7280, 1991.

IKER, B. C. *et al.* Evaluation of commercial kits for the extraction and purification of viral nucleic acids from environmental and fecal samples. **Journal of virological methods**, v. 191, n. 1, p. 24-30, 2013.

IKNER, Luisa A.; GERBA, Charles P.; BRIGHT, Kelly R. Concentration and recovery of viruses from water: A comprehensive review. **Food and environmental virology**, v. 4, n. 2, p. 41-67, 2012.

JOSEFSEN, Mathilde H. *et al.* Diagnostic PCR: Comparative sensitivity of four probe chemistries. **Molecular and cellular probes**, v. 23, n. 3, p. 201-203, 2009.

JOSEFSEN, Mathilde H. *et al.* Instrumentation and Fluorescent Chemistries Used in qPCR. In: Fillion, Martin (Ed.). **Quantitative Real-time PCR in Applied Microbiology**. Norfolk: Caister Academic Press, p. 27-52, 2012.

KING, Andrew MQ *et al.* (Eds.). **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Vol. 9. San Diego, CA: Elsevier Academic, 2012, 1327 p.

KOCH, Walter H. Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 9, p. 749-761, 2004.

LAPIDOT, Moshe *et al.* Effect of host plant resistance to Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) on virus acquisition and transmission by its whitefly vector. **Phytopathology**, v. 91, n. 12, p. 1209-1213, 2001.

LEES, A. K. *et al.* Development of conventional and quantitative real-time PCR assays for the detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-3 in potato and soil. **Plant Pathology**, v. 51, n. 3, p. 293-302, 2002.

LI, Wenbin; HARTUNG, John S.; LEVY, Laurene. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, n. 1, p. 104-115, 2006.

LIMA, J. Albersio A. *et al.* Serology applied to plant virology. **Serological diagnosis of certain human, animal and plant diseases**. In: Rijeka Croácia: InTech, p. 71-94, 2012.

LIN, Liming *et al.* Development of a multiplex TaqMan real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of Asian prunus viruses, plum bark necrosis stem pitting associated virus, and peach latent mosaic viroid. **European Journal of Plant Pathology**, p. 1-8, 2013.

LIVAK, Kenneth J. *et al.* Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. **Genome Research**, v. 4, n. 6, p. 357-362, 1995.

LOCONSOLE, Giuliana; SAPONARI, Maria; SAVINO, Vito. Development of real-time PCR based assays for simultaneous and improved detection of citrus viruses. **European journal of plant pathology**, v. 128, n. 2, p. 251-259, 2010.

LÓPEZ-FABUEL, Irene *et al.* Real-time multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of the five main grapevine viruses. **Journal of virological methods**, 2012.

LÓPEZ, Maria M. *et al.* Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? **Current Issues in Molecular Biology**, v. 11, n. 1, p. 13-46, 2009.

MACKAY, Ian M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 3, p. 190-212, 2004.

MACKAY, Ian M. *et al.* Real-time PCR: history and fluorogenic chemistries. In: MACKAY, Ian Maxwell (Ed.). **Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization**. Norfolk, UK, Caister Academic Press, 2007, p. 1-39.

MANSFIELD, John *et al.* Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. **Molecular plant pathology**, v. 13, n. 6, p. 614-629, 2012.

MARTIN, Robert R.; JAMES, Delano; LÉVESQUE, C. André. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. **Annual Review of Phytopathology**, v. 38, n. 1, p. 207-239, 2000.

MAVRODIEVA, Vessela; LEVY, Laurene; GABRIEL, Dean W. Improved sampling methods for real-time polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. **Phytopathology**, v. 94, n. 1, p. 61-68, 2004.

MAYER, Zsuzsanna *et al.* Quantification of the copy number of *nor-1*, a gene of the aflatoxin biosynthetic pathway by real-time PCR, and its correlation to the cfu of *Aspergillus flavus* in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 2, p. 143-151, 2003.

MORTIMER-JONES, Sheila M. *et al.* A single tube, quantitative real-time RT-PCR assay that detects four potato viruses simultaneously. **Journal of virological methods**, v. 161, n. 2, p. 289-296, 2009.

MULLIS, Kary B. **Process for amplifying nucleic acid sequences**. U.S. Patent n. 4,683,202, 28 jul. 1987.

MUMFORD, Rick *et al.* Advances in molecular phytodiagnostics - new solutions for old problems. **European Journal of Plant Pathology**, v. 116, n. 1, p. 1-19, 2006.

MUMFORD, Rick *et al.* The reliable detection of Barley yellow and mild mosaic viruses using real-time PCR (TaqMan®). **Journal of virological methods**, v. 117, n. 2, p. 153-159, 2004.

NG, Terry Fei Fan *et al.* Exploring the Diversity of Plant DNA Viruses and Their Satellites Using Vector-Enabled Metagenomics on Whiteflies. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.

O'BRIEN, Philip A.; WILLIAMS, Nari; HARDY, Giles E. StJ. Detecting Phytophthora. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 169-181, 2009.

OKUBARA, Patricia A.; SCHROEDER, Kurtis L.; PAULITZ, Timothy C. Real-time polymerase chain reaction: applications to studies on soilborne pathogens. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 27, n. 3, p. 300-313, 2005.

OZAKMAN, M.; SCHAAD, N. W. A real-time BIO-PCR assay for detection of *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2, in asymptomatic potato tubers. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 25, n. 3, p. 232-239, 2003.

PALACIO-BIELSA, A.; CAMBRA, M. A.; LÓPEZ, M. M. PCR detection and identification of plant-pathogenic bacteria: updated review of protocols (1989-2007). **Journal of Plant Pathology**, v. 91, n. 2, p. 249-297, 2009.

POSTOLLEC, Florence *et al.* Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food microbiology**, v. 28, n. 5, p. 848-861, 2011.

PRICE, J. A. *et al.* Multiplex real-time RT-PCR for detection of Wheat streak mosaic virus and Triticum mosaic virus. **Journal of virological methods**, v. 165, n. 2, p. 198-201, 2010.

QI, Min; YANG, Yinong. Quantification of *Magnaporthe grisea* during infection of rice plants using real-time polymerase chain reaction and northern blot/phosphoimaging analyses. **Phytopathology**, v. 92, n. 8, p. 870-876, 2002.

REZENDE, Jorge A. M.; KITAJIMA, Elliot W. Vírus e Viróides. In: AMORIM, Lilian (Org.); REZENDE, Jorge A. M. (Org.); BERGAMIN FILHO, Armando (Org.) **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos**. 4. ed. v. 1, 2011, p. 227-254.

ROOSSINCK, Marilyn J. Plant virus metagenomics: Biodiversity and ecology. **Annual Review of Genetics**, v. 46, p. 359-369, 2011.

ROOSSINCK, Marilyn J. The big unknown: plant virus biodiversity. **Current Opinion in Virology**, v. 1, n. 1, p. 63-67, 2011.

SALM, H.; GEIDER, K. Real-time PCR for detection and quantification of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fireblight. **Plant Pathology**, v. 53, n. 5, p. 602-610, 2004.

SAYLER, Ronald J.; CARTWRIGHT, Richard D.; YANG, Yinong. Genetic characterization and real-time PCR detection of *Burkholderia glumae*, a newly emerging bacterial pathogen of rice in the United States. **Plant Disease**, v. 90, n. 5, p. 603-610, 2006.

SCHAAD, N. W.; BERTHIER-SCHAAD, Y.; KNORR, D. A high throughput membrane BIO-PCR technique for ultra-sensitive detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. **Plant pathology**, v. 56, n. 1, p. 1-8, 2007.

SCHAAD, Norman W. *et al.* Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. **Plant Disease**, v. 83, n. 12, p. 1095-1100, 1999.

SCHAAD, Norman W.; FREDERICK, Reid D. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 24, n. 3, p. 250-258, 2002.

SCHENA, Leonardo *et al.* Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. **European journal of plant pathology**, v. 110, n. 9, p. 893-908, 2004.

SCHNERR, Helge; NIESSEN, Ludwig; VOGEL, Rudi F. Real time detection of the *trf5* gene in *Fusarium* species by LightCycler®-PCR using SYBR® Green I for continuous fluorescence monitoring. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 53-61, 2001.

SCHOCH, Conrad L. *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.

SCHOLTHOF, KAREN-BETH G. *et al.* Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. **Molecular plant pathology**, v. 12, n. 9, p. 938-954, 2011.

TAYLOR, John W. One fungus = one name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. **IMA Fungus: The Global Mycological Journal**, v. 2, n. 2, p. 113, 2011.

THRANE, C.; SCHEEL, C. Organization of quality assurance in diagnostics at the Danish NPPO. **EPPO Bulletin**, v. 35, n. 1, p. 113-115, 2005.

VINCELLI, Paul; TISSERAT, Ned. Nucleic acid-based pathogen detection in applied plant pathology. **Plant Disease**, v. 92, n. 5, p. 660-669, 2008.

WARD, Elaine *et al.* Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid - based approaches. **Annals of Applied Biology**, v. 145, n. 1, p. 1-16, 2004.

WEISS, Johanna; THEILE, Dirk; HAEFELI, Walter Emil. Rifampicin alters the expression of reference genes used to normalize real-time quantitative RT-PCR data. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 385, n. 10, p. 1025-1034, 2012.

WELLER, S. A.; STEAD, D. E. Detection of root mat associated *Agrobacterium* strains from plant material and other sample types by post-enrichment TaqMan PCR. **Journal of applied microbiology**, v. 92, n. 1, p. 118-126, 2002.

WENGENACK, Nancy L.; BINNICKER, Matthew J. Fungal molecular diagnostics. **Clinics in chest medicine**, v. 30, n. 2, p. 391-408, 2009.

WINGFIELD, Michael J. *et al.* One fungus, one name promotes progressive plant pathology. **Molecular plant pathology**, v. 13, n. 6, p. 604-613, 2012.

WITTEWER, Carl T. *et al.* Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. **Biotechniques**, v. 22, n. 1, p. 130-139, 1997.

WREN, Jonathan D. *et al.* Plant virus biodiversity and ecology. **PLoS biology**, v. 4, n. 3, p. e80, 2006.

ZHAO, Zhe *et al.* A duplex, SYBR Green I-based RT-qPCR assay for the simultaneous detection of Apple chlorotic leaf spot virus and Cherry green ring mottle virus in peach. **Virology journal**, v. 10, n. 1, p. 1-7, 2013.

CAPÍTULO 3

REGULAÇÃO DA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO BASEADOS EM PCR EM TEMPO-REAL NO BRASIL E NO MUNDO

1.0 - INTRODUÇÃO

A validação de métodos de ensaio costuma ser um dos maiores desafios a serem enfrentados por laboratórios durante a implantação de sistemas de gestão da qualidade baseados na norma ISO/IEC 17025. Validação é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (ABNT, 2005). Consiste na realização de um estudo experimental e documentado para demonstrar que o procedimento analítico avaliado é adequado à finalidade proposta, de forma a assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos (BRASIL, 2011a). O principal objetivo de uma validação é avaliar a adequação dos métodos, a capacidade técnica do laboratório e a qualidade dos analistas (RAMBLA-ALEGRE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2012). A validação representa o primeiro nível de garantia da qualidade de um laboratório (TAVERNIERS; DE LOOSE; VAN BOCKSTAELE, 2004).

A validação e o desenvolvimento de métodos analíticos são processos intimamente ligados uma vez que em ambos são realizadas verificações de parâmetros de desempenho. A validação deve ser aplicada a um protocolo definido para determinação de um analito específico, em um tipo específico de amostra, dentro de uma faixa definida de concentrações e para um uso específico (RAMBLA-ALEGRE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2012).

A validação de métodos analíticos pode ser executada por meio de estudos inter ou intralaboratoriais. Nos estudos interlaboratoriais ou colaborativos, a avaliação das características do método é realizada por meio da avaliação de desempenho de um ensaio interlaboratorial, com um número mínimo e pré-definido de laboratórios (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Trata-se de um estudo complexo, dispendioso e nem sempre prático ou necessário. Protocolos internacionalmente aceitos já foram estabelecidos pela IUPAC (HORWITZ, 1995) e pela ISO (1994) para orientar estudos de validação completa de métodos (ENGL,

2008). Os procedimentos e o escopo das validações não são sempre os mesmos e, por isso, devem ser estabelecidos caso a caso (RAMBLA-ALEGRE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2012). A Figura 05 apresenta um fluxograma geral para validação de métodos analíticos.

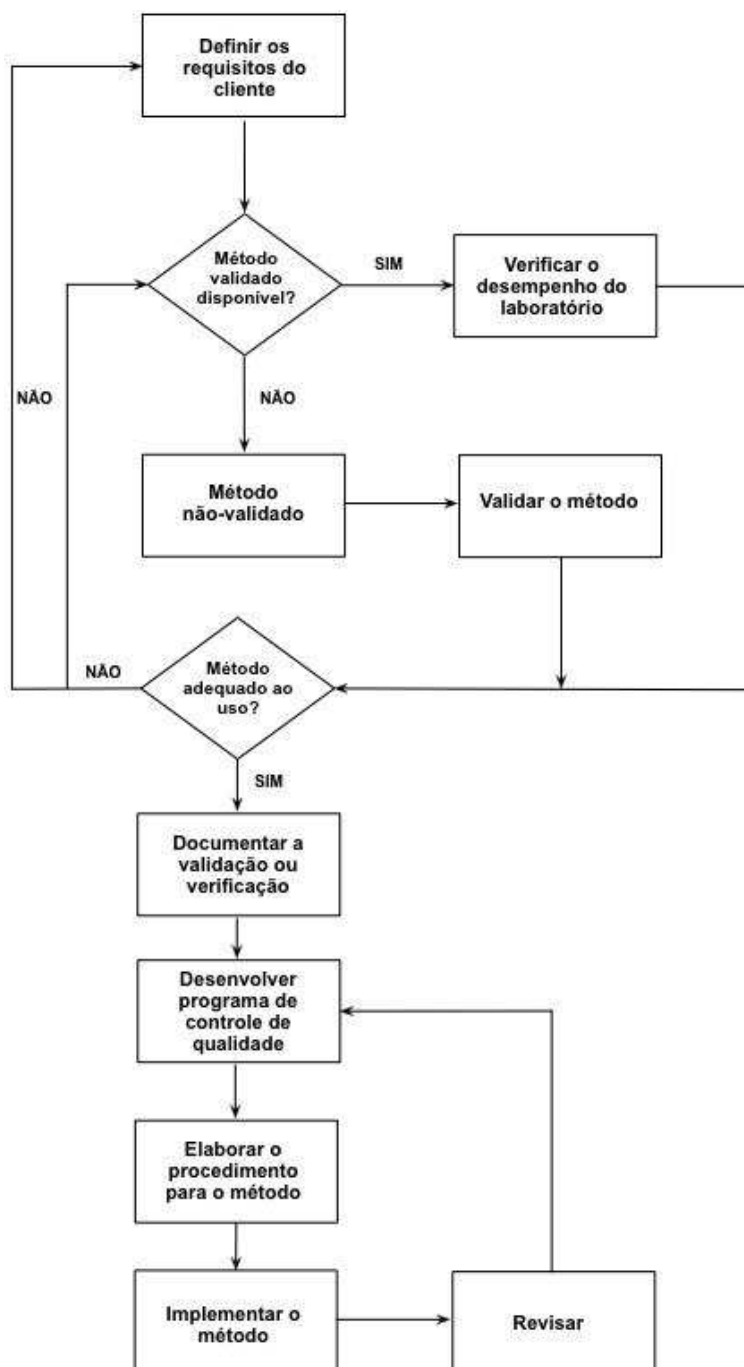


Figura 05: Processos gerais de validação de métodos para laboratórios de análises químicas e biológicas. Fonte:IANZ, 2011.

Segundo SOUZA (2007), frente aos fatores limitantes das validações por estudos colaborativos, procedimentos de validação intralaboratoriais (*single-laboratory* ou *in-house validation*) têm sido considerados apropriados quando se deseja avaliar parâmetros de desempenho de um método antes de formalizar a participação em processos interlaboratoriais, os quais envolvem um alto custo. Nesse mesmo estudo, a autora também ressalta a importância do uso dos estudos de validação intralaboratorial como forma de demonstrar a capacidade do laboratório em aplicar adequadamente o método a ser implantado, mesmo quando esse método já tiver sido objeto de um estudo colaborativo. Convém destacar, ainda, que além da validação de métodos, laboratórios também podem garantir a sua qualidade analítica através do uso de controles positivos, controles negativos, materiais de referência certificados, cartas de controle, participação em ensaios de proficiência e pela própria acreditação de seus métodos.

Especificamente para laboratórios de diagnóstico fitossanitário, a validação vem se mostrando como um dos principais entraves à adoção da ISO/IEC 17025. Primeiro, porque essa norma ISO foi elaborada com foco em laboratórios de calibração e de ensaios físico-químicos, não sendo perfeitamente adequada para laboratórios que realizam análises microbiológicas ou de biologia molecular. Segundo, porque peculiaridades existentes nas análises de diagnóstico fitossanitário dificultam sobremaneira o processo de validação, dentre elas destacam-se: i) dificuldade de se obter controles positivos de pragas quarentenárias A1 (ainda ausentes do país); ii) carência de protocolos de validação adequados para a diagnose de patógenos de plantas; iii) carência de ensaios de proficiência para todos os fitopatógenos de interesse e iv) grande diversidade de patógenos requerendo procedimentos de análise diferentes.

Apesar dessas inadequações, agências de defesa sanitária vegetal da União Europeia e demais mercados agrícolas - cientes da importância da harmonização internacional da análise de produtos vegetais nas fronteiras - consideram a validação e a acreditação de métodos de diagnóstico fitossanitário como ferramentas efetivas para aumentar a confiança das diagnoses e, conseqüentemente, a qualidade dos produtos agrícolas comercializados (THRANE, 2008).

Dentro desse contexto e considerando, ainda, que qualquer resultado analítico está sujeito a erros e que esses erros podem induzir a tomadas de decisão equivocadas, é extremamente recomendável que laboratórios de diagnóstico fitossanitário implantem mecanismos para garantir a qualidade analítica dos seus métodos. Essa preocupação já pode ser constatada em diversas normas e regulamentos internacionais que vêm exigindo o uso de métodos de análise confiáveis em todas as áreas analíticas, o que tem feito a validação receber considerável atenção dos comitês da área industrial e de agências reguladoras (RAMBLA-ALEGRE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2012).

Diante da grande demanda por métodos rápidos e confiáveis para realização de diagnósticos, as técnicas de biologia molecular passaram a ser vistas como uma excelente opção para laboratórios de diagnóstico fitossanitário já que métodos baseados em DNA podem aumentar sensivelmente a rapidez, sensibilidade e precisão da identificação de fitopatógenos (LUCAS, 2011). Outra vantagem do uso de métodos moleculares em diagnósticos fitossanitários é o fato de poderem ser padronizados e a sua correta execução ser facilmente verificada, o que simplifica o processo de acreditação em relação ao processo de acreditação de métodos morfológicos clássicos (THRANE, 2008). Além disso, métodos moleculares são geralmente mais específicos, sensíveis e rápidos do que métodos microbiológicos convencionais, muito embora métodos clássicos que utilizam técnicas culturais, bioquímicas e citológicas ainda sejam mais comumente utilizados.

Nesse sentido, ferramentas moleculares baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) tornaram-se nos últimos anos uma alternativa bastante adotada por agências de controle de alimentos (IWOBI; HUBER; BUSCH, 2012). Essa adoção tem ocorrido, principalmente, porque o DNA de alimentos e de ingredientes altamente processados ainda consegue ser adequadamente amplificado em análises de PCR ao contrário do que ocorre em análises de alimentos baseadas apenas na identificação de proteínas.

Para DE FREITAS, DE LEMOS e MARIN (2006), a utilização de métodos moleculares para detecção de microrganismos patogênicos deve estar atrelada à padronização de protocolos e à validação internacional. Este processo deve contemplar várias fases de comparações experimentais, além da elaboração de guias. Isso se faz necessário porque procedimentos de validação estruturados de

forma inadequada podem gerar uma avaliação equivocada sobre a adequação do propósito de uso de um determinado método, com impactos negativos sobre a confiabilidade de resultados que subsidiam decisões na área de saúde pública (BERNARDES; SOUZA, 2011).

2.0 - REGULAÇÃO DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE PCR NO BRASIL

No Brasil, ainda não há regulação ou orientações específicas para validação de métodos de diagnóstico baseados em PCR ou qPCR. Até a presente data, os principais documentos oficiais brasileiros estão relacionados à validação de métodos na área de saúde e de alimentos, sendo eles: i) a RDC nº 27/2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos (BRASIL, 2012); ii) o documento orientativo do INMETRO “Orientação sobre validação de métodos analíticos - DOQ-CGCRE-008 rev. 04”, que tem por objetivo auxiliar os laboratórios na tarefa de demonstrar que o método analítico a ser validado apresenta as características necessárias para a obtenção de resultados confiáveis (BRASIL, 2011c); iii) o “Manual de Garantia da Qualidade Analítica” publicado pelo MAPA para orientar a validação de métodos físico-químicos utilizados pelos laboratórios da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários que realizam análises na área de resíduos e contaminantes em alimentos (BRASIL, 2011a); e iv) o “Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica” do MAPA para métodos de análise de fármacos em produtos para alimentação animal e medicamentos veterinários (BRASIL, 2011b).

O Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA (BRASIL, 2011a), elaborado pela área de resíduos e contaminantes da Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial (CGAL), reúne em um único documento didático e elucidativo, a bibliografia mais atual referente à validação de métodos utilizados na área de resíduos e contaminantes de alimentos, resultando em um guia de referência de alto nível que aponta as tendências e vanguardas em relação ao controle analítico de perigos químicos. Esse manual, dentre outros assuntos, trata de aspectos específicos da validação de procedimentos analíticos para diferentes categorias de resíduos de medicamentos veterinários, agrotóxicos, contaminantes inorgânicos e micotoxinas em alimentos.

O Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica do MAPA (BRASIL, 2011b) estabelece os parâmetros de desempenho e os requisitos de aceitação mínimos que devem ser atendidos para que um determinado procedimento analítico seja considerado validado pelo MAPA. Nesse documento, também são apresentados procedimentos mínimos de controle da qualidade que devem ser observados durante a rotina analítica. Desenvolvido para ser utilizado como uma referência normativa sucinta e prática, esse guia é direcionado à validação de procedimentos analíticos destinados ao controle de qualidade de medicamentos veterinários, controle de qualidade de fármacos em produtos para alimentação animal (utilizados como veículo na administração de medicamentos) e para a determinação de fármacos como contaminantes em rações.

A tabela 06 apresenta uma comparação entre os parâmetros de desempenho a serem verificados na validação de métodos analíticos dos documentos oficiais brasileiros na área de alimentos e de saúde.

Tabela 06: Equivalência entre os parâmetros de desempenho exigidos no Brasil para validação de métodos analíticos de acordo com as orientações do MAPA, ANVISA e INMETRO.

Manual de garantia da qualidade analítica do MAPA (BRASIL, 2011a)	Guia de validação e controle de qualidade analítica do MAPA (BRASIL, 2011b)	RDC nº 27/2012 da ANVISA (BRASIL, 2012)	DOQ-CGCRE-008 rev. 04 do INMETRO (BRASIL, 2011c)
Seletividade	Seletividade	Seletividade	Seletividade
Efeito matriz	Efeito matriz	Efeito matriz	Seletividade
Linearidade	Linearidade	Curva de calibração	Linearidade, Faixa de trabalho ou Faixa linear
Estabilidade	Estabilidade	Estabilidade do analito em matriz biológica	-
Recuperação / Veracidade	Recuperação / Veracidade	Exatidão	Tendência / Recuperação
Repetibilidade	Repetibilidade	Precisão	Repetibilidade, Precisão intermediária
Reprodutibilidade	Precisão intermediária	-	Reprodutibilidade
Limite de detecção ou Limite de decisão (CC α)	Limite de detecção	-	Limite de detecção (LD)
Limite de quantificação (LQ) ou Capacidade de detecção (CC β)	Limite de quantificação	Limite inferior de quantificação (LIQ)	Limite de quantificação (LQ)
Robustez	Robustez	-	Robustez
Incerteza de medição	Incerteza de medição	-	Incerteza de medição
Sensibilidade	Sensibilidade	-	Sensibilidade
-	-	Efeito residual	-

Como se pode depreender na leitura da Tabela 6, a terminologia utilizada nos guias para designar os parâmetros de validação não se encontra completamente harmonizada. Segundo RAMBLA-ALEGRE, ESTEVE-ROMERO e CARDA-BROCH (2012), esse é um dos principais fatores que dificultam o entendimento dos analistas sobre o processo de validação já que os termos técnicos utilizados variam entre os

diferentes setores de análise, tanto em termos de significado quanto na forma como eles são determinados.

Em decorrência disso, uma harmonização da terminologia utilizada nos guias de validação precisa ser implementada pelos órgãos oficiais brasileiros. Uma possível estratégia de ação poderia ser a adoção dos termos e definições existentes no Vocabulário Internacional de Metrologia - VIM (INMETRO, 2012), que além de ser um documento oficial que tem por objetivo uniformizar a terminologia metrológica utilizada no Brasil e Portugal, também é aceito internacionalmente. Outra ação alternativa poderia ser a publicação de um documento conjunto do MAPA, ANVISA e INMETRO que contivesse a terminologia e definições harmonizadas para estudos de validação e verificação de desempenho de métodos de análise na área de alimentos e de medicamentos.

3.0 - REGULAÇÃO DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS NO MUNDO

No plano internacional, diversas organizações e agências reguladoras estabeleceram critérios ou orientações para validação de métodos analíticos, dentre as quais se destacam: a *United States Food and Drug Administration* - FDA (FDA, 2011), a *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* - ICH (ICH, 1996), a *International Union of Pure and Applied Chemistry* - IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002), a *International Organization for Standardization* - ISO (ABNT, 2005) e a *United States Pharmacopeial Convention* - USP (RAMBLA-ALEGRE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2012).

A tabela 07 relaciona os parâmetros exigidos por essas organizações nas validações de métodos analíticos nas suas respectivas áreas.

Tabela 7: Parâmetros de validação de métodos exigidos pelo FDA, ICH, ISO 17025, IUPAC e USP (RAMBLA-ALEGRE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2012).

PARÂMETRO	ORGANIZAÇÃO
Especificidade	ICH, USP
Seletividade	FDA, ISO 17025, IUPAC
Exatidão	FDA, ICH, ISO 17025, USP
Precisão	USP, ICH, FDA, IUPAC
Repetibilidade	ICH, ISO 17025

Tabela 7: continuação

Precisão intermediária	ICH
Reprodutibilidade	ICH, definida como solidez na USP, ISO 17025 e FDA
Veracidade	IUPAC
Linearidade	ICH, ISO 17025, IUPAC, USP
Faixa	ICH, USP
Limite de detecção	FDA, ICH, ISO 17025, IUPAC, USP
Limite de quantificação	ICH, ISO 17025, IUPAC, USP
Robustez	FDA, incluída na ICH como atividade de desenvolvimento de método, ISO, USP
“Solidez” (ruggedness)	IUPAC, USP, definida na ICH como reprodutibilidade
Sensibilidade	FDA
Recuperação	FDA, IUPAC
Aplicabilidade	IUPAC
Incerteza de medição	IUPAC
Estabilidade	FDA

Legenda:

FDA: United States Food and Drug Administration

ICH: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

USP: United States Pharmacopeial Convention

Especificamente para métodos moleculares utilizados em análises de alimentos, o *Codex Alimentarius* elaborou um guia com critérios de desempenho e de validação de métodos para detecção, identificação e quantificação de sequências específicas de DNA e de proteínas (CODEX, 2010). Segundo MIAW (2013), considerando os parâmetros aplicados apenas na validação de métodos qualitativos, o documento do *Codex* trata somente de estudos da taxa de falsos-positivos (TFP), taxa de falsos-negativos (TFN), limite de detecção (LD) e robustez, não sendo abordados outros importantes parâmetros de desempenho, tais como: taxa de sensibilidade (TSB), taxa de seletividade (TST), taxa de confiabilidade (TCF), região de perda de confiabilidade (RPC), acordância (ACO) e concordância (CON), os quais são de extrema importância para a avaliação da adequação de métodos qualitativos aos seus respectivos propósitos de uso (GONDIM; JUNQUEIRA; SOUZA, 2011). Para validação de métodos quantitativo que utilizam a PCR em tempo-real (qPCR), o documento do *Codex Alimentarius* recomenda que a validação seja realizada em duas fases. A primeira consistindo em uma validação intralaboratorial (*in-house validation*) de todos os parâmetros (exceto a

reprodutibilidade) e a segunda compreendendo um estudo colaborativo, cujo principal resultado deve ser a avaliação da repetibilidade e da reprodutibilidade do método, juntamente com informações detalhadas sobre a transferência do protocolo analítico entre os laboratórios. O documento também recomenda incisivamente que, antes de se iniciar um estudo colaborativo em larga escala, o laboratório realize um estudo prévio de menor tamanho com o objetivo de testar a robustez do método e evitar gastos desnecessários com a organização de um estudo colaborativo mais completo. Assim, caso haja necessidade de melhorias no método ou na descrição do protocolo, o impacto seria bastante reduzido já que o fracasso de um estudo colaborativo em decorrência de ambiguidades na descrição dos protocolos é uma falha muito grave e dispendiosa. A segunda fase da validação deve ser compreendida pela realização de um estudo colaborativo com o objetivo de avaliar os parâmetros de repetibilidade e reprodutibilidade.

Os parâmetros recomendados no documento do *Codex Alimentarius* para validação quantitativa de métodos baseados em DNA são: escopo, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), veracidade, precisão, sensibilidade e robustez. Outros aspectos importantes destacados no documento do *Codex* são os critérios de aceitabilidade e de interpretação de resultados, além da questão das unidades em que os resultados serão expressos (CODEX, 2010). O documento também menciona outros parâmetros tais como: aplicabilidade, faixa dinâmica, desvio-padrão relativo de repetibilidade, desvio-padrão de reprodutibilidade e seletividade.

Outro guia internacional relacionado à validação de métodos baseados em PCR é o documento orientativo da Rede Europeia de Laboratórios de Análise de OGM (ENGL, 2008) que define requisitos mínimos de desempenho que devem ser verificados pelos laboratórios da ENGL nas avaliações e validações de métodos de detecção, identificação e quantificação de organismos geneticamente modificados (OGM). Assim como o documento do *Codex Alimentarius* (CODEX, 2010), o documento da ENGL também divide a avaliação dos métodos em duas fases. A primeira consiste na avaliação dos dados de desempenho enviados pelo laboratório como parte do dossiê oficial do método. A segunda compreende a avaliação do desempenho após uma validação completa do método por meio de um estudo colaborativo. A ENGL ainda define os critérios de aceitabilidade (*method acceptance*

criteria) que devem ser atendidos pelos métodos antes de serem submetidos a um processo de validação completa, são eles: i) aplicabilidade: é a descrição dos analitos, matrizes e concentrações nas quais o método pode ser utilizado, com observações sobre interferências conhecidas de outros analitos ou inadequações a outras matrizes e situações; ii) praticabilidade: consiste na avaliação da facilidade de execução, praticidade e eficiência de implementação do método, juntamente com a avaliação do seu custo por amostra. Essa avaliação deve considerar a necessidade ou não de aquisição de novos equipamentos, tempo de análise, volume de trabalho, uso de reagentes e demais custos envolvidos; iii) extração e purificação de DNA: devem garantir a obtenção de extratos de DNA com a qualidade adequada para a realização das análises de PCR subsequentes. Essa adequação da qualidade depende do tamanho médio dos fragmentos, da integridade estrutural e da pureza química do DNA extraído. Outro fator a ser avaliado é o efeito de matriz que pode ocorrer na reação de PCR devido à presença de impurezas co-extraídas das amostras. Por esse motivo, o documento da ENGL recomenda que as etapas críticas do processo de extração e de purificação de DNA devam ser informadas na documentação técnica, além da definição dos critérios de aceitabilidade do processo. Para avaliação dos protocolos de extração, o documento sugere que o DNA seja extraído em dias diferentes (ex.: 3 dias) com um número adequado de amostras (ex.: 6 por dia). No que tange à avaliação da qualidade deste DNA extraído, a recomendação do documento da ENGL é que a concentração de DNA seja maior do que a concentração descrita no método de análise. Por exemplo, se a indicação do método for de 40ng/μL, a concentração do DNA extraído deve ser maior do que esse valor. O estado de fragmentação do DNA também deve ser avaliado. Nas análises quantitativas (qPCR), é recomendável que o peso molecular do DNA extraído seja maior do que o tamanho dos amplicons da referência endógena e do evento-específico do OGM analisado. Já nas análises qualitativas (PCR), a presença de moléculas de DNA com peso molecular menor do que o tamanho dos amplicons é aceitável. Outro parâmetro crítico a ser avaliado é a pureza do DNA, que é representada pela ausência de inibidores da PCR nos extratos de DNA. O critério de aceitabilidade desse parâmetro é que a diferença (ΔCq) entre o valor do Cq medido e o valor do Cq da primeira amostra diluída no

teste de inibição seja inferior a 0,5 ciclo [$C_{q_{\text{medido}}} - C_{q_{\text{extrapolado}}} < 0,5$] e que o coeficiente angular (*slope*) da curva de inibição fique dentro da faixa de -3,6 a -3,1.

A ENGL também publicou diretrizes para verificação intralaboratorial (interna) de métodos de análise de OGM que já foram validados interlaboratorialmente (ENGL, 2011).

3.1 - REGULAÇÃO DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO NOS ESTADOS UNIDOS

Nos Estados Unidos (EUA), a agência federal responsável pela condução da defesa agropecuária é o APHIS (*Animal and Plant Health Inspection Service*). Dentre suas principais atividades na área vegetal estão a acreditação de laboratórios de diagnóstico fitossanitário e a fiscalização de programas de certificação vegetal. Na área laboratorial, o APHIS juntamente com outra agência federal, o NIFA (*National Institute of Food and Agriculture*), coordenam a NPDN (*National Plant Diagnostic Network*), que é uma rede composta por 60 laboratórios de diagnóstico fitossanitário distribuídos pelo território dos EUA. Criada em 2002 pelo *USDA Homeland Security Office* (Escritório de Segurança Nacional do Departamento de Agricultura dos EUA), a NPDN funciona como um intermediário entre laboratórios de diagnóstico fitossanitário de universidades públicas americanas com o objetivo de fortalecer a segurança agropecuária e proteger os recursos naturais dos EUA (NPDN, 2013).

A NPDN faz parte do Sistema Nacional de Biossegurança dos EUA e tem como missões: i) estabelecer um sistema nacional de comunicação entre laboratórios de diagnóstico fitossanitário; ii) melhorar a infraestrutura analítica dos laboratórios estaduais de diagnóstico fitossanitário; iii) oferecer treinamentos para detectores iniciais (*first detectors*) a fim de facilitar a identificação e possibilitar alertas precoces de epidemias; e iv) desenvolver competências na obtenção e análise de dados para a rápida identificação de epidemias (STACK *et al.*, 2006). Assim, para o devido cumprimento dessas atribuições, a NPDN colabora ativamente com extensionistas, Secretarias Estaduais de Agricultura e com o Serviço de Defesa Sanitária Vegetal e Quarentena do APHIS.

Do ponto de vista operacional, a NPDN é um grande consórcio composto por cinco outros consórcios regionais de laboratórios de diagnóstico fitossanitário. Dentro de cada consórcio regional, há um laboratório central que coordena a rede e

controla a comunicação entre os laboratórios de universidades públicas, laboratórios estaduais e o repositório para coleta e análise de dados da Universidade de Purdue (STACK *et al.*, 2006). Os laboratórios centrais da NPDN são: University of California em Davis (Rede da Região Oeste), Kansas State University (Rede da Região das Grandes Planícies), Michigan State University (Rede da Região Centro-Norte), Cornell University (Rede da Região Nordeste) e Florida State University (Rede da Região Sul) (NPDN, 2007).

No área de identificação de patógenos, o Serviço Nacional de Identificação (*National Identification Services - NIS*) apoia os programas regulatórios do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) por meio da colaboração com pesquisadores especialistas em diversos grupos de patógenos, incluindo plantas invasoras, insetos, ácaros, moluscos e patógenos de plantas (USDA, 2013). Esses especialistas encontram-se lotados em diversas instituições espalhadas pelos EUA incluindo laboratórios federais de pesquisa, estações de inspeção fitossanitária, universidades e museus de história natural. O NIS incentiva o uso de métodos alternativos para aumentar a velocidade e precisão do processo de identificação de fitopatógenos. O Programa de Identificação Remota de Pragas (*Remote Pest Identification Program*) utiliza a tecnologia digital para capturar imagens detalhadas de pragas suspeitas, que são transmitidas eletronicamente para que especialistas qualificados possam fazer uma correta identificação. O NIS também possui um laboratório de diagnóstico molecular que é responsável pelas análises de biologia molecular de suporte aos programas de controle de pragas do USDA.

No plano da regulação da validação de métodos de ensaio baseados em PCR nos EUA, a Agência de Proteção Ambiental (EPA) publicou em 2009 um documento com orientações sobre a validação de métodos microbiológicos, incluindo diretrizes específicas para o desenvolvimento e validação de métodos de PCR para análise de amostras ambientais (EPA, 2013). O documento da EPA considera que a execução dos métodos baseados em PCR podem ser divididos em 04 etapas: i) preparo de amostras; ii) amplificação dos ácidos nucleicos; iii) visualização dos resultados; e iv) interpretação dos dados obtidos. O documento da EPA recomenda que a escolha do método de análise seja baseada no uso pretendido, na forma de avaliação dos dados e no tipo de matriz das amostras a serem analisadas. Para o desenvolvimento e otimização dos métodos, o documento enfatiza a importância de se definir

corretamente a região genômica a ser utilizada para a detecção e identificação dos microrganismos a fim de garantir a maior especificidade possível no desenho dos primers e sondas empregados pelo método.

Outra agência federal dos EUA que também regulou a validação de métodos é a FDA (*United States Food and Drug Administration*), que é o órgão oficial responsável pela proteção e promoção da saúde pública no território americano. Em 2011, a FDA publicou diretrizes para padronização da validação de métodos de análise de patógenos microbianos, contaminantes químicos e radiológicos (FDA, 2011). O documento da FDA contemplou, dentre outras coisas, a validação de métodos de PCR e qPCR. Especificamente para a validação de métodos de qPCR, o documento da FDA enfatiza que a plataforma (termociclador ou estação de trabalho) e as substâncias químicas utilizadas no método devem ser devidamente especificadas, recomendando, ainda, que nos estudos de validação sejam utilizadas de duas a três plataformas diferentes. As diretrizes também definem quatro níveis de validação para ensaios de PCR qualitativos para identificação de bactérias. O primeiro nível corresponde aos estudos de sensibilidade (*inclusivity*) e de especificidade (*exclusivity*) do método por meio da verificação da homologia das sequências dos iniciadores e das sondas do método a ser validado nos bancos de dados genômicos disponíveis (ex. GenBank). O segundo e terceiro níveis consistem na demonstração experimental da especificidade do método para o patógeno a ser identificado. Controles positivos e negativos devem ser utilizados durante a avaliação do ensaio. Nos ensaios de qPCR, o uso de controles internos de amplificação é obrigatório para fiscalização de alimentos e de amostras ambientais. O quarto nível de validação consiste na comparação do método a ser validado com outro método de referência baseado em PCR. Caso não haja métodos de referência disponíveis, outros métodos bacteriológicos, bioquímicos ou sorológicos podem ser utilizados.

3.2 - REGULAÇÃO DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO NA AUSTRÁLIA E NOVA ZELÂNDIA

A Austrália possui um dos sistemas de defesa sanitária vegetal mais avançados do mundo. Esse alto padrão de qualidade fitossanitária pode ser explicado pelo fato de a Austrália ser um país rico e com economia fortemente

dependente de atividades agropecuárias e florestais. Além disso, o fato de ser um país insular e geograficamente isolado dificulta a entrada em seu território de diversos fitopatógenos já introduzidos em outros países, bem como a maior fragilidade de seus ecossistemas em relação aos ecossistemas continentais.

No sistema de defesa sanitária vegetal australiano, foi estabelecida uma parceria entre o governo e o setor industrial, denominada "*Plant Health Australia*", para coordenar ações do governo federal, governos estaduais e representantes da indústria no sentido de promover práticas de biossegurança que minimizem os impactos dos fitopatógenos no país, bem como aumentem o acesso dos produtos australianos aos mercados internacionais e contribuam para o avanço da indústria e sociedade (PHA, 2013). Nessa parceria, governo e indústria dividem responsabilidades e benefícios.

No campo do diagnóstico fitossanitário, uma das inovações do sistema australiano foi a criação de um banco de imagens de acesso livre, denominado PaDIL (*Pests and Diseases Image Library*), que funciona como uma coleção virtual de referência de fitopatógenos que pode ser utilizada para agilizar o processo de identificação de pragas e doenças nas situações de emergência (CRC, 2013). O uso de imagens diagnósticas, assim como o de nomes comuns e científicos, possibilita o acesso de um maior número de pessoas envolvidas no campo da defesa sanitária vegetal (produtores, importadores, exportadores, fiscais e pesquisadores), o que pode facilitar e agilizar a identificação de pragas e doenças. O PaDIL vem sendo bastante utilizado na Austrália e em cerca de 180 países ao redor do mundo, com mais de 500.000 visitantes no ano de 2012, dos quais 44% provenientes dos EUA (CRC, 2013). A Nova Zelândia também utiliza o sistema para interceptação de fitopatógenos em suas fronteiras.

A Austrália também implementou uma iniciativa denominada "Estratégia Nacional de Biossegurança Vegetal" (*National Plant Biosecurity Strategy* - NPBN) que é um plano com duração de 10 anos que tem por objetivo orientar ações conjuntas do governo, indústria e comunidade para o fortalecimento da biossegurança vegetal australiana (NPBN, 2013). Esse plano é composto de 10 estratégias, sendo elas: 1) adoção de uma legislação de biossegurança vegetal que seja nacionalmente consistente; 2) estabelecimento de um sistema nacionalmente coordenado de vigilância sanitária vegetal; 3) melhoria da capacidade da Austrália

em responder a introduções de novos fitopatógenos; 4) aumento da capacitação em biossegurança na Austrália; 5) criação de uma rede nacionalmente integrada de diagnóstico fitossanitário; 6) melhoria dos sistemas nacionais de manejo de pragas estabelecidas; 7) estabelecimento de uma abordagem nacional integrada para educação e conscientização em biossegurança; 8) desenvolvimento de um arcabouço nacional para a pesquisa em biossegurança; 9) adoção de sistemas e mecanismos para divulgação eficiente e efetiva das informações de biossegurança; e 10) monitoramento da integridade do sistema de biossegurança.

No plano da regulação da validação de métodos analíticos, a Austrália possui a NATA - *National Association of Testing Authorities*, cuja principal função é garantir que os laboratórios associados utilizem adequadamente padrões internacionais e padrões australianos a fim de fornecer ao governo, indústria e sociedade resultados mais confiáveis de suas análises, calibrações, medições e fiscalizações (NATA, 2013a).

As diretrizes elaboradas pela NATA para estudos de validação e verificação de desempenho de métodos é a “*Technical Note 17 - Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods*” (NATA, 2013c). Trata-se de um documento orientativo de caráter geral que enfatiza a importância da validação e da verificação de desempenho como formas de gerar evidências objetivas de que os métodos são confiáveis e adequados aos propósitos pretendidos. Essa nota técnica também descreve os aspectos que devem ser considerados tanto na validação quanto na verificação de métodos, podendo ser aplicada em diversos campos de análises. Esse documento da NATA define que tanto para métodos oficiais quanto para métodos que já tenham sido objeto de validação por um estudo colaborativo e para métodos publicados em literatura científica com os respectivos dados de desempenho, o laboratório precisa apenas verificar o desempenho dos métodos nas condições operacionais do laboratório (analistas, equipamentos, reagentes, etc.) a fim de fornecer evidências objetivas de que os métodos atendem aos requisitos estabelecidos. Nos estudos de verificação, o desempenho dos métodos pode ser evidenciado pelas seguintes práticas: i) uso de controles negativos para avaliação de contaminações; ii) uso de controles positivos para demonstração da exatidão de medição; iii) uso de duplicatas para demonstrar a precisão do método; iv) uso periódico de padrões de calibração nas bateladas de análises quantitativas; v) uso

de cartas-controle; e vi) participação em ensaios de proficiência com amostras representativas dos analitos, matrizes e concentrações analisadas.

O documento orientativo da NATA (2013c) divide os estudos de validação em dois tipos básicos: i) validação comparativa: geralmente aplicada a métodos bioanalíticos com o objetivo de demonstrar a equivalência de desempenho entre dois (ou mais) métodos por meio da comparação de parâmetros de validação. Esse tipo de validação pode ser utilizado na comparação dos dados gerados por diferentes técnicas analíticas (ex.: LC-MS-MS x ELISA); e ii) validação primária: geralmente utilizada em situações em que a validação comparativa não é aplicável, como por exemplo, em métodos validados intralaboratorialmente, métodos-padrão que tenham sido modificados de tal forma que os resultados finais possam ser alterados, métodos-padrão utilizados fora do escopo original, dentre outros. O objetivo da validação primária é estabelecer os limites operacionais e as características de desempenho de um método alternativo, novo ou inadequadamente caracterizado. O documento recomenda, ainda, que os estudos de validação primária sejam conduzidos com no mínimo 07 replicatas por nível de concentração e por tipo de matriz.

No que tange ao desempenho dos métodos, o documento da NATA define os seguintes parâmetros: i) linearidade de calibração: é avaliação da capacidade do método em emitir respostas diretamente proporcionais à concentração de um determinado analito. É recomendado que sejam utilizados no mínimo 06 pontos de calibração, igualmente espaçados, dentro da faixa de concentração de interesse e analisados em duplicata; ii) intervalo de medição: é definido como a faixa entre a maior e a menor concentrações do analito para as quais foi demonstrado que o método apresenta níveis adequados de precisão, exatidão e linearidade; iii) efeito de matriz: deve ser avaliado sempre que o analito de interesse estiver contido em matrizes complexas. A determinação desse efeito nas respostas de equipamentos de medição pode ser determinada pela comparação dos coeficientes angulares (*slopes*) das curvas de calibração do analito, com e sem a matriz. Se a diferença entre esses *slopes* for menor do que 10%, é possível desprezar o efeito de matriz; iii) seletividade: é a capacidade de um método medir exatamente um analito na presença de outros interferentes. Os termos seletividade e especificidade costumam ser confundidos. O termo “específico”, geralmente, refere-se a um método que

responde a somente um único analito, enquanto que o termo “seletivo” refere-se a um método que pode identificar um determinado analito mesmo na presença de outros de natureza semelhante. Como poucos métodos respondem apenas a um analito, o uso do termo seletividade é mais apropriado do que o uso do termo especificidade.

Especificamente para métodos biológicos, a NATA publicou outro documento orientativo denominado “*Biological Testing ISO/IEC 17025 Application Document*” (NATA, 2013b) que apresenta critérios interpretativos e recomendações para aplicação dos requisitos técnicos da norma ISO/IEC 17025 em laboratórios que realizam análises biológicas. No que tange à validação, o documento recomenda que todos os métodos não-normalizados ou que não tenham sido validados por pares (*peer reviewed*) devam ser validados antes do uso. O documento também afirma que não é possível estabelecer requisitos mínimos ou ótimos que sejam adequados a todos os tipos de análises biológicas uma vez que os estudos de validação podem variar conforme o propósito, escopo e aplicação dos métodos. O documento também divide a validação em estudos comparativos e estudos primários, recomendando que o relatório final de um estudo ou validação comparativa contenha os seguintes dados: a) fundamentação detalhada e razões pelas quais esse estudo de validação se fez necessário; b) o motivo da escolha desse método em detrimento de outros; c) declaração sobre as implicações dos resultados analíticos, incluindo uma avaliação de risco; d) descrição do organismo-alvo; e) descrição das matrizes e das características que as definem; f) indicação do método não-padronizado (ex.: publicação científica, instruções do fabricante ou desvio de um método publicado); g) descrição precisa do método de referência; h) detalhamento das etapas de comparação do método (ex.: somente comparação, método qualitativo ou método quantitativo); i) explicação sobre a definição do tipo e do número de amostras utilizadas no estudo; j) declaração se foram utilizadas duplicatas nas análises quantitativas; k) quando realizada, uma especificação do protocolo de inoculação, incluindo o nível de inóculo, organismos utilizados e justificativa; l) dados brutos e dos controles de qualidade das amostras a fim de permitir uma revisão independente das análises e cálculos realizados; m) informação da data inicial e final dos testes; n) para ensaios quantitativos, avaliação dos resultados com o teste-t ou outro mais apropriado; o) para ensaios qualitativos,

avaliação das características operacionais do método (sensibilidade, especificidade, falsos-positivos e falsos-negativos); p) discussão dos resultados baseada nas análises estatísticas e nos critérios de aceitabilidade pré-definidos; q) conclusões dos estudos com base na análise dos dados, discussão e uma declaração indicando se os objetivos do estudo foram atingidos e se o método é adequado ao uso.

Outro importante parâmetro destacado nesse documento da NATA é a estimativa da incerteza de medição dos ensaios quantitativos. Trata-se de um parâmetro associado ao resultado da medição que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mensurando. Nos ensaios qualitativos, não é necessário estimar essa incerteza, porém é importante que o laboratório conheça as fontes que podem contribuir para a variabilidade dos resultados.

Na Nova Zelândia, a agência responsável pelo sistema de biossegurança do país é a Biosecurity New Zealand (BNZ), que é uma divisão do Ministério da Indústrias Primárias criada para facilitar o comércio internacional dos produtos neozelandeses, proteger a saúde da população, proteger o meio ambiente, flora, fauna, vida marinha e os recursos da população maori (BNZ, 2013). A partir de 2003, essa agência tornou obrigatória para os laboratórios prestadores de serviço a implantação de sistemas de gestão da qualidade baseados na norma ISO/IEC 17025. Essa iniciativa resultou na acreditação de 04 laboratórios de diagnóstico fitossanitário no período compreendido entre 2001 e 2008 (ALEXANDER *et al.*, 2008). Um desses laboratórios acreditados foi o *Plant Health and Environment Laboratory* (PHEL) com o escopo de métodos de detecção por RT-PCR ou PCR dos vírus *Potato spindle tuber viroid*, *Plum pox virus*, *Raspberry ringspot virus*, *Iris yellow spot virus*, *Pepino mosaic virus*, *High plains virus* e grupo *Carlavirus* em plantas e materiais vegetais (ALEXANDER *et al.*, 2008). Os mesmos autores também destacaram a dificuldade que o PHEL teve em ampliar o escopo de métodos acreditados em virtude do tempo e dos recursos necessários para os estudos de validação. O artigo sugere, ainda, que uma possível solução para essa limitação seria o órgão de acreditação neozelandês (IANZ) passar a aceitar o conceito de escopo flexível. Esse tipo de acreditação foi obtida para métodos de diagnóstico fitossanitário por qPCR pelo *Food and Environmental Research Agency* (FERA) do Reino Unido (WEEKES, 2007). Esse processo permite ao laboratório adicionar

ensaios ao escopo acreditado sem anuência prévia do órgão acreditador. Um aspecto-chave desse tipo de validação é tomada de decisão para ampliação do escopo já que esse processo depende fortemente da experiência e competência dos técnicos envolvidos. A figura 06 apresenta a etapas envolvidas nesse processo para métodos de qPCR.

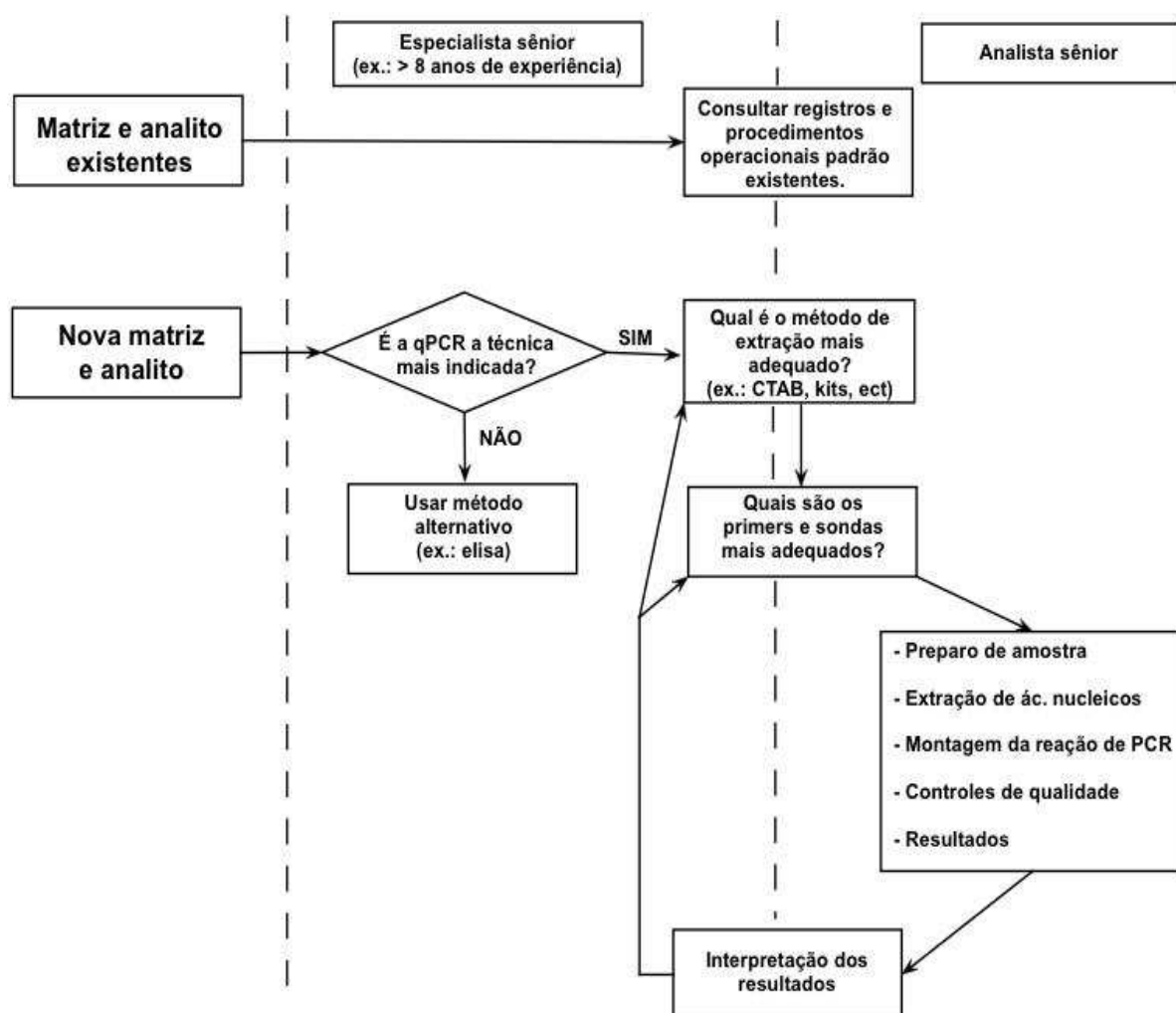


Figura 06: Fluxograma de tomada de decisão de laboratórios com escopos flexíveis de qPCR. Fonte: WEEKES, 2007.

O órgão responsável pelo processo de acreditação na Nova Zelândia é a agência denominada IANZ (*International Accreditation New Zealand*), que é uma entidade autônoma ligada à coroa britânica e signatária plena da ILAC (International Laboratory Accreditation Cooperation) que regula, dentre outras coisas, a validação de métodos para fins de acreditação de laboratórios. Para a área biológica, a IANZ publicou o documento orientativo denominado “*Specific criteria for accreditation: Biological Testing 1 - Fourth edition*” (IANZ, 2011) que define os requisitos

específicos que os laboratórios precisam atender - além dos estabelecidos pela ISO/IEC 17025 - para serem acreditados pela IANZ. Como a maioria dos laboratórios dessa área estão primariamente envolvidos em análises bacteriológicas, esse documento orientativo tende a ser mais adequado a esse tipo de laboratório.

3.3 - REGULAÇÃO DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO NA UNIÃO EUROPEIA

A agência responsável pela defesa sanitária vegetal na União Europeia é a EPPO (*European and Mediterranean Plant Protection Organization*), que é uma organização intergovernamental que coordena a proteção de plantas na Europa e na região do Mediterrâneo. Fundada em 1951 com apenas 15 membros, hoje conta com mais de 50 países-membros (EPPO, 2013). Dentre os objetivos da EPPO destacam-se: i) a proteção vegetal na agricultura, florestas e meio ambiente não cultivado; ii) o desenvolvimento de estratégias contra a introdução e disseminação de pragas (incluindo plantas invasoras) que possam ameaçar plantas nativas e cultivadas em ecossistemas agrícolas e naturais; iii) o estímulo à harmonização de regulamentos fitossanitários e de outras áreas de ação da defesa sanitária vegetal oficial; iv) a promoção do uso de métodos modernos, seguros e efetivos de controle de pragas; v) a disponibilização da documentação necessária para o serviço de proteção de plantas. Convém ressaltar que a União Europeia é a única federação de países no mundo que elaborou diretrizes que incluem recomendações específicas para validação de métodos de diagnóstico fitossanitário.

Em 2007, a EPPO estabeleceu alguns requisitos básicos a serem atendidos por laboratórios de diagnóstico fitossanitário dos países membros que desejassem implantar sistemas de gestão da qualidade baseados na norma ISO/IEC 17025 (EPPO, 2007). Dentre os vários requisitos apresentados, o documento estabelece que laboratórios de diagnóstico fitossanitário devem utilizar, preferencialmente, métodos publicados como padrões internacionais, regionais e nacionais ou, quando esses não existirem, métodos desenvolvidos ou adaptados pelos próprios laboratórios. No caso de uso de métodos padronizados, os laboratórios devem assegurar que estão utilizando as suas versões mais recentes. Sempre que necessário, os métodos devem ser complementados com informações adicionais que garantam a sua correta execução. Os laboratórios também devem verificar se

podem executar corretamente os métodos escolhidos, repetindo essa verificação sempre que houver mudanças nesses métodos. Outro aspecto importante ressaltado é que a garantia da qualidade do resultado analítico deve ser implementada tanto na execução de cada diagnóstico quanto no controle geral da qualidade do laboratório. Nesse contexto, o uso de controles positivos e negativos deve ser o nível mínimo de controle de qualidade. Adicionalmente, a EPPO recomenda a utilização diversos tipos de controles intralaboratoriais, tais como: materiais de referência, amostras artificialmente contaminadas, replicatas de amostras, comparação de resultados de diferentes analistas para a mesma amostra, comparação de diferentes métodos para diferentes características do fitopatógeno, re-teste de amostras, participação em ensaios interlaboratoriais e o uso de amostras cegas misturadas a amostras de rotina.

Em 2010, a EPPO publicou um segundo documento orientativo (EPPO, 2010) em que são fornecidos esclarecimentos importantes sobre o processo de validação de métodos de diagnóstico fitossanitário. Esse documento reforça a importância da adequação do método ao uso em análises de rotina e que os laboratórios devem adotar critérios mínimos de desempenho, tais como: sensibilidade, especificidade, repetibilidade, reprodutibilidade e, onde couber, seletividade. Quando não houver dados de desempenho, o laboratório deverá produzir os dados faltantes ou justificar porque não consegue produzi-los. Se os dados estiverem disponíveis, os laboratórios devem confrontar os seus resultados contra esses dados para avaliação do seu desempenho. A figura 07 contém um fluxograma geral do processo de validação proposto pela EPPO.

No documento orientativo publicado em 2010, dentre outras coisas, a EPPO define os requisitos para validação métodos de diagnóstico vegetal baseados em PCR e qPCR de acordo com cada grupo de fitopatógenos.

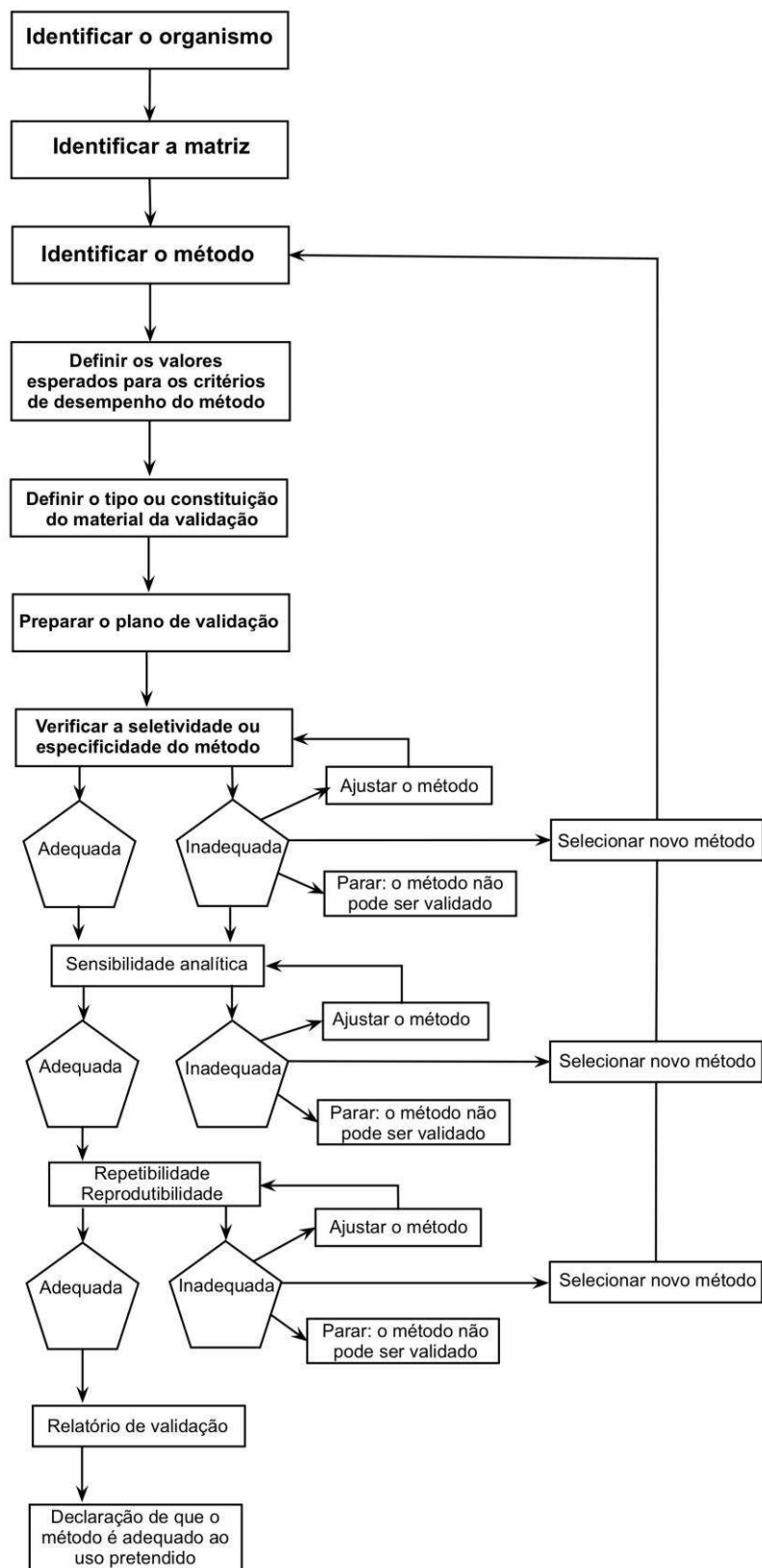


Figura 07: Fluxograma do processo de validação sugerido pela EPPO.
Fonte: Adaptado de EPPO (2010).

4.0 - REFERÊNCIAS

ALEXANDER, B. J. R. et al. New Zealand perspective on ISO 17025 accreditation of a plant diagnostic laboratory1. **EPPO Bulletin**, v. 38, n. 2, p. 172-177, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **NBR ISO/IEC 17025**: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005.

BERNARDES, Ana C. M.; SOUZA, Scheilla V. C. Análise comparativa do guia para validação de métodos analíticos proposto pela ANVISA (REN nº 899 de 2003) com o documento orientativo do INMETRO e o protocolo internacional harmonizado pela AOAC Intenacional, ISO e IUPAC. **Revista Analytica**, v. 51, p. 66-77, 2011.

BIOSECURITY NEW ZEALAND - BNZ.About us.Disponível em: <www.biosecurity.govt.nz/biosec/org>. Acesso em: 17 nov. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 27 de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 mai. 2012. Seção 1, p. 93.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior - MDIC. Instituto Nacional de Metrologia - INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos - DOQ-CGCRE-008 revisão 04 - Jul/2011c**. Disponível em: <www.inmetro.gov.br/sidoq - - >. Acesso em: 24 out. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Manual de garantia da qualidade analítica**. Brasília, DF, 2011a, 227 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários**. Brasília, DF, 2011b, 72 p.

CODEX ALIMENTARIUS. CAC/GL 74-2010 - Guidelines on performance criteria and validation of methods for detection, identification and quantification of specific DNA sequences and specific proteins in foods. Disponível em: <www.codexalimentarius.org/download/standards/11667/CXG_074e.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2013.

CRC PLANT BIOSECURITY.**Plant Biosecurity CRC to manage key plant pest and diseases resource - 26 aug. 2013**.Disponível em: <www.pbcrc.com.au/sites/default/files/managed/file-attach/Transition%20of%20PaDIL%20to%20PBCRC%20-%20August%202013.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2013.

DE FREITAS, Elaine Ibrahim; DE LEMOS, Anderson Almeida; MARIN, Victor Augustus. Validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 11, n. 4, p. 1073-1083, 2006.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method Validation of U.S. Environmental Protection Agency Microbiological Methods of Analysis**. Disponível em: <http://www.epa.gov/fem/pdfs/final_microbiology_method_guidance_110409.pdf>. Acesso em: 8 nov. 2013.

EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION – EPPO. PM 7/84: Basic requirements for quality management in plant pest diagnosis laboratories. **EPPO Bulletin**, v. 37, p. 580-88, 2007.

EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION – EPPO. PM 7/98: specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. **EPPO Bulletin**, v. 40, n. 1, p. 5-22, 2010.

EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION – EPPO. **Profile of an International Organization**. Disponível em: <www.eppo.int/ABOUT_EPPO/EPPOdescriptionE.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2013.

EUROPEAN NETWORK OF GMO LABORATORIES (ENGL). **Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing. Version 13-10-2008**. Disponível em: <http://gmocrj.jrc.ec.europa.eu/doc/Min_Perf_Requirements_Analytical_methods.pdf> Acesso em: 15 nov. 2013.

EUROPEAN NETWORK OF GMO LABORATORIES (ENGL). **Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated method - EUR24790EN - 2011**. Disponível em: <<http://gmocrj.jrc.ec.europa.eu/doc/ENGL%20MV%20WG%20Report%20July%202011.pdf>> Acesso em: 15 nov. 2013.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **FDA Guidelines for the validation of analytical methods for the detection of microbial pathogens in foods**. United States of America, 2011, 50 p.

GONDIM, C. S.; JUNQUEIRA, R. G.; SOUZA, S. V. C. Tendências em validação de métodos de ensaio qualitativos com aplicação em análise de alimentos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 70, n. 4, p. 433-447, 2011.

HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, p. 331-343, 1995.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais de termos associados - VIM 2012**. Duque de Caxias, RJ : INMETRO, 2012, 94 p.

INTERNATIONAL ACCREDITATION NEW ZEALAND - IANZ. **Specific criteria for accreditation: Biological Testing 1 - Fourth edition, May 2011**. Disponível em:

<go.promapp.com/ianz/view/Documents/View/Open?displayType=document&docum entId=07f2035b-23ed-42f2-a520-675ad2889b0a>. Acesso em 17 nov. 2013.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **ICH Harmonised tripartite guideline validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), 1996.** Disponível em: <www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R 1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2013.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO. **ISO 5725 1:1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions.** Switzerland: ISO, 1994. 17 p.

IWOBI, Azuka; HUBER, Ingrid; BUSCH, Ulrich. The application of PCR-Based methods in Food Control Agencies - a review. In: HERNANDEZ-RODRIGUES, Patricia (Ed.); GOMEZ, Arlen P. R. (Ed.). **Polymerase Chain Reaction.** ISBN: 978-953-51-0612-8. Rijeka, Croatia: In Tech, 2012. p. 173-194.

LUCAS, J. A. Advances in plant disease and pest management. **Journal of Agricultural Science**, v. 149, p. 91-114, 2011.

MIAW, Carolina Sheng Whei. **Validação de método qualitativo para detecção de soja roundup ready® em grãos de soja por nested PCR (reação em cadeia da polimerase).** 2013. 156 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

NATIONAL ASSOCIATION OF TESTING AUTHORITIES - NATA. **Biological Testing ISO/IEC 17025 Application Document - March 2013b.** Disponível em: <www.nata.asn.au/phocadownload/publications/Accreditation_criteria/ISO-IEC-17025/Biological-Testing/Biological-Testing-ISO-IEC-17025-Application-Document.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2013b

NATIONAL ASSOCIATION OF TESTING AUTHORITIES - NATA. **NATA's role.** Disponível em: <www.nata.asn.au/natas-role>. Acesso em: 16 nov. 2013a.

NATIONAL ASSOCIATION OF TESTING AUTHORITIES - NATA. **Technical Note 17 - Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods - October 2013c.** Disponível em: <www.nata.asn.au/publications/category/50-nata-tech-notes-info-papers?download=708%3Atech-note-17>. Acesso em: 16 nov. 2013c.

NATIONAL PLANT BIOSECURITY STRATEGY - NPBN. National Plant Biosecurity Strategy. Disponível em: <www.planthealthaustralia.com.au/national-programs/national-plant-biosecurity-strategy/>. Acesso em: 16 nov. 2013.

NATIONAL PLANT DIAGNOSTIC NETWORK. Disponível em: <www.npdn.org/>. Acesso em: 01 nov. 2013.

NATIONAL PLANT DIAGNOSTIC NETWORK. Five-year review - report of the review panel: executive summary. 2007. Disponível em: <www.npdn.org/webfm_send/3>. Acesso em: 01 nov. 2013.

PLANT HEALTH AUSTRALIA - PHC. **About PHA**. Disponível em: <www.planthealthaustralia.com.au/about-us/>. Acesso em: 15 nov. 2013.

RAMBLA-ALEGRE, Maria; ESTEVE-ROMERO, Josep; CARDA-BROCH, Samuel. Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. **Journal of Chromatography A**, v. 1232, p. 101-109, 2012.

SOUZA, Scheilla V. C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. 2007. 296 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

STACK, J. *et al.* The national plant diagnostic network. **Plant Disease**, v. 90, n. 2, p. 128-136, 2006.

TAVERNIERS, Isabel; DE LOOSE, Marc; VAN BOCKSTAELE, Erik. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 535-552, 2004.

THOMPSON, Michael; ELLISON, Stephen L. R.; WOOD, Roger. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

THRANE, Charlotte. Quality assurance in plant health diagnostics—the experience of the Danish Plant Directorate. **European Journal of Plant Pathology**, v. 121, n. 3, p. 339-346, 2008.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Animal and Plant Health Inspection Service, APHIS -Plant Health - Pest Identification. Disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/plant_health/identification>. Acesso em 01 nov. 2013.

WEEKES, Rebecca. **ISO 17025 flexible scope for real-time PCR**. Poster Presented at the EPPO Workshop on Quality Assurance for Laboratories. Disponível em: <archives.eppo.int/MEETINGS/2007_meetings/labs_holte/18_posters/weekes.pdf>. Acesso em: 17 nov. 2013.

CAPÍTULO 4

PROPOSTA DE REQUISITOS BÁSICOS PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO FITOSSANITÁRIO POR PCR EM TEMPO-REAL A SEREM UTILIZADOS POR LABORATÓRIOS OFICIAIS E CREDENCIADOS DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA

1.0 - INTRODUÇÃO

Na sua função de órgão regulador e responsável pela garantia da fitossanidade da agricultura brasileira, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) precisa exigir que seus laboratórios oficiais e credenciados utilizem métodos de diagnóstico fitossanitário com o mais alto padrão de qualidade possível. Por esse motivo, o MAPA realiza auditorias periódicas nesses laboratórios a fim de verificar o cumprimento de normas oficiais, a qualidade de seus sistemas de gestão de qualidade e a confiabilidade dos resultados oficiais emitidos.

Além de ser um requisito técnico exigido em creditações baseadas na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 “Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração” (ABNT, 2005b), a validação é uma garantia de que o método de ensaio validado ou verificado é exato, reprodutível e adequado à faixa específica em que um analito será analisado. De acordo com a norma ISO 9000 (ABNT, 2005a), a validação e a verificação são comprovações, pelo fornecimento de evidências objetivas de que os requisitos para uma aplicação ou uso específico pretendido são atendidos.

Normas técnicas, documentos orientativos, vários tipos de guias e diversas outras publicações sobre validação de métodos analíticos têm sido revisadas e divulgadas, mas desencontros ou equívocos entre definições, usos indicados e outros detalhes que trazem dificuldades de interpretação e emprego têm sido notados (GONÇALVES; ALVES; MARTINS, 2011).

A acreditação de métodos pode trazer inúmeros benefícios aos laboratórios interessados. Dentre os mais importantes podem ser destacados: o maior acesso a mercados internacionais; menores gastos com reanálises e custos operacionais em virtude da realização de análises mais acuradas; demonstração mais objetiva da

qualidade técnica do laboratório na eventualidade de uma ação judicial, dentre outros (IANZ, 2013).

Tendo em vista a importância da validação no contexto da acreditação, alguns setores específicos do MAPA desenvolveram referências normativas para esclarecer e disseminar conceitos tecnicamente consistentes para orientar os laboratórios, de forma clara e didática, sobre como realizar um estudo de validação passo a passo e implantar procedimentos de garantia de qualidade de resultados, de modo a permitir uma avaliação objetiva de seu próprio desempenho e de seus métodos de ensaio. Esses documentos do MAPA já foram comentados anteriormente no capítulo 3 dessa dissertação (BRASIL, 2011a; BRASIL, 2011b).

Contudo, para a área de diagnóstico fitossanitário, o MAPA ainda não elaborou um guia específico para a validação de métodos de qPCR, razão pela qual é possível que essa proposta de requisitos básicos de validação possa preencher essa lacuna e atender a uma antiga demanda de laboratórios oficiais e credenciados. Essa regulamentação contribuiria para uma avaliação mais objetiva dos processos de validação e de verificação de desempenho dos métodos utilizados por laboratórios de diagnóstico fitossanitário.

Cada etapa de um diagnóstico por PCR pode ser tratada isoladamente, porém é recomendável que seja aplicada uma abordagem integrada considerando três aspectos: o desenvolvimento e a validação de métodos específicos para cada tipo de amostra, a implantação de um sistema interno de gestão da qualidade e a participação em programas externos de garantia da qualidade, tais como: ensaios de proficiência e comparações interlaboratoriais, conforme exemplificado na figura 08 (HOORFAR; WOLFFS; RÅDSTRÖM, 2004).

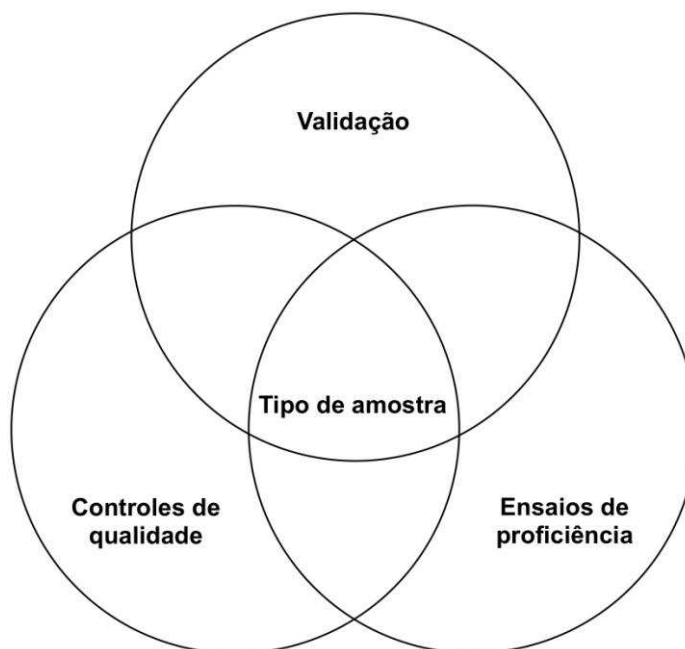


Figura 08: Abordagem integrada para o desenvolvimento de diagnósticos por PCR
Fonte: HOORFAR; WOLFFS; RÅDSTRÖM, 2004.

2.0 - PROPOSTA DE REQUISITOS BÁSICOS PARA VALIDAÇÃO MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO FITOSSANITÁRIO POR PCR EM TEMPO-REAL

Introdução:

Essa proposta de requisitos básicos de validação tem por objetivo estabelecer os parâmetros de desempenho e os requisitos mínimos de aceitação que devem ser atendidos para que um determinado procedimento analítico de diagnóstico fitossanitário por PCR ou PCR em tempo-real seja considerado validado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Sua concepção tem como base recomendações técnicas da Organização Internacional para Padronização (ISO), do Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO), da Organização Europeia e Mediterrânea de Defesa Sanitária Vegetal (EPPO), da Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA (FDA), da Rede Europeia de Laboratórios de Organismos Geneticamente Modificados (ENGL) e da Acreditação Internacional da Nova Zelândia (IANZ).

Escopo:

Essa proposta de requisitos básicos aplica-se à validação de diagnósticos moleculares por PCR e PCR em tempo-real (qPCR) utilizados na detecção e

identificação de fitobactérias, fitovírus, fitoplasmas, viróides e fungos fitopatogênicos em amostras ambientais (solo, planta, ar e água) no âmbito de atuação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA.

Seleção dos métodos de diagnóstico:

Os laboratórios devem utilizar, preferencialmente, métodos normalizados (padrões internacionais, regionais e nacionais validados por meio de estudos colaborativos), protocolos publicados em literatura científica ou métodos desenvolvidos ou adaptados internamente pelos próprios laboratórios. No caso de uso de métodos normalizados, os laboratórios devem assegurar que estão utilizando as suas versões mais recentes.

Sempre que necessário, os métodos devem ser complementados com informações adicionais que garantam a sua correta execução.

Tipos de validação métodos:

Validação interlaboratorial:

Consiste na avaliação das características operacionais do método por meio de um ensaio interlaboratorial, com um número mínimo e pré-definido de laboratórios (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Trata-se de um estudo complexo, dispendioso e nem sempre prático ou necessário (BERNARDES; SOUZA, 2011). Como consequência, procedimentos de validação intralaboratoriais (*single-laboratory* ou *in-house validation*) têm sido considerados apropriados quando se deseja avaliar parâmetros de desempenho de um método antes de formalizar a participação em processos interlaboratoriais, os quais envolvem um alto custo (SOUZA, 2007).

Validação intralaboratorial:

Consiste na comprovação de que o laboratório tem condições de operar métodos normalizados antes da implantação dos ensaios (ABNT, 2005).

Validação de métodos de diagnóstico fitossanitário por PCR:

Diagnóstico de fitobactérias:

Os seguintes parâmetros de desempenho devem ser avaliados nos métodos de diagnóstico fitossanitário a serem implantados pelo laboratório:

a) Sensibilidade: analisar pelo menos 3 séries de extratos fortificados de amostras com concentração de 10^1 a 10^6 células do organismo-alvo por mL. Isso deve ser feito, preferencialmente, por meio da adição de diluições seriadas das suspensões da bactéria-alvo nos extratos das amostras. Deve-se encontrar a menor densidade de bactérias que gera um resultado positivo no método. Se após a realização das 3 séries ainda não forem obtidos resultados positivos, séries adicionais devem ser preparadas e testadas. A sensibilidade analítica está relacionada a um conjunto específico de parâmetros que devem estar previamente definidos e padronizados, como por exemplo, a marca dos reagentes e as condições de amplificação da PCR;

b) Especificidade: analisar diferentes cepas das bactérias-alvo a fim de abranger diversidades genéticas, diferentes origens geográficas e hospedeiros, bem como grupos de bactérias não-alvo, preferencialmente, associadas ao material de origem das amostras. Utilizar suspensões de bactérias de culturas puras na concentração aproximada de 10^6 células por mL. Adicionalmente, os resultados das análises podem ser verificados por comparações *in silico* nas bibliotecas genômicas existentes das sequências dos primers e sondas utilizados;

c) Seletividade: determinar a insensibilidade relativa do método a variações do material das amostras, como por exemplo, aplicando o mesmo método em diferentes cultivares da mesma planta hospedeira;

d) Repetibilidade: analisar 8 replicatas de extratos fortificados das amostras contendo níveis médios e baixos de contaminação. Para detecção de infecções latentes, a repetibilidade deve ser validada no limite da sensibilidade analítica. Essa avaliação fornecerá informações sobre o nível de incerteza dos resultados de análise;

d) Reprodutibilidade: repetir os mesmos procedimentos realizados na avaliação da repetibilidade do método, porém, com diferentes analistas (se possível), em dias e equipamentos diferentes, quando isso for relevante.

Diagnóstico de fungos fitopatogênicos:

Os seguintes parâmetros de desempenho devem ser avaliados nos métodos de diagnóstico fitossanitário a serem implantados pelo laboratório:

a) Sensibilidade: determinar a quantidade mínima da espécie-alvo (ex.: número de conídios ou peso do material infectado) da qual se pode obter uma quantidade detectável do DNA-alvo. Realizar 3 experimentos com 8 séries de diluição, preferencialmente, com o DNA da planta hospedeira. Se após essas 3 séries ainda não forem obtidos resultados consistentes, séries adicionais devem ser preparadas e testadas;

b) Especificidade: fazer uma triagem, pelo menos uma vez, com uma série organismos não-alvos relevantes (ex.: fungos filogeneticamente próximos) que podem estar presentes nas amostras ou nos seus extratos. Adicionalmente, os resultados das análises podem ser verificados por comparações *in silico* das sequências dos primers e sondas utilizados nas bibliotecas genômicas existentes;

c) Seletividade: determinar a insensibilidade relativa do método a variações do material das amostras, como por exemplo, aplicando o mesmo método em diferentes cultivares da mesma planta hospedeira;

d) Repetibilidade: analisar 8 replicatas de extratos fortificados das amostras contendo níveis médios e baixos de contaminação. Para detecção de infecções latentes, a repetibilidade deve ser validada no limite da sensibilidade analítica. Essa avaliação fornecerá informações sobre o nível de incerteza dos resultados de análise;

d) Reprodutibilidade: repetir os mesmos procedimentos realizados na avaliação da repetibilidade do método, porém, com diferentes analistas (se possível), em dias e equipamentos diferentes, quando isso for relevante.

Diagnóstico de fitovírus, fitoplasmas e viróides:

Os seguintes parâmetros de desempenho devem ser avaliados nos métodos de diagnóstico fitossanitário a serem implantados pelo laboratório:

a) Sensibilidade: considerando que as concentrações de vírus, viróides e fitoplasmas nunca são conhecidas, deve-se determinar a máxima diluição detectável de RNA ou DNA. Convém destacar que essa sensibilidade determinada não é absoluta e, sim, relativa. Realizar pelo menos 3 experimentos com 8 diluições em série. Se nesses experimentos ainda não forem obtidos resultados consistentes, séries adicionais devem ser preparadas e testadas;

b) Especificidade: fazer uma triagem, pelo menos uma vez, com uma série organismos não-alvos relevantes que podem estar presentes nas amostras ou nos seus extratos. Adicionalmente, os resultados das análises podem ser verificados por comparações *in silico* das sequências dos primers e sondas utilizados nas bibliotecas genômicas existentes;

c) Seletividade: determinar a influência da matriz por meio da adição de amostras positivas em seivas de plantas hospedeiras de cultivares diferentes;

d) Repetibilidade: utilizar uma amostra para cada uma dos níveis de contaminação (baixo e médio), com no mínimo 2 subamostras, utilizando de 3 a 8 replicatas;

d) Reprodutibilidade: repetir os mesmos procedimentos realizados na avaliação da repetibilidade do método, porém, com diferentes analistas (se possível), em dias e equipamentos diferentes, quando isso for relevante.

3.0 - REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **NBR ISO/IEC 9000:** Sistemas de gestão da qualidade: fundamentos e vocabulário. Rio de Janeiro, 2005a.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **NBR ISO/IEC 17025:** Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Manual de garantia da qualidade analítica.** Brasília, DF, 2011a, 227 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários.** Brasília, DF, 2011b, 72 p.

BUSTIN, Stephen A. *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

DANZER, K. **Analytical chemistry, theoretical and metrological fundamentals.** Springer, Berlin, Heidelberg, 2007. ISBN 978-3-540-35988-3, DOI 10.1007/b103950.

EURACHEM. **EURACHEM Guide: the fitness for purpose of analytical methods a laboratory guide to method validation and related topics. First Internet Version Dec. 1998.** Disponível em: <www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2013.

EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION – EPPO. VAN OPSTAL, N. Basic requirements for quality management in plant pest diagnosis laboratories. **EPPO Bulletin**, v. 37, p. 580-88, 2007.

EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION - EPPO. Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant test activity. **EPPO Bulletin**, v. 40, p. 5-22, 2010.

GONÇALVES, Elisabeth Borges; ALVES, Ana Paula Guedes; MARTINS, Paula Alves. Questões críticas em validação de métodos analíticos. **Embrapa-Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento. Texto para Discussão**, v. 40, 2011.

HOORFAR, Jeffrey; WOLFFS, Petra; RÅDSTRÖM, PETER. Diagnostic PCR: validation and sample preparation are two sides of the same coin. **Apmis**, v. 112, n. 11 - 12, p. 808-814, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais de termos associados - VIM 2012.** Duque de Caxias, RJ : INMETRO, 2012, 94 p.

INTERNATIONAL ACCREDITATION NEW ZEALAND - IANZ. **International Accreditation New Zealand.** Disponível em: <go.promapp.com/ianz/view/Documents/View/Open?displayType=document&documentId=c8a1d0eb-4404-4313-988b-76afc6d2f019>. Acesso em 20 nov. 2013.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO.**ISO 13528:2005 - Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons.** Switzerland: ISO, 2005. 66 p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO.**ISO/IEC 17043:2010 - Conformity assessment - General requirements for proficiency testing.** Switzerland: ISO, 2010. 39 p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO.**ISO 22119:2011(E): Microbiology of food and animal feeding stuffs - Real-time polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - General requirements and definitions.** Switzerland: ISO, 2011. 12 p.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY - IUPAC.**Compendium of Analytical Nomenclature - IUPAC Orange Book, 3rd edition, 1997.** Disponível em: <http://old.iupac.org/publications/analytical_compendium/>. Acesso em: 22 nov. 2013.

THOMPSON, M; WOOD, R. Harmonized guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories.**Pure & Appl. Chem.**, v. 67, n. 4, p. 649-666, 1995.

CONCLUSÕES GERAIS

- A exigência do MAPA para que seus laboratórios oficiais e credenciados implantassem sistemas de gestão da qualidade (Instrução Normativa nº 24/2001) baseados na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 (Instrução Normativa nº 1/2007) e que o escopo de interesse do MAPA fosse acreditado pelo INMETRO (Instruções Normativas nº 34/2011, 40/2011 e 57/2013) estimulou laboratórios oficiais e credenciados a investir mais na implantação ou no aperfeiçoamento de seus sistemas de gestão da qualidade a fim de evitar a perda de seu credenciamento junto ao MAPA;
- A validação de métodos representa um dos requisitos técnicos da norma ISO/IEC 17025 mais difíceis de serem implantados em laboratórios de diagnóstico fitossanitário em virtude das diversas limitações existentes nesse tipo de análise, como por exemplo, a dificuldade de se obter controles positivos de pragas quarentenárias A1 (ainda ausentes do país), a carência de protocolos de validação adequados para a diagnose de fitopatógenos e o número reduzido de ensaios de proficiência específicos para fitopatógenos. Nesse sentido, caberia ao MAPA viabilizar a importação biossegura de material genético (RNA e DNA) de pragas quarentenárias A1 para utilização como controles positivos nos laboratórios oficiais e credenciados; internalizar protocolos e métodos normalizados de diagnóstico fitossanitário por PCR em tempo-real e organizar ensaios de proficiência de fitopatógenos-chave a fim de permitir ao laboratórios participantes avaliar a qualidade e a confiabilidade dos diagnósticos moleculares emitidos;
- A utilização de métodos moleculares baseados em PCR para realização de diagnósticos fitossanitários pode levar a resultados incorretos, caso esses métodos não tenham sido adequadamente validados ou verificados antes de sua implantação nos laboratórios;
- O uso da PCR em tempo-real (qPCR) para a realização de diagnósticos fitossanitários possibilita o aumento do grau de automação e a redução do tempo de análise. No entanto, a presença de inibidores da reação de PCR nos extratos do DNA das amostras pode piorar o limite de detecção e a

precisão da quantificação de DNA dos métodos. Em razão disso, o processo de extração de DNA também precisa ser adequadamente validado;

- Vários protocolos e kits comerciais foram desenvolvidos para a extração de DNA de diferentes tipos de matrizes (plantas, fungos, bactérias, vírus, etc.) a fim de eliminar ou reduzir os impactos da inibição da PCR;
- O uso da qPCR na realização de diagnósticos fitossanitários reduz a possibilidade de contaminações cruzadas por amplicons carregados de reações anteriores porque a qPCR é totalmente realizada dentro de microtubos fechados;
- A falta de harmonização nas diversas publicações científicas envolvendo qPCR prejudicam a execução dos protocolos e reprodução de resultados;
- A publicação das “Informações Mínimas Para Publicação de Experimentos de PCR em Tempo-Real”(MIQE, em inglês) teve por objetivo garantir a relevância, veracidade, repetibilidade e correta interpretação desse tipo de experimento;
- Dentre as informações mínimas recomendadas pelo MIQE estão a padronização de siglas (qPCR e RT-qPCR) e dos termos utilizados nas descrições dos experimentos (Cq, sondas de hidrólise, sondas de hibridização, etc.);
- A pesquisa aqui efetuada revelou que apenas os EUA e a EPPO publicaram recomendações específicas para validação de métodos de diagnóstico baseados em PCR sendo que apenas a EPPO publicou requisitos básicos para a realização de diagnósticos fitossanitários;
- Os principais parâmetros de desempenho para métodos de diagnóstico fitossanitários por PCR recomendados pela EPPO são: sensibilidade, especificidade, seletividade, repetibilidade e reprodutibilidade.
- A adoção no Brasil destes procedimentos e padrões internacionais colocaria o país em par de igualdade com as nações mais desenvolvidas quanto às práticas de análise para quarentena fitossanitária contribuindo significativamente para a defesa fitossanitária do país e para a colocação dos produtos agrícolas do Brasil nos mercados internacionais favorecendo o progresso e expansão do agronegócio brasileiro e o futuro e sustentabilidade da atividade agrícola.

ANEXOS

ANEXO 1: Termos e definições utilizados na validação de métodos

Adequação ao uso pretendido: é o grau com o qual o resultado de um procedimento de medição permite ao usuário tomar uma decisão técnica e administrativamente correta para um dado propósito (THOMPSON; WOOD, 1995; IUPAC, 1997).

Aplicabilidade: ver definição de escopo.

Atividade de exonuclease 5'-3': habilidade de uma enzima (ex.: polimerase) de clivar moléculas hibridizadas de ácido nucleico na direção 5'-3'.

Ciclo de transposição de limite (Cq): é ciclo a partir do qual o sinal de fluorescência ultrapassa a linha de base do equipamento de PCR em tempo-real ou algum outro limite pré-estabelecido (ISO, 2011).

Comparação interlaboratorial: é a organização, realização e avaliação de ensaios ou medições de um mesmo item ou itens similares por dois ou mais laboratórios de acordo com condições predeterminadas (ISO, 2005).

Condição de repetitividade: é a condição de medição constituída pelo mesmo procedimento de medição, mesmos operadores, mesmo sistema de medição, mesmas condições de operação, mesmo local e com medições repetidas para o mesmo objeto ou objetos similares durante um curto período de tempo.

Condição de reprodutibilidade: é a condição de medição constituída pelo mesmo procedimento de medição, diferentes operadores, diferentes locais, diferentes sistemas de medição e medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares.

Controle interno de qualidade: é o conjunto de ações executadas pelo laboratório para assegurar que os resultados produzidos estão adequados à finalidade proposta. Na prática, a adequação ao propósito é determinada por uma comparação entre a exatidão obtida no laboratório, em um tempo determinado e com o nível de exatidão requerido. Inclui, portanto, procedimentos práticos de rotina que

possibilitam ao analista aceitar um resultado ou grupos de resultados como adequados ao propósito ou rejeitar resultados e repetir análises.

Controle de qualidade: é o conjunto de atividades do sistema de gestão da qualidade focado em demonstrar que os requisitos de qualidade são atendidos. É constituído pelo conjunto de atividades planejadas para monitorar, verificar e controlar a qualidade dos resultados analíticos, tais como: a análise de amostra branca, de amostra de controle, de material de referência certificado, elaboração de cartas de controle e participação em avaliações externas de qualidade, como ensaios interlaboratoriais colaborativos e de proficiência.

Dark quencher: é uma molécula receptora que não emite energia dentro da faixa espectral detectada pelo sistema de detecção do equipamento de PCR em tempo-real (ISO, 2011).

Ensaio de proficiência: é a determinação do desempenho de um laboratório de medição ou de ensaio por meio de comparações (ensaios ou estudos) interlaboratoriais (ISO, 2005). Também pode ser considerada a avaliação do desempenho de um participante sob critérios preestabelecidos por comparações (ensaios ou estudos) interlaboratoriais (ISO, 2010).

Ensaio interlaboratorial: estudo em que diversos laboratórios medem uma grandeza em uma ou mais porções idênticas de um material estável e homogêneo, em condições documentadas, cujos resultados são compilados em um único relatório (DANZER, 2007).

Ensaio ou estudo colaborativo: Determinação do desempenho de um procedimento de medição ou de um ensaio mediante comparações (ensaios ou estudos) interlaboratoriais.

Erro aleatório: é o componente do erro de medição que, em medições repetidas, varia de maneira imprevisível (INMETRO, 2012).

Erro de medição: é a diferença entre o valor medido de uma grandeza e um valor de referência (INMETRO, 2012).

Erro sistemático: é o componente do erro de medição que, em medições repetidas, permanece constante ou varia de maneira previsível (INMETRO, 2012).

Escopo ou aplicabilidade: corresponde aos analitos, matrizes e concentrações para os quais o procedimento analítico pode ser usado satisfatoriamente.

Especificidade: nas reações de qPCR, refere-se à capacidade da reação em detectar a sequência-alvo correta mesmo na presença de outras não-específicas presentes nas amostras. A especificidade diagnóstica é a percentagem de indivíduos sem uma determinada condição que a análise identifica como negativos para essa tal condição (BUSTIN *et al.*, 2009).

Exatidão: é o grau de concordância entre um valor medido e um valor verdadeiro de um mensurando (INMETRO, 2012). Também pode ser entendida como o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito. Nas reações de PCR, refere-se à diferença entre a concentração de DNA medida e a concentração real, expressas como mudanças no ritmo de amplificação ou no número estimado de cópias.

Faixa de linearidade / faixa linear / faixa dinâmica linear: é a faixa de concentração na qual a resposta instrumental é linear com a concentração do analito (DANZER, 2007).

Faixa de trabalho / faixa de medição / faixa validada: é o conjunto de valores de um mensurando para os quais os erros do procedimento medição analítica estão dentro de limites especificados (adaptado de EURACHEM, 1998; IUPAC, 1997). Também pode ser entendida como o intervalo entre as concentrações inferior e superior do analito na amostra dentro da qual foi determinado que o procedimento analítico é adequado ao uso pretendido (adaptado de DANZER, 2007).

Fluorescência residual: é o nível intrínseco de fluorescência resultante dos reagentes e consumíveis utilizados (ISO, 2011).

Incerteza de medição: parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas (INMETRO, 2012).

Limite de Detecção (LD): é a menor concentração do analito que pode ser confiavelmente detectada por um método de medição (EURACHEM, 1998).

Limite de Quantificação (LQ): é a menor concentração que pode ser determinada com veracidade e precisão de repetitividade aceitáveis (EURACHEM, 1998).

Material de Referência (MR): é o material, suficientemente homogêneo e estável em relação a propriedades específicas, preparado para se adequar a uma utilização pretendida numa medição ou num exame de propriedades qualitativas (INMETRO, 2012).

Material de Referência Certificado (MRC): é o material de referência acompanhado de documentação emitida por uma entidade reconhecida, que fornece um ou mais valores de propriedades especificadas com as incertezas e as rastreabilidades associadas, utilizando procedimentos válidos (INMETRO, 2012).

Matriz branca ou amostra branca: matriz isenta da substância a ser analisada ou cujo nível de concentração seja suficientemente baixo de modo a não interferir nos resultados de medição.

Método analítico: sequência lógica de operações, descritas genericamente e resumidamente, usadas na execução de uma análise química de um dado analito ou um conjunto de analitos em uma matriz, usando determinada técnica analítica (DANZER, 2007).

Método ou procedimento normalizado: é o procedimento analítico desenvolvido, validado e aprovado em ensaios interlaboratoriais colaborativos por um organismo de normalização.

Método ou procedimento oficial: é o procedimento analítico desenvolvido, validado e aprovado em ensaios interlaboratoriais, por organismo de normalização ou outras organizações, devidamente homologado pelo órgão legalmente competente.

Molecular beacon: é uma sonda fluorescente composta de três partes diferentes: uma central que complementar à sequência-alvo do ácido nucleico mais uma porção 5' e uma porção 3' que são complementares entre si. As moléculas reporter e quencher ficam ligadas e separadas em extremidades diferentes da sonda (ISO, 2011).

Nível de detecção de fluorescência da linha de base: é o ponto a partir do qual a reação de PCR atinge uma intensidade de fluorescência maior do que o nível de ruído do equipamento de PCR em tempo-real (ISO, 2011).

PCR em tempo-real (qPCR): procedimento enzimático que combina a amplificação *in vitro* de segmentos específicos de DNA por um processo de desnaturação, anelamento de iniciadores específicos e síntese de DNA com a detecção de produtos de PCR específicos durante o processo de amplificação (ISO, 2011).

PCR: reação em cadeia da polimerase.

Precisão de medição: é o grau de concordância entre indicações ou valores medidos, obtidos por medições repetidas, no mesmo objeto ou em objetos similares, sob condições especificadas (INMETRO, 2012).

Procedimento analítico: é o conjunto de operações, descritas especificamente e detalhadamente, usadas na execução da análise de um analito particular ou de um conjunto de analitos, de acordo com um dado método analítico (DANZER, 2007).

Produto de PCR: é o DNA amplificado por uma reação de PCR.

Quencher: molécula fluorescente que funciona como receptora de energia que funciona como atenuadora do sinal de fluorescência do reporter (ISO, 2011).

Referência passiva: são moléculas fluorescentes presentes no mix da reação utilizadas para normalizar o sinal (ISO, 2011).

Repetibilidade de medição ou repetibilidade (r): é a precisão de medição sob um conjunto de condições de repetitividade (INMETRO, 2012). As condições de repetitividade são aquelas em que todos os fatores que podem alterar o resultado da medição são mantidos constantes ou controlados, ou seja, mesmo procedimento de medição, mesmo analista, mesmas temperatura, pressão e umidade ambientes, mesmo laboratório, mesmos fornecedores e lotes de reagentes, com replicatas de medição realizadas em curto período de tempo. Nas reações de qPCR, pode ser expressa como o desvio-padrão da variância do C_q (BUSTIN *et al.*, 2009).

Reporter: molécula fluorescente utilizada para detectar a ligação de sondas específicas pela excitação eletromagnética de um comprimento de onda definido (ISO, 2011).

Reprodutibilidade de medição ou reprodutibilidade (R): é a precisão de medição sob um conjunto de condições de reprodutibilidade (INMETRO, 2012). As condições de reprodutibilidade são aquelas em que todos os fatores que podem alterar o resultado da medição são variados na maior extensão possível que se pode ter na

rotina. As replicatas de medição são feitas em dias diferentes, em intervalo de tempo abrangente, em laboratórios, instrumentos e analistas diferentes, entre outros. Nas reações de qPCR, pode ser expressa como desvio-padrão ou coeficiente de variação das concentrações ou do número de cópias (BUSTIN *et al.*, 2009). O valores de C_q obtidos em diferentes corridas sofrem variações inerentes ao processo, razão pela qual a variação entre corridas não deveria ser reportada.

Robustez: é a propriedade de um procedimento analítico que indica sua insensibilidade a mudanças de condições operacionais conhecidas sobre o resultado do procedimento e, portanto, sua adequação a seu propósito de uso (DANZER, 2007).

Seletividade: é a propriedade de um sistema de medição, utilizado com um procedimento de medição especificado, segundo a qual o sistema fornece valores medidos para um ou vários mensurandos, tal que os valores de cada mensurando sejam independentes uns dos outros, ou de outras grandezas associadas ao fenômeno, corpo ou substância em estudo (INMETRO, 2012).

Sensibilidade: é o quociente entre a variação de uma indicação de um sistema de medição e a variação correspondente do valor da grandeza medida (INMETRO, 2012). Segundo BUSTIN (2009), para análises de PCR, a sensibilidade analítica refere-se ao número mínimo de cópias de DNA em uma amostra que podem ser medidas com exatidão em uma análise. Tipicamente, a sensibilidade é expressa pelo limite de detecção (LD). O menor LD teórico possível é de 3 cópias por PCR, assumindo uma distribuição de Poisson, uma chance de 95% de incluir ao menos 1 cópia na PCR e detecção de cópia simples;

Sonda de hidrólise: é uma sonda fluorescente acrescida de duas moléculas fluorescentes que são espacialmente separadas pela atividade de exonuclease 5'-3' da enzima polimerase durante o processo de amplificação de DNA (ISO, 2011).

Sonda fluorescente: é uma sequência definida de oligonucleotídeo ou análogo acrescida de uma ou mais moléculas fluorescentes (ISO, 2011).

Sonda para detecção de uma sequência de ácido nucleico para controle interno de reação: é uma sonda desenhada com um reporter utilizado para confirmar o desempenho da amplificação de DNA (ISO, 2011).

Sonda para detecção de uma sequência específica de DNA de patógeno: é uma sonda com uma sequência complementar do DNA de um patógeno cujo reporter emite um sinal com um comprimento de onda definido que pode ser detectado pelo sistema de detecção ótica do equipamento de PCR em tempo-real (ISO, 2011).

Tendência: é a estimativa de um erro sistemático (INMETRO, 2012). Também pode ser entendida como a diferença entre uma média de um número suficiente de resultados de medição em condições de repetitividade e o valor verdadeiro convencional estabelecido por um padrão, material de referência ou material de referência certificado. A tendência é uma medida da veracidade, quanto maior a tendência menor é a veracidade do resultado da medição.

Transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET): é a transferência de energia de uma molécula doadora para uma molécula receptora, em função de sua proximidade, resultando em um aumento de fluorescência da molécula receptora após a excitação com radiação eletromagnética de comprimento de onda definido (ISO, 2011).

Validação: verificação na qual os requisitos especificados são adequados para um uso pretendido (INMETRO, 2012);

Veracidade: é o grau de concordância entre a media de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência (INMETRO, 2012).

Verificação: é o fornecimento de evidência objetiva de que um dado item atende a requisitos especificados (INMETRO, 2012).

ANEXO 2: Exemplo de verificação de desempenho de método normalizado de diagnóstico fitossanitário por PCR em tempo-real em conformidade com a proposta formulada na dissertação.

Título:

Verificação de desempenho de método para detecção e identificação por PCR em tempo-real do fungo *Guignardia citricarpa* em *Citrus* spp.

Escopo:

Detecção e identificação por PCR em tempo-real do fungo *Guignardia citricarpa* em micélios ou lesões suspeitas em frutos de citros.

Seleção do método de diagnóstico:

O método normalizado a ser verificado é um padrão internacional estabelecido pela EPPO - *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO, 2009), baseado no protocolo desenvolvido por Gent-Pelzer *et al.* (2007) para detecção do fungo *Guignardia citricarpa* em citros.

O protocolo baseia-se na amplificação de sequências de DNA da região ITS (*internal transcribed spacer*) do genoma de *Guignardia citricarpa* produzindo amplicons com 69 pares de bases, que são detectados por termocicladores de PCR em tempo-real através da emissão de fluorescência produzida por sondas de hidrólise (*Taqman*®) presentes nos amplicons.

Procedimentos para o preparo de amostras de citros:

Micélio:

- Coletar possíveis picnídios de *Guignardia citricarpa* encontrados em lesões de ramos e folhas de citros e inoculá-los em meio CHA (*Cherry Decoction Agar*) ou meio OA (*Oatmeal Agar*) (ATLAS, 2010) por 7 a 14 dias;
- Retirar pedaços de 1 cm de diâmetro de micélio com ágar (*agar plugs*) das placas de petri;
- Cortar os pedaços de micélio em partes menores e colocá-los em microtubos de 1,5 mL contendo 125 µL de solução-tampão de extração de DNA contendo: PBS 0,02 M; Tween T25 0,05%; polivinilpirolidona 2%; albumina de soro bovina 0,2%;

- Efetuar uma trituração mecânica dos pedaços de micélio e centrifugar por 5 segundos a 16100 x g;
- Retirar 75 µL do sobrenadante para a extração de DNA.

Lesões:

- Coletar um pedaço de casca contendo a lesão suspostamente provocada por *Guignardia citricarpa* nos frutos de citros, retirando o máximo possível do mesocarpo (“branco da casca”) que envolve a lesão;
- Cortar os pedaços de lesão em partes menores e colocá-los em microtubos de 1,5 mL contendo 125 µL de solução-tampão de extração de DNA contendo: PBS 0,02 M; Tween T25 0,05%; polivinilpirolidona 2%; albumina de soro bovina 0,2%;
- Efetuar uma trituração mecânica dos pedaços de lesão e centrifugar por 5 segundos a 16100 x g;
- Retirar 75 µL do sobrenadante para a extração de DNA.

Extração de DNA:

- O DNA pode ser extraído utilizando-se kits comerciais tais como: o Gentra Puregene® Tissue Kit (QIAGEN, 2014) ou QuickPick® SML Plant DNA (BIONOBILE, 2014).

Procedimentos para verificação do método:

Os seguintes parâmetros de desempenho deverão ser verificados:

Extração de DNA:

- **Quantidade de DNA:** Verificar se a quantidade de DNA total extraído será suficiente para a realização da qPCR. Essa verificação é realizada por meio de medição espectrofotométrica da absorbância UV do extrato nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm. Se a concentração determinada for menor do que 20 ng.µl⁻¹, deve-se repetir a extração, pois não haverá DNA suficiente para a realização da qPCR;
- **Proteínas:** Verificar se o extrato de DNA contém proteínas que podem inibir a qPCR. Essa verificação é efetuada por meio do cálculo da relação das absorbâncias UV nos comprimentos de onda 260nm:280nm. Se a relação for maior do que 1,8, pode-se considerar que o extrato está livre de proteínas;

- **Polifenóis e carboidratos:** Verificar se o extrato de DNA contém polifenóis e carboidratos que podem inibir a qPCR. Essa verificação é realizada por meio da relação das absorvâncias nos comprimentos de onda 260nm:230nm. Se a relação for maior do que 2,0, pode-se considerar que o extrato está livre de polifenóis e de carboidratos.

Sensibilidade do método:

- Determinar o peso mínimo de micélio ou o peso mínimo da amostra de lesão dos frutos da qual se pode obter uma quantidade detectável do DNA-alvo;
- Realizar 3 experimentos com 8 séries de diluição (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} e 10) com o micélio e o DNA da planta hospedeira. Se após essas 3 séries ainda não forem obtidos resultados consistentes, séries adicionais devem ser preparadas e testadas;

Especificidade do método:

- Testar o método a ser verificado com outros fungos que também costumam ocorrer em citros (*Guignardia mangiferae*, *Guignardia bidwellii*, *Phyllosticta citriasiana*, *Phytophthora citrophthora*, *P. nicotianae* var. *parasitica*, *Fusarium* spp. *Corticium salmonicolor*, etc.) para verificar se ocorrem reações cruzadas da sonda e dos primers utilizados na detecção de *Guignardia citricarpa*;
- Se o método detectar qualquer outro fungo, é sinal de que não é específico para *Guignardia citricarpa* e, portanto, não deve ser utilizado para esse propósito.

Seletividade do método:

- Testar o método a ser verificado com diferentes variedades ou espécies de citros (*Citrus reticulata*, *Citrus medica* e *Citrus maxima*) para determinar a insensibilidade relativa do método a variações do material das amostras;

- Caso não seja possível detectar *Guignardia citricarpa* em outras variedades ou espécies de citros, deve-se utilizá-lo apenas naquelas em que o resultado foi satisfatório.

Repetibilidade do método:

- Analisar 8 replicatas de extratos fortificados (artificialmente contaminados) das amostras contendo níveis médio e baixo de contaminação;
- Para detecção de infecções latentes, a repetibilidade deve ser validada no limite da sensibilidade analítica (menor concentração capaz de ser detectada pelo método). Essa avaliação fornecerá informações sobre o nível de incerteza dos resultados de análise.

Reprodutibilidade do método:

- Repetir os mesmos procedimentos realizados na avaliação da repetibilidade do método, porém, com diferentes analistas (se possível), em dias e equipamentos diferentes, se houver no laboratório.

Referências:

Atlas, R. M. Handbook of microbiological media. 4th ed. Boca Raton: CRC press, 2010.p. 348.

BIONOBILE.**QuickPick™ SML Plant DNA.** Disponível em: http://www.bionobile.com/literature/download/kitinserts/Plant_DNA_SML_MK53022.pdf. Acesso em: 01 fev. 2014.

European and Mediterranean Plant Protection Organization - EPPO.PM 7/17(2): **Guignardia citricarpa(2009).** Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2338.2009.02319.x/pdf>. Acesso em: 31 jan. 2014.

GENT- PELZER, Van et al.A TaqMan PCR method for routine diagnosis of the quarantine fungus *Guignardia citricarpa* on citrus fruit.**Journal of Phytopathology**, v. 155, n. 6, p. 357-363, 2007.

QIAGEN.**Gentra Puregene® Tissue Kit.** Disponível em: <http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/gentra-puregene-tissue-kit>. Acesso em: 01 fev. 2014.

ANEXO 3: Links para acesso à legislação e às normas do M APA citadas no texto.

Decreto nº 5.351, de 21 de janeiro de 2005. Aprova a estrutura regimental e o quadro demonstrativo dos cargos em comissão e das funções gratificadas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e dá outras providências. (http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/Decreto/D5351.htm);

Decreto nº 7.127, de 4 de março de 2010: Aprova a estrutura regimental e o quadro demonstrativo dos cargos em comissão e das funções gratificadas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e dá outras providências. (http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2010/Decreto/D7127.htm);

Instrução Normativa nº24, de 07 de junho de 2001: Aprova as Normas Gerais de Credenciamento e Reconhecimento de Laboratórios da Área Animal e Vegetal. (<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=detalharAtosArvore&tipo=INM&numeroAto=00000024&seqAto=000&valorAno=2001&orgao=SDA/MAA&codTipo=&desItem=&desItemFim=#>);

Instrução Normativa nº 51, de 27 de junho de 2003: Altera a redação de alguns artigos da Instrução Normativa nº 24, de 7 de junho de 2001. (<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=detalharAtosArvore&tipo=INM&numeroAto=00000051&seqAto=000&valorAno=2003&orgao=SDA/MAA&codTipo=&desItem=&desItemFim=#>);

Instrução Normativa nº 9, de 17 de março de 2005: Atribui ao Departamento de Sanidade Vegetal (DSV) as responsabilidades e funções inerentes à Organização Nacional de Proteção Fitossanitária - ONPF do Brasil. (<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=detalharAtosArvore&tipo=INM&numeroAto=00000009&seqAto=000&valorAno=2005&orgao=SDA/MAPA&codTipo=&desItem=&desItemFim=#>);

Instrução Normativa nº 36, de 10 de novembro de 2006: Aprova o Manual de Procedimentos Operacionais da Vigilância Agropecuária Internacional. (<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=detalharAtosArvor>

[e&tipo=INM&numeroAto=00000036&seqAto=000&valorAno=2006&orgao=MAPA&codTipo=&desItem=&desItemFim=#](http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=detalharAtosArvore&tipo=INM&numeroAto=00000036&seqAto=000&valorAno=2006&orgao=MAPA&codTipo=&desItem=&desItemFim=#));

Instrução Normativa nº1, de 16 de janeiro de 2007: Estabelece critérios para o credenciamento, reconhecimento, extensão de escopo e monitoramento de laboratórios no MAPA de forma a integrarem a Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária. (<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=detalharAtosArvore&tipo=INM&numeroAto=00000001&seqAto=000&valorAno=2007&orgao=MAPA&codTipo=&desItem=&desItemFim=#>);

Portaria nº 428, de 9 de junho de 2010: Aprova o Regimento Interno das Superintendências Federais de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=detalharAtosArvore&tipo=POR&numeroAto=00000428&seqAto=000&valorAno=2010&orgao=MAPA&codTipo=&desItem=&desItemFim=#>);

Instrução Normativa nº 34, de 14 de julho de 2011: Acrescenta ao Anexo da Instrução Normativa nº 1, de 16 de janeiro de 2007, o inciso XVI no art. 7º e os artigos 33, 34 e 35, as seguintes redações. (<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=detalharAtosArvore&tipo=INM&numeroAto=00000034&seqAto=000&valorAno=2011&orgao=MAPA&codTipo=&desItem=&desItemFim=#>);

Instrução Normativa nº 40, de 30 de agosto de 2011: Altera a redação do art. 36 ao Anexo da Instrução Normativa nº 1, de 16 de janeiro de 2007. (<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=detalharAtosArvore&tipo=INM&numeroAto=00000040&seqAto=000&valorAno=2011&orgao=MAPA&codTipo=&desItem=&desItemFim=#>);

Instrução Normativa nº 57, de 11 de dezembro de 2013: Estabelece os critérios e requisitos para o credenciamento e monitoramento de laboratórios pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. (<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=detalharAtosArvore&tipo=INM&numeroAto=00000057&seqAto=000&valorAno=2013&orgao=MAPA&codTipo=&desItem=&desItemFim=#>).