



**Joana Raquel Freitas Dias da Silva**

Licenciatura em Bioquímica

**Desenvolvimento e análise de mercado de *kit* de diagnóstico veterinário**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Biotecnologia

Orientador: Professora Doutora Fernanda Antónia Josefa Llussá, FCT – UNL

Co-Orientador: Doutor Manuel José Rodrigues, Biopremier S.A.

Júri

Presidente: Prof. Doutora Ana Cecília Afonso Roque

Arguente: Prof. Doutor Virgílio António Cruz Machado

Vogal: Prof. Doutora Fernanda Antónia Josefa Llussá

**Setembro 2015**



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



**Desenvolvimento e análise de mercado de *kit* de diagnóstico veterinário**



## Resumo

Anemia infecciosa pode ser causada por determinadas bactérias e parasitas, em humanos e animais. Nos animais, incide principalmente em animais de companhia e de produção. Bovinos e equinos são os animais com maior impacto económico, uma vez que a incidência da doença tem consequências na produção de carne e leite, e na *performance* dos cavalos de competição. Assim, é necessário haver controlo da doença de forma a reduzir quebras de produção. O controlo é feito não só pela implementação de medidas de sanidade animal, mas também pela realização de testes de diagnóstico que possibilitem a detecção dos agentes causadores de anemia.

Face a esta necessidade, este trabalho assenta no desenvolvimento de um teste de diagnóstico de algumas espécies pertencentes à ordem *Rickettsiales* e à classe *Aconoidasida*, usando a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Foram então optimizadas condições do teste já existente como serviço, na empresa onde decorre o estudo – Biopremier, passando de um teste em *simplex* para *duplex*. Após os ensaios de optimização, foram realizados testes de validação que permitiram observar a elevada especificidade e sensibilidade.

Para além do desenvolvimento do teste, foi feito o estudo de mercado para a comercialização do teste em forma de *kit*. Este é direccionado a laboratórios veterinários com equipamentos que permitam a reprodução do mesmo, com elevada confiança nos resultados obtidos. O estudo do valor de mercado foi realizado para os principais países produtores de bovinos e equinos, com base nos respectivos números de produção anual.

Pelo desenvolvimento e análise do mercado, conclui-se que o *kit* produzido tem vantagens face aos competidores já existentes no mercado veterinário, tal como um enorme potencial para revolucionar o mercado nesta área. No entanto, há esforços de sensibilização da doença que devem ser promovidos.

**Palavras-Chave:** Anemia, Animais, Comercialização, Estratégia, *Kit*, PCR.



## **Abstract**

Infectious anemia might be caused by a certain kind of bacterias and parasites, in humans and animals. In animals, the majority is focused in pets and farm animals. Bovine and equines are those who have a major economic impact once that the focus of the disease has consequences on the production of meat and milk, and also on the performance of competition horses. Thus, it is necessary to have a disease control in order to reduce production losses. The control it's not only done by the implementation of animal health measures, but also for the accomplishment of diagnostic tests that allow the detection of causing for anemia agents.

Considering this need, this investigation it's based on the development of a diagnostic test, using the PCR technique, on some species who belong to the Order Rickettsiales and to the Class Aconoidasida.

Beyond the development of the test, a study about the market for the commercialization of the test in kit form has been done. This one is focused to veterinary labs with equipments that allow the reproduction of this, with very reliable results. The study of the market value was accomplished by the mainly producers countries of bovines animals and horses, based on the respective annual production numbers.

By the development and market analysis, it can be conclude that the produced kit has several advantages compared to the already existed competitor on the vet market, as a huge potential for changing the market on this area. However, there awareness efforts about the disease that must be promoted.

**Keywords:** Anemia, Animals, Marketing, Strategy, Kit, PCR.



## Índice Geral

Índice de Figuras .....	xiii
Índice de Tabelas .....	xvii
Lista de Abreviaturas .....	xix
Lista de Unidades .....	xx
Lista de Símbolos .....	xx
1. Introdução.....	1
1.1. Biopremier .....	1
1.1.1. A empresa .....	1
1.1.2. Serviços clínicos.....	2
1.2. Técnica de PCR .....	3
1.2.1. PCR convencional .....	3
1.2.2. PCR <i>multiplex</i> no diagnóstico molecular.....	5
1.3. Testes clínicos.....	6
1.3.1. Ordem <i>Rickettsiales</i> .....	6
1.3.1.1. Género <i>Rickettsia</i> .....	7
1.3.1.2. Género <i>Ehrlichia</i> .....	8
1.3.1.3. Género <i>Anaplasma</i> .....	9
1.3.1.4. Diagnóstico .....	9
1.3.1.5. Tratamento .....	10
1.3.2. Classe <i>Aconoidasida</i> .....	10
1.3.2.1. Género <i>Babesia</i> .....	11
1.3.2.2. Género <i>Theileria</i> .....	12
1.3.2.3. Diagnóstico .....	12
1.3.2.4. Tratamento .....	12
1.4. Objectivo.....	13
2. Materiais e Métodos .....	15
2.1. Laboratórios Biopremier .....	15
2.2. Amostas clínicas.....	16
2.2.1. Extracção de DNA .....	16
2.2.2. Quantificação de DNA .....	16
2.3. Reagentes de PCR.....	17
2.4. Análise do produto de PCR .....	17

2.5. Teste de diagnóstico de anemia infecciosa .....	17
2.5.1. Desenho dos <i>primers</i> .....	18
2.5.2. Testes de <i>annealing</i> .....	19
2.5.3. Testes de especificidade .....	19
2.6. Validação .....	19
2.6.1. Testes de especificidade .....	20
2.6.3. Testes de sensibilidade clínica .....	22
3. Apresentação de resultados e Discussão .....	23
4. Da tecnologia para o mercado .....	39
4.1. Análise de Mercado .....	39
4.1.1. Número de potenciais clientes no mercado .....	40
4.1.2. Valor do mercado potencial .....	42
4.1.3. Maturidade e crescimento do mercado .....	45
4.1.4. Análise de competidores .....	45
4.1.5. Outros <i>stakeholders</i> relevantes no mercado .....	47
4.1.6. Ameaças e barreiras à entrada no mercado .....	48
4.1.7. Oportunidade de parcerias .....	49
4.2. Modelo de Negócio .....	50
4.2.1. Proposta de valor .....	50
4.2.2. Cadeia de valor .....	51
4.2.3. Modelo de receitas .....	53
4.2.4. Processo de produção .....	54
4.3. Estratégia comercial .....	54
4.3.1. Previsão de vendas .....	54
4.3.2. Riscos do produto .....	55
4.3.3. Pontos fortes da empresa .....	55
4.3.4. Definição da posição estratégica .....	56
4.3.5. <i>Marketing Mix</i> .....	57
4.3.5.1. Produto .....	57
4.3.5.2. Preço .....	57
4.3.5.3. Distribuição .....	57
4.3.5.4. Comunicação .....	60
5. Conclusões .....	63

6. Bibliografia.....	65
Anexos.....	71



## Índice de Figuras

Figura 1.1 – Representação das três etapas do PCR convencional necessárias para obtenção de produto amplificado. Este processo decorre num termociclador. (Adaptado de Berg et al., 2002 e Pelt-Verkuil et al., 2008).....	4
Figura 1.2 – Variação de temperatura durante um ciclo de PCR com diferentes tempos de exposição (adaptado Pelt-Verkuil et al., 2008).....	5
Figura 2.1 – Esquema representativo dos laboratórios de investigação e de prestação de serviços das áreas humana e veterinária da Biopremier Clínica, localizadas no primeiro piso do edifício Tec Labs, pertencentes à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, FCUL.....	15
Figura 3.1 – Gel de agarose a 1,5% (m/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras negativas de bovino (1), cão (2) e gato (3), do controlo positivo (P) <i>Babesia bovis</i> no AI_PCR 164 e <i>Ehrlichia ruminantium</i> no AI_PCR 165 e do controlo negativo (B). L – marcador de pesos moleculares. ....	23
Figura 3.2 – Géis de agarose a 1,5% (m/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras clínicas, amostra positiva de bovino com espécie sequenciada como <i>Theileria annulata</i> (1), e duas amostras negativas de cão (2) e gato (3), do controlo positivo (P) <i>Babesia bovis</i> no AI_PCR 169 e <i>Ehrlichia ruminantium</i> no AI_PCR 173.....	24
Figura 3.3 – Géis de agarose a 1,5% (m/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras positivas, anteriormente clonadas. AI_PCR 190: <i>Anaplasma marginale</i> B (1 e 2), <i>Rickettsia africae</i> clone 3 C (3 e 4), clone 5 C (5 e 6), clone 5 D (7 e 8), clone 5 E (9 e 10), <i>Ehrlichia ruminantium</i> clone 3 C (11 e 12), clone 3 D (13 e 14), clone 6 D (15 e 16) e clone 6 B diluído 1:10 (17 e 18). AI_PCR 191: <i>Theileria spp</i> clone 4 D (1 e 2), clone 4 E (3 e 4), clone 4 F (5 e 6), clone 6 D (7 e 8), clone 6 E (9 e 10), clone 6 F (11 e 12), <i>Babesia bovis</i> clone 2 D (13 e 14), clone 2 E (15 e 16), clone 2 F (17 e 18), clone 4 D (19 e 20), clone 4 E (21 e 22), clone 4 F (23 e 24) e clone 4 B diluído 1:10 (25). Considera-se que a B são 100 cópias de genoma, C são 10, D é 1, E é diluição 1:10 de D e F é diluição 1:10 da E. ....	25
Figura 3.4 – Gel de agarose a 1,5% (p/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras clínicas negativas de cão (1) e bovino (2), ambas artificialmente infectadas com <i>R. hoogstraalii</i> . Nos quatro géis o controlo positivo utilizado foi o mesmo utilizado nas <i>spiked samples</i> . AI_PCR 226 com 1,2µM de RickOF2, 0,7µM RickORev1 e 0,5µM de Euk1400F2/ITS5Rmod. AI_PCR 227 com 1,2µM de RickOF2, 0,7µM RickORev1 e 0,35µM de Euk1400F2/ITS5Rmod. AI_PCR 228 com 1,2µM de RickOF2, 0,8µM RickORev1 e 0,5µM de Euk1400F2/ITS5Rmod. AI_PCR 229 com 1,2µM de RickOF2, 0,8µM RickORev1 e 0,35µM de Euk1400F2/ITS5Rmod. ....	25
Figura 3.5 – Géis de agarose a 1,5% (p/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras clínicas negativas de gato (1), bovino (4), cavalo (7), e amostra positiva de bovino naturalmente infectada com <i>Theileria annulata</i> diluída 1:10 (5) e 1:100 (6). Para as amostras de gato e cavalo foram realizadas <i>spiked samples</i> com DNA de <i>Babesia bovis</i> diluído 1:1000 (2 e 8, respectivamente) e 1:5000 (3 e 9, respectivamente). Em ambos os ensaios foram testadas diferentes condições com as mesmas amostras. AI_PCR 240 com 0,7µM de AconoiCF2, 0,7µM AconoiCRev2 e 0,35µM de Euk1400F2/ITS5Rmod. AI_PCR 242 com 0,7µM de AconoiCF2, 0,7µM AconoiCRev2 e 0,5µM de Euk1400F2/ITS5Rmod.....	26

Figura 3.6 – Géis de agarose a 1,5% (m/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras clínicas negativas de cão (1), bovino (5), gato (9), cavalo (13), cabra (17) e ovelha (21). Para todas as amostras referidas foram realizadas *spiked samples* com DNA de *Rickettsia hoogstraalii* diluído 1:10, 1:100 e 1:1000. Em ambos os ensaios foram testados sets de *primers* diferentes com as mesmas amostras. AI\_PCR 232 com 1,2µM de RickOF2, 0,8µM RickORev1 e 0,35µM de Euk1400F2/ITS5Rmod. AI\_PCR 233 com 1,2µM de RickOF2, 0,8µM RickORev1 e 0,35µM de Euk1400F2/ITS5Rsup. .... 27

Figura 3.7 – Géis de agarose a 1,5% (m/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras clínicas negativas de cão (1), gato (4) e bovino (7). Para todas as amostras referidas foram realizadas *spiked samples* com DNA de *Rickettsia hoogstraalii* diluído 1:10 e 1:100. Em ambos os ensaios foram testados concentrações diferentes de enzima *polymerase* com as mesmas amostras. AI\_PCR 238 com 2,5U de E1. AI\_PCR 239 com 1U de E2. Ambos os ensaios com 1,2µM de RickOF2, 0,8µM RickORev1 e 0,35µM de Euk1400F2/ITS5Rsup. .... 28

Figura 3.8– Géis de agarose a 1,5% (m/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras clínicas negativas de cão (1), gato (4) e bovino (7). Para todas as amostras referidas foram realizadas *spiked samples* com DNA de *Rickettsia hoogstraalii* diluído 1:10 e 1:100. Em ambos os ensaios foram testados concentrações diferentes de enzima *polymerase* com as mesmas amostras. AI\_PCR 256 com 1U de E3. AI\_PCR 259 com 1U de E4. Ambos os ensaios com 1,2µM de RickOF2, 0,8µM RickORev1 e 0,35µM de Euk1400F2/ITS5Rsup. .... 29

Figura 3.9 – Géis de agarose a 1,5% (m/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras clínicas negativas de gato (1), bovino (4), cavalo (7), amostra positiva de bovino naturalmente infectada com *Theileria annulata* diluída 1:10 (5) e 1:100 (6) e DNA de *Cryptosporidium* (10). Para as amostras de gato e cavalo foram realizadas *spiked samples* com DNA de *Babesia bovis* diluído 1:1000 (2 e 8, respectivamente) e 1:5000 (3 e 9, respectivamente). Em ambos os ensaios foram testados concentrações diferentes de enzima *polymerase* com as mesmas amostras. AI\_PCR 266 com 2U de E1. AI\_PCR 260 com 1U de E2. Ambos os ensaios com 0,8µM de AconoiCF2/AconoiCRev2 e 0,35µM de Euk1400F2/ITS5Rmod. .... 29

Figura 3.10 – Gel de agarose a 1,5% (m/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras clínicas negativas de bovino (1), cavalo (4) e gato (7, 10 e 13). Para as amostras de bovino, cavalo e gato foram realizadas *spiked samples* com DNA de *Babesia bovis* diluído 1:1000 (2, 5, 8, 11 e 14, respectivamente) e 1:5000 (3, 6, 9, 12 e 15, respectivamente). Ensaio com 1,15mM de MgCl<sub>2</sub>, 1µM de AconoiCF2/Rev2 e 0,3µM de Euk1400F2/ITS5Rmod. .... 30

Figura 3.11 – Géis de agarose a 1,5% (m/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras positivas, anteriormente clonadas. AI\_PCR 329: *Theileria spp* clone 7 A (1), A' (2), B (3), B' (4), C (5), C' (6), D (7), D' (8), *Babesia bovis* clone 8 A (9), A' (10), B (11), B' (2), C (13), C' (14), D (15) e D' (16). AI\_PCR 330: *Anaplasma marginale* clone 4 A (1), A' (2), B (3), B' (4), C (5), C' (6), D (7), D' (8), *Rickettsia africae* clone 4 A (9), A' (10), B (11), B' (2), C (13), C' (14), D (15) D' (16), *Ehrlichia ruminantium* clone 6 A (17), A' (18), B (19), B' (20), C (21), C' (22), D (23) e D' (24). Considera-se que a A são 1000 cópias de genoma, B são 100, C são 10 e D é 1 cópia. Todas as amostras foram testadas em duplicado para testar a qualidade da extracção. AI\_PCR 329 com 1µM de AconoiCF2/AconoiCRev2 e 0,3µM de Euk1400F2/ITS5Rmod. AI\_PCR 330 com 1,2µM de RickOF2, 0,8 µM de RickORev1e 0,35µM de Euk1400F2/ITS5Rsup. .... 32

Figura 3.12 – Géis de agarose a 1,5% (p/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras positivas, anteriormente clonadas. AI_PCR 347: <i>Theileria spp</i> clone 7 C (1), C' (2), D (3), D' (4), <i>Babesia bovis</i> clone 8 C (5), C' (6), D (7) e D' (8). AI_PCR 361: <i>Anaplasma marginale</i> clone 4 A (1, 2 e 3), B (4, 5 e 6), B 1:2 (7, 8 e 9), B 1:3 (10, 11 e 12), B 1:5 (13, 14 e 15), <i>Rickettsia africae</i> clone 4 C (16), C 1:2 (17), C' (18) C' 1:2 (19), <i>Ehrlichia ruminantium</i> clone 6 A (20, 21 e 22), B (23, 24 e 25), B 1:2 (26, 27 e 28), B 1:3 (29, 30 e 31), B 1:5 (32, 33 e 34). Considera-se que a A são 1000 cópias de genoma, B são 100, C são 10 e D é 1 cópia. Todas as amostras foram testadas em duplicado para testar a qualidade da extracção. AI_PCR 347 com 1µM de AconoiCF2/AconoiCRev2 e 0,3µM de Euk1400F2/ITS5Rmod. AI_PCR 361 com 1,2µM de RickOF2, 0,8 µM de RickORev1e 0,35µM de Euk1400F2/ITS5Rsup. ....	33
Figura 3.13 – Géis de agarose a 1,5% (m/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras clínicas, estirpes de colecção, ensaios interlaboratoriais, isolados bacterianos, isolados fúngicos e DNAs de vertebrados, para os ensaios de especificidade a 58,5°C (AI_PCR 350) e 56,5°C (AI_PCR 352) para a detecção de organismos pertencentes à classe <i>Aconoidasida</i> . Ambos os ensaios com 1µM de AconoiCF2/AconoiCRev2 e 0,3µM de Euk1400F2/ITS5Rmod. ....	34
Figura 3.14 – Géis de agarose a 1,5% (p/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras clínicas, estirpes de colecção, ensaios interlaboratoriais, isolados bacterianos, isolados fúngicos e DNAs de vertebrados, para os ensaios de especificidade a 58,5°C (AI_PCR 353) e 56,5°C (AI_PCR 355) para a detecção de organismos pertencentes à ordem <i>Rickettsiales</i> . Ambos os ensaios com 1,2µM de RickOF2, 0,8 µM de RickORev1e 0,35µM de Euk1400F2/ITS5Rsup. ....	35
Figura 3.15 – Géis de agarose a 1,5% (m/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras clínicas para ensaio de sensibilidade clínica com as condições aferidas para a detecção de organismos pertencentes à classe <i>Aconoidasida</i> . AI_PCR 359 com 1µM de AconoiCF2/AconoiCRev2 e 0,3µM de Euk1400F2/ITS5Rmod. ....	36
Figura 3.16 – Géis de agarose a 1,5% (m/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras clínicas para o ensaio de sensibilidade clínica com as condições aferidas para a detecção de organismos pertencentes à ordem <i>Rickettsiales</i> . AI_PCR 360 com 1,2µM de RickOF2, 0,8 µM de RickORev1e 0,35µM de Euk1400F2/ITS5Rsup. ....	37
Figura 4.1 – Representação geográfica da distribuição mundial de laboratórios de referência segundo parâmetros de selecção da OIE. ....	41
Figura 4.2 – Representação esquemática da cadeia de valor para a venda directa do <i>kit</i> pela Biopremier. ....	51
Figura 4.3 – Representação esquemática da cadeia de valor para a venda do <i>kit</i> , recorrendo a parcerias com distribuidores. ....	51
Figura 4.4 – Representação esquemática da cadeia de valor para a prestação de serviço a partir da utilização interna do produto. ....	52
Figura 4.5 – Representação esquemática da cadeia de valor para a comercialização da inovação e do desenvolvimento. ....	52



## Índice de Tabelas

Tabela 2.1 – Lista de <i>primers</i> utilizados no estudo e desenvolvimento de testes em regiões alvo. ....	18
Tabela 2.2 – Fórmulas para calcular os índices de especificidade, sensibilidade clínica e precisão, e os respectivos valores de aceitação para avaliação do teste desenvolvido. Considera-se que RN – resultado negativo, RP – resultado positivo, FP – falso positivo e FN – falso negativo (Kawamura, 2002). .....	19
Tabela 2.3 – Lista de amostras usadas nos ensaios de especificidade ( <i>Rick</i> – <i>Rickettsiales</i> e <i>Aconoi</i> – <i>Aconoidasida</i> ). Encontram-se marcados com (x) as amostras que foram submetidas a cada um dos testes. ....	20
Tabela 2.4 – Espécies utilizadas para os ensaios de sensibilidade analítica, vindas de uma parceria com o Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD). ....	22
Tabela 3.1 – Diferentes programas testados com diferentes tempos para cada fase de um ciclo de PCR, desnaturação, <i>annealing</i> e extensão. ....	31
Tabela 4.1 – Lista de laboratórios de referência com condições para a realização de biologia molecular, em países como Austrália, Brasil, China, Europa, EUA e Portugal. ....	41
Tabela 4.2 – Número de cabeças de gado em 2013 dos principais produtores mundiais. ....	42
Tabela 4.3 – Número de equinos em 2013 dos principais produtores mundiais. ....	42
Tabela 4.4 – Principais laboratórios de diagnóstico veterinário em Portugal com os respectivos números de testes de detecção de anemia infecciosa, em todo o tipo de animais, realizados por ano. ....	43
Tabela 4.5 – Representação anual do número de testes realizados nos principais países produtores de gado bovino e de equinos, estimando o valor aproximado de <i>kits</i> com potencial comercialização, considerando que o mercado potencial corresponde à mesma razão de testes realizados a animais de estimação e ao número destes animais em Portugal em 2013. ....	44
Tabela 4.6 – Dados adquiridos a partir da consulta dos <i>sites</i> de empresas que apresentam um largo <i>portfólio</i> de testes de diagnóstico veterinário, e que comercializam, especificamente, <i>kits</i> de PCR para detecção de anemia infecciosa, na área veterinária. ( <i>Rick</i> – Espécies pertencentes à ordem <i>Rickettsiales</i> , <i>Aconoi</i> – Espécies pertencentes à classe <i>Aconoidasida</i> ) ....	46
Tabela 4.7 – Lista dos principais distribuidores nas regiões demográficas consideradas no estudo dos laboratórios de referência. ....	57
Tabela 4.8 – Levantamento das principais feiras internacionais na área veterinária. ....	60
Tabela 4.9 – Levantamento de alguns congressos internacionais que permitem a divulgação do produto desenvolvido. ....	61



## Lista de Abreviaturas

CE – Conformidade Europeia (do francês: *Conformité Européene*)

CPI – Controlo Positivo Interno

DIV – Diagnóstico *In Vitro*

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês: *Deoxyribonucleic Acid*)

dNTPS – Desoxirribonucleotídeos fosfatados (do inglês: *Nucleotide triphosphates*)

ELISA – Teste imunoenzimático (do inglês: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

IEC – *International Electrotechnical Commission*

IFA – Imunofluorescência de anticorpos (do inglês: *Immunofluorescence Antibody assay*)

ISO – *International Organization for Standardization*

LBA – *Luria-Bertani Agar*

OIE – *World Organisation for Animal Health*

pb – Pares de bases

PBS – Tampão fosfato salino (do inglês: *Phosphate Buffered Saline*)

PCR – Reacção de cadeia da polimerase (do inglês: *Polymerase Chain Reaction*)

SGS – Sociedade Geral de Superintendencia SA

TBE –Tris-Borato-EDTA

UV – Ultra-Violeta

## Lista de Unidades

C – Celsius

L – Litro; mL – Mililitro ( $10^{-3}$  L);  $\mu$ L – Microlitro ( $10^{-6}$  L)

Kg – Quilogramas; g – Gramas ( $10^{-3}$  Kg); ng – Nanogramas ( $10^{-9}$  Kg)

M – Molar (mol/L); mM – Milimolar ( $10^{-3}$  M);  $\mu$ M – Micromolar ( $10^{-6}$  M); nM – Nanomolar ( $10^{-9}$  M)

rpm – Rotações Por Minuto

min – Minuto

h – Hora

seg – Segundos

V – Volts

% (m/v) – Percentagem massa/volume

% (p/v) – Percentagem peso/volume

## Lista de Símbolos

% – Percentagem

$\geq$  – Maior ou igual

$^{\circ}$  – Grau

$\approx$  – Aproximadamente

# 1. Introdução

## 1.1. Biopremier

### 1.1.1. A empresa

A Biopremier foi fundada em 2003 por dois investigadores, Manuel Rodrigues e Mário Gadanho. O desafio era criar uma empresa biotecnológica, especializada no desenvolvimento e inovação de produtos de diagnóstico na área da biologia molecular, e na prestação de serviços especializados, essencialmente para Instituições e Universidades Europeias.

Em 2006, recebeu o estatuto de Nova Empresa de Suporte Tecnológico (NEST) e a homologação IAPMEI (Agência Para Competitividade e Inovação, I.P.), tal como várias fontes de financiamento, capital de risco, PME Capital e Biocant Ventures, permitindo assim a construção de novos laboratórios que se encontram no Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia (ICAT), na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Com o aumento de capital surgiu a contratação de recursos humanos com formação superior e um maior desenvolvimento de novos serviços de diagnóstico com diferenciação no seu intervalo de confiança e na rapidez de obtenção de resultados. Deste modo, foi possível desenvolver investigação que permitiu aumentar o *portfólio* de testes a realizar para a indústria, com o objectivo de acompanhar as necessidades dos seus clientes primeiramente na área agro-alimentar e depois na área clínica. Os laboratórios foram construídos para a aplicação de técnicas baseadas na manipulação de DNA e a fim de minimizar a possibilidade de contaminação das amostras biológicas.

Em 2009, novos testes para a identificação de espécies alimentares foram finalizados após investigação, conseguindo o primeiro cliente na área da distribuição a retalho.

Durante o ano de 2010, a investigação na área da saúde deu os primeiros passos no desenvolvimento de dois *kits* de diagnóstico *in vitro* (DIV) a aplicar nos casos de doenças infecciosas respiratórias inferiores e gastrointestinais. Em 2011, a empresa obteve acreditação, de acordo com a Norma ISO/IEC 17025:2005 (*International Organization for Standardization / International Electrotechnical Commission*), para 25 testes de biologia molecular, nos quais se destacam os testes de identificação de espécies em misturas.

O ano de 2011 foi um ano de decisões marcantes para a empresa, iniciou-se o desenvolvimento dos primeiros testes de diagnóstico veterinário, e foi a primeira empresa de biotecnologia portuguesa a estar cotada no segmento *Open Market* da Bolsa de Valores de Frankfurt. A saída da bolsa foi uma decisão dos accionistas com o objectivo de concentrar capital. Esta estratégia tinha como objectivo acelerar a investigação e o desenvolvimento.

Em Janeiro de 2014, o departamento clínico obteve através da SGS UK, a Certificação de Fabricante de Produtos de Diagnóstico *In Vitro*, de acordo com a Norma ISO 13485, permitindo que os primeiros *kits* de diagnóstico agro-alimentar e clínica fossem comercializados na Europa com a marcação CE IVD (*Conformité Européene*), requisito legal para efeitos de diagnóstico na área da saúde.

A entrada no mercado internacional requer que a Biopremier seja uma empresa de referência no desenvolvimento de produtos de diagnóstico molecular e na prestação de serviços especializados nas áreas. Neste momento querem destacar-se das fortes empresas no mercado Europeu pela inovação e

diferenciação dos seus produtos e serviços, sendo a única entidade privada portuguesa com testes de DNA acreditados e dos poucos laboratórios acreditados no país.

Actualmente, a Biopremier continua a investir na qualidade dos seus serviços e todo esse trabalho é possível devido aos 26 funcionários que realizam funções especializadas na empresa. A apresentação de novos projectos de pesquisa e desenvolvimento de novos produtos no sector agro-alimentar e clínico são factores que levam ao crescimento da empresa e inovação em biotecnologia.

### 1.1.2. Serviços clínicos

O principal objectivo da Biopremier Clínica é o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico aplicados às áreas humana e veterinária, que podem ser comercializados como produtos DIV ou podem ser serviços prestados pelo laboratório.

Este departamento da empresa tem um *portfólio* alargado de serviços disponíveis, devidamente acreditados e com um curto tempo de resposta. Todos estes testes foram desenvolvidos pelo grupo de investigadores da empresa, permitindo que os mesmos sejam apresentados ao mercado como testes confiáveis.

Os seguintes testes podem ser realizados dentro de 24 horas (h):

Clínica Humana – Real-Time PCR

- Detecção de *Mycobacterium tuberculosis complex*;
- Detecção de *Legionella spp.* e *Mycoplasma pneumoniae*;
- Detecção de *Enterocytozoon bieneusi* e *Encephalitozoon spp.*

Clínica Veterinária – PCR

- Detecção de *E.coli* patogénica (EPEC, EHEC, STEC/VTEC) e *Salmonella*;
- Detecção de agentes causadores de anemia infecciosa – bactérias pertencentes à ordem *Rickettsiales*, excepto género *Wolbachia*, e parasitas pertencentes à classe *Aconoidasida*, excepto género *Plasmodium*;
- Detecção de *Mycoplasmatales*;
- Detecção de *Dermatophytes*;
- Detecção de *Chlamydia psittaci*.

Além disso, a identificação das espécies ou mutações por sequenciação de DNA também são realizados aos seguintes organismos:

- *Mycobacterium spp.*;
- Bactérias;
- Mutações associadas à resistência com rifampicina em *M. tuberculosis*;
- Fungos;
- Parasitas;
- Espécies exóticas (vertebrados);
- Mutações genéticas associadas à trombofilia.

Estes testes podem demorar entre 4 a 7 dias para obter resultados. Testes mais complexos podem demorar 2 a 3 semanas para identificação, por exemplo, quando a bactéria se encontra numa mistura, em caso de fungos ou avaliação da diversidade microbiana.

## 1.2. Técnica de PCR

### 1.2.1. PCR convencional

Os testes de diagnóstico *in vitro* são dispositivos médicos não invasivos que fazem a análise da amostra biológica por detecção de um parâmetro específico. Para esta análise recorre-se à técnica de reacção em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*).

A técnica de PCR é um método convencional utilizado nos laboratórios de microbiologia e de biologia molecular para identificação, caracterização e quantificação de organismos (Schuller et al., 2010) em amostras que contenham DNA.

Esta técnica, desenvolvida por Kary Mullis et al. em 1985 (Mullis, 1986), permite um diagnóstico rápido na detecção de agentes patogénicos e de doenças genéticas (Berg et al., 2002) por identificação de espécies clínicas específicas, superando, assim, a microbiologia clássica, que exige mais tempo, espaço e técnicos de laboratório.

O método de PCR é utilizado, essencialmente, para a amplificação de uma determinada sequência de DNA, isto é, a replicação ocorre num fragmento específico de DNA para posteriormente ser feita a detecção da presença ou ausência da sequência do organismo de interesse. Para que ocorra a replicação do fragmento específico é necessário dispor de uma sequência alvo de DNA e de uma mistura de reagentes, tais como *primers*, desoxiribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), tampão de reacção, iões de magnésio ( $MgCl_2$ ) e de uma enzima polimerase, combinados com dezenas de ciclos com variações de temperatura (Kubista et al., 2006; Mullis et al., 1986).

Os *primers* são sintetizados com sequências conhecidas entre 14 e 30 nucleótidos (Schuller et al., 2010), complementares à região a montante ou a jusante de cada cadeia de DNA em solução, respectivamente referidos como *forward* e *reverse*. Estas moléculas actuam como iniciadores, fazendo o *annealing* à sequência alvo, permitindo a acção da polimerase (Pelt-Verkuil et al., 2008). Os dNTPs são nucleótidos do DNA formados por adenosina, citidina, guanosina e timidina trifosfatados, que funcionam como tijolos, permitindo que a enzima polimerase crie uma nova cadeia de DNA. Esta enzima tem propriedades geralmente termoestáveis, porque é isolada a partir de organismos que vivem em ambientes extremos (Videira, 2011). O tampão de reacção é composto por alguns reagentes que irão melhorar a eficiência da reacção com o objectivo específico a que foi concebido.

Na Figura 1.1 encontra-se representada esta técnica, que envolve três passos diferentes: desnaturação, *annealing* e extensão, as quais representam apenas um único ciclo.

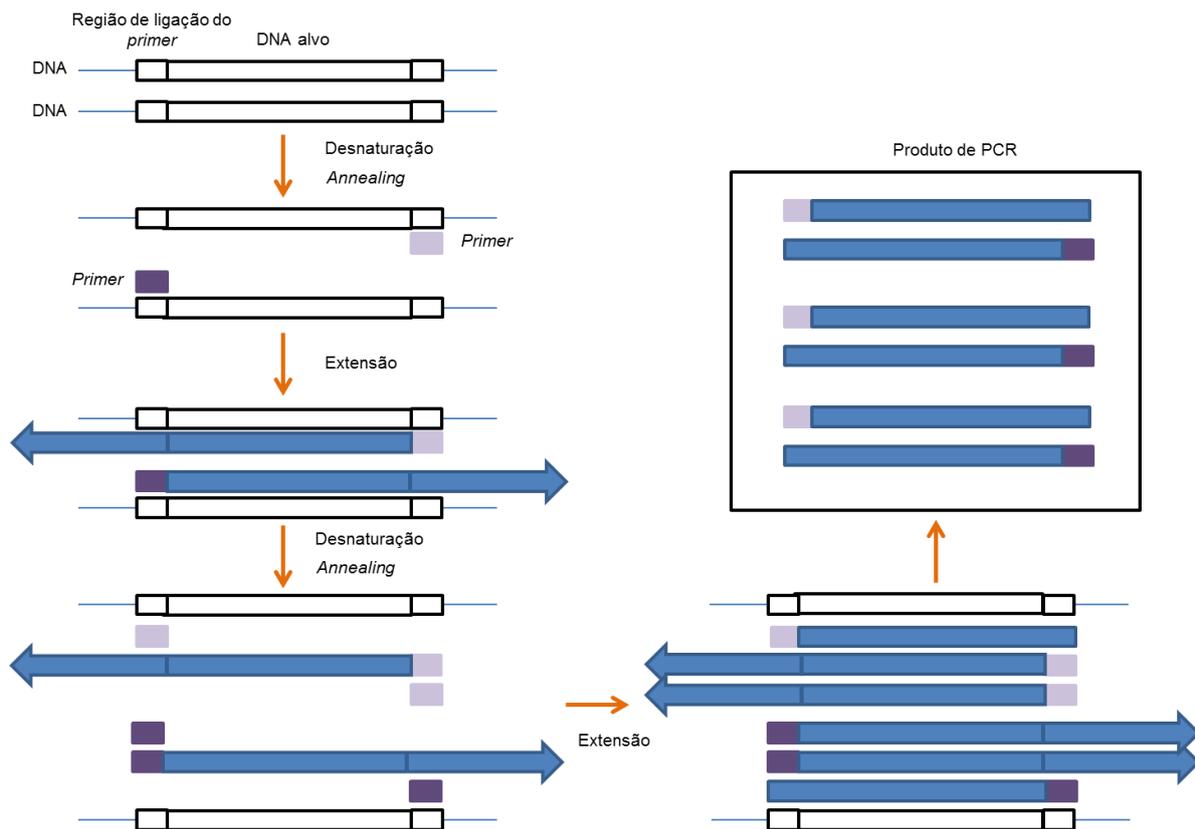


Figura 1.1 – Representação das três etapas do PCR convencional necessárias para obtenção de produto amplificado. Este processo decorre num termociclador. (Adaptado de Berg et al., 2002 e Pelt-Verkuil et al., 2008).

Assim como presente no primeiro passo da figura acima representada, o aumento da temperatura até valores acima de 90°C leva a um posterior resultado na desnaturação de ambas as cadeias de DNA, pelo que a temperatura é então ajustada, geralmente para temperaturas compreendidas entre 40°C – 65°C, permitindo, em determinadas condições, o reconhecimento dos *primers* para as sequências alvo, fase esta que é conhecida como *annealing*. Após o emparelhamento dos *primers*, a polimerase inicia a adição de nucleótidos à extremidade 3' da nova cadeia de DNA e a temperatura é geralmente aumentada até à temperatura óptima da enzima, esta fase é conhecida como extensão. Assim, o material original bem como os novos fragmentos de DNA em cadeia dupla irão ser usados como *template* para um novo ciclo, este processo continua até ao final da reacção de PCR, o que resulta em milhões de cópias de fragmentos de DNA amplificados exponencialmente.

Cada reacção de PCR tem geralmente entre 30 a 50 ciclos de 3 passos. O termociclador é o equipamento utilizado para programar os ciclos de temperatura e o tempo da reacção de PCR.

Na Figura 1.2 mostra-se a variação de temperatura que ocorre em várias fases de amplificação num único ciclo de PCR.

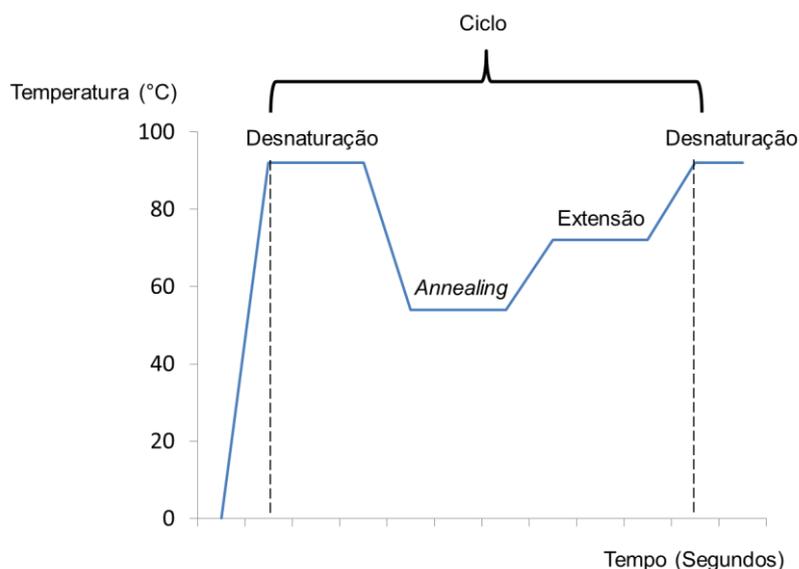


Figura 1.2 – Variação de temperatura durante um ciclo de PCR com diferentes tempos de exposição (adaptado Pelt-Verkuil et al., 2008).

Na fase de desnaturação são aplicadas temperaturas acima dos 90°C, geralmente entre 0 e 60 segundos, a fim de se separar a dupla cadeia de DNA. A temperatura de *annealing* é normalmente definida entre 40°C e 65°C uma vez que depende da composição, do comprimento e da sequência dos *primers* (Mullis et al., 1986; Schuller et al., 2010), bem como a dificuldade ou facilidade ao acesso ao DNA alvo e a condições químicas. Normalmente, para o passo de extensão, a temperatura é aumentada para 72°C, melhorando a eficácia da reacção entre a polimerase e o DNA (Kubista et al., 2006).

A observação e análise dos resultados da reacção de PCR são tradicionalmente realizadas por electroforese em gel de agarose com coloração de brometo de etídio (EtBr), podendo ser utilizados outros métodos, tais como, a visualização de diferenças colorimétricas utilizando nanopartículas, ou a detecção por fluorescência com marcação de DNA.

### 1.2.2. PCR *multiplex* no diagnóstico molecular

Os ensaios de PCR podem ser desenvolvidos para detectar mais do que um alvo específico, o qual é chamado de PCR *multiplex* (Schuller et al., 2010). Esta técnica é muito mais económica em termos de tempo, reagentes e de recursos humanos, uma vez que permite a detecção de vários alvos numa só reacção de PCR.

Enquanto o método convencional usa apenas um par de *primers* para um único alvo, o PCR *multiplex* utiliza múltiplos pares de *primers* específicos, dando-se a amplificação de diferentes regiões de DNA, sendo estas as sequências alvo de detecção. Como há mais de um par de *primers*, deve prestar-se especial atenção às interações entre os *primers*, podendo ocorrer hibridação cruzada (Pelt-Verkuil et al., 2008). Assim, todas as condições da reacção devem ser estudadas e optimizadas, a fim de evitar competição pelos reagentes (Schuller et al., 2010).

O facto dos *primers* serem diferentes, pode conduzir à amplificação de sequências de DNA com tamanhos diferentes, o qual pode ser visualizado na electroforese em gel de agarose. Assim, se a análise for realizada por electroforese em gel, os produtos de PCR devem ter tamanhos diferentes, a fim de serem vistos separadamente.

### 1.3. Testes clínicos

O teste DIV para a anemia infecciosa detecta e diferencia bactérias que pertencem à ordem *Rickettsiales* e parasitas pertencentes à classe *Aconoidasida*. Dependendo dos microorganismos patogénicos, estes podem infectar humanos e/ou animais, podendo também causar co-infecção uma vez que o agente infeccioso pode ser o mesmo (Cardoso et al., 2010).

#### 1.3.1. Ordem *Rickettsiales*

A maioria das células eucarióticas têm defesas que dificultam a entrada de procariontes. No entanto, se os mecanismos de defesa falham, o crescimento de bactérias no meio intracelular tira facilmente benefícios das defesas do hospedeiro e de substratos e enzimas para o seu metabolismo (Fredricks, 2006).

Anteriormente, qualquer bactéria que necessitasse de ambiente intracelular para o crescimento seria classificada como pertencentes à ordem *Rickettsiales* (Moulder, 1974).

O 16S do DNA ribossomal é o gene mais utilizado na taxonomia bacteriana e em análises filogenéticas de bactérias e, apesar de ser um gene muito conservado, a presença de regiões variáveis fornecem informações importantes para o processo de identificação de espécies de bactérias.

Esta ordem é um grupo monofilético, ou seja, com ancestral comum (Yu and Walker, 2006) que pertence à classe  $\alpha$ -proteobacteria (Dumler et al., 2001) e são bactérias gram negativas (Breed et al., 1957; Fredricks, 2006; Roux and Raoult, 2000; Yu and Walker, 2006). Segundo Dumler et al. (2001), a ordem *Rickettsiales* contem as famílias *Rickettsiaceae* e *Anaplasmataceae*. Em 2005, Gortz e Schmidt propuseram uma terceira família, *Holosporaceae* (Kang et al., 2014) e, em 2013, Montagna et al. propuseram uma nova família, *Midichloriaceae*.

No entanto, a falta de proteomas nas bases de dados, em 2011 (Georgiades et al., 2011), levou a duvidar da organização filogenética da família *Holosporaceae*, a qual pertencia à ordem *Rickettsiales*. No entanto, Grote et al. em 2012 propuseram uma nova ordem, *Pelagibacterales*, que se considera “irmã” da ordem *Rickettsiales*, mostrando uma proximidade quanto à origem mitocondrial. Em 2013, Ferla et al., propuseram que a família *Holosporaceae* deixasse de pertencer à ordem *Rickettsiales* e fosse considerada uma nova ordem, *Holosporales*, fazendo parte da subclasse *Caulobacteridae*.

De acordo com a classificação tradicional descrita no Bergey's Manual of Determinative Bacteriology em 1957, a família *Anaplasmataceae* incluía o género *Anaplasma* e a família *Rickettsiaceae* incluía os géneros *Rickettsia*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Wolbachia* e *Rickettsiella*. Com base na análise filogenética de sequências de genes 16S rRNA e no rearranjo genómico de genes de rRNA precedeu-se à divergência das duas famílias, em que muitas espécies classificadas tradicionalmente como

*Rickettsiales* foram removidas das famílias *Rickettsiaceae* e *Anaplasmataceae* (Yu and Walker, 2006). Estes incluem *Rickettsiella grylli*, *Coxiella burnetii*, *Wolbachia persica*, *Bartonella*, *Grahamella*, *Eperitrozoon ovis*, *Hemobartonella felis* e *Hemobartonella muris* (Yu and Walker, 2006). Actualmente, a família *Anaplasmataceae* inclui cinco géneros, *Wolbachia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia* e *Aegyptianella*, e a família *Rickettsiaceae* inclui os géneros *Rickettsia* e *Orientia*.

Bactérias pertencentes à ordem *Rickettsiales* são parasitas intracelulares obrigatórios (Breed et al., 1957; Kang et al., 2014; Roux and Raoult, 2000), ou seja, apenas conseguem reproduzir-se no interior de outras células, utilizando os recursos das mesmas. Estas bactérias residem num vacúolo citoplasmático no intestino médio ou nas células das glândulas salivares do agente de transmissão, infectando monócitos, macrófagos e neutrófilos do hospedeiro, infectando o endotélio (Yu and Walker, 2006).

Após entrarem na pele, através de uma picada de carrapato, são fagocitados pela célula hospedeira (Yu and Walker, 2006). Ao longo do tempo, desenvolveram mecanismos para impedir a activação das defesas intracelulares do hospedeiro, bloqueando vias de transdução de sinal (Barnewall et al., 1999).

Os agentes classificados como *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Wolbachia* e *Neorickettsia* podem causar doenças epidémicas, como febre maculosa, ehrliquiose humana e anaplasmoose bovina (Breed et al., 1957; Yu and Walker, 2006). Com as alterações climáticas, hábitos alimentares e a aquisição de resistências a longo prazo, estas espécies podem sofrer mutações e adquirir novas características. Os géneros apresentados são patogénicos para mamíferos, revelando grande importância económica (Yu and Walker, 2006) principalmente na área veterinária.

As patologias provocadas por agentes da ordem *Rickettsiales* são transmitidas por vectores, estando geralmente associadas a ácaros, carrapatos, aranhas e insectos, ou ainda irritações cutâneas causadas por fezes de piolho ou pulga (Breed et al., 1957; Reardon and Pierce, 1981; Roux and Raoult, 2000; Walker, 1996). As patologias com maior relevância clínica são provocadas por agentes dos géneros *Rickettsia*, *Ehrlichia* e *Anaplasma* (Breed et al., 1957; Vannini et al., 2010).

### **1.3.1.1. Género *Rickettsia***

O género *Rickettsia* é dividido em dois grupos: o grupo da febre maculosa que inclui *R. akari*, *R. australis*, *R. africae*, *R. conorii*, *R. honei*, *R. japonica*, *R. sibirica*, *R. helvetica*, *R. slovacica*, *R. massiliae*, *R. rhipicephali*, *R. aeschlimannii*, *R. montanensis* e *R. parkeri*, e o grupo do tifo que inclui *R. prowazekii*, *R. typhi* e suspeita-se que *R. felis* também esteja incluída neste último grupo (Walker, 1996; Roux e Raoult, 2000). Espécies como *R. bellii* e *R. canadensis* não se encontram em nenhum dos grupos mencionados.

Esta divisão foi feita com base na diferença da estrutura antigénica (Bouyer et al., 2001), que se encontram no exterior da membrana de bactérias gram negativas.

*Rickettsias* são transmitidas por artrópodes (carrapatos, ácaros, pulgas e piolhos) (Walker, 1996) por uma picada ou através de contacto directo com pele danificada, após a entrada na corrente sanguínea e chegada às células alvo. As *Rickettsias* infectam as células endoteliais disseminando-se pelas células adjacentes, permanecendo no citoplasma da célula hospedeira eucariótica, onde se dividem por divisão binária (Walker, 1996; Yu and Walker, 2006).

A infecção generaliza-se e surgem focos de vasos sanguíneos contíguos infectados, que a nível cutâneo se podem manifestar como zonas de vermelhidão. Observa-se um aumento da permeabilidade vascular, com edema, diminuição do volume sanguíneo, hipoalbuminémia, diminuição da pressão osmótica e hipotensão. Estas situações podem resultar em edema pulmonar com dispneia aguda, choque ou necrose tubular aguda (Yu and Walker, 2006).

Algumas espécies de *Rickettsia* têm uma distribuição geográfica específica, e parte delas são sazonais (Fredricks, 2006; Roux and Raoult, 2000; Yu and Walker, 2006).

Nas rickettsioses destacam-se a febre botonosa, cujo agente etiológico é *Rickettsia conorii*, e a febre das montanhas rochosas, provocada por *Rickettsia rickettsii*, há ainda outras patologias que são também clinicamente relevantes, como o tifo epidémico, provocado por *Rickettsia prowazekii*, cujo vector é o piolho humano (Breed et al., 1957). A ocorrência destas doenças pode ter um número significativo de mortes se não for tratado com um agente antirickettsial no início da infecção (Yu and Walker, 2006).

A febre botonosa, endémica em Portugal (Galvão et al., 2005), é uma febre exantemática provocada por *Rickettsia conorii* (Yu and Walker, 2006), sendo mais frequente nos meses quentes. A transmissão pode ocorrer por fixação da carraça ao hospedeiro ou por contaminação das mucosas com macerados de ixodídeos infectados, por esta razão encontra-se mais prevalente nas zonas rurais afectando sobretudo crianças (Fredricks, 2006). A doença caracteriza-se inicialmente por febre súbita e elevada, que responde mal à presença de antipiréticos, cefaleias intensas, fotofobia, alterações gastrointestinais, e por vezes é possível observar-se uma ou mais escaras de inoculação, não dolorosas e raramente pruriginosas (Yu and Walker, 2006).

A febre das montanhas rochosas, provocada por *Rickettsia rickettsii*, apresenta também um quadro sintomatológico inespecífico. Após um período de incubação de 2 a 14 dias, surgem febre, cefaleias, mialgias, posteriormente podem surgir dores abdominais e articulares e diarreia, bem como fotofobia e sede (Fredricks, 2006; Walker, 1996; Yu and Walker, 2006). As lesões características da doença como vermelhidão e petéquias, não surgem antes do sexto dia, e só ocorrem em 50 a 80% dos casos (Yu and Walker, 2006).

#### **1.3.1.2. Género *Ehrlichia***

O género *Ehrlichia* inclui espécies como *E. canis*, *E. ruminantium*, *E. ovina*, *E. chaffeensis*, *E. muris*, *E. ewingii* e *E. mineirensis*. As erlichioses são provocadas por agentes dos géneros *Ehrlichia* e são transmitidas por mordedura de carraça, com um período de incubação de 1 a 2 semanas, podendo ocorrer em humanos e principalmente em cães (Nicholson et al., 2010). Estes casos ocorrem entre abril e setembro, com maior ocorrência em maio, junho e julho (Yu and Walker, 2006).

A espécie mais patogénica é *Ehrlichia chaffeensis*, o agente da erlichiose monocítica humana, que infecta os monócitos (Yu and Walker, 2006). Os sintomas são inespecíficos, assemelhando-se a um quadro clínico de gripe, e incluem febre súbita, cefaleias, mialgias, fadiga e também injeção conjuntival (Fredricks, 2006; Yu and Walker, 2006; Nicholson et al., 2010). A incidência específica para pacientes mais velhos sugere a importância de factores do hospedeiro na doença.

A erlichiose canina monocítica é causada pela espécie *E. canis* que tem sido descrita como apresentando três etapas sequenciais: doença aguda, fase subclínica, e doença crónica, muitas vezes levando à morte. A doença aguda provoca leve e moderada febre, anorexia e actividade diminuída. A avaliação laboratorial revela trombocitopenia e leucopenia durante a fase subclínica quando o animal parece saudável. A fase terminal da erlichiose canina monocítica crónica envolve hipoplasia da medula óssea, no caso de haver hemorragia o animal pode mesmo morrer (Reardon e Pierce, 1981; Waner and Harrus, 2013).

A espécie *E. ruminantium* causa uma doença infecciosa aguda e muitas vezes fatal nos bovinos, ovinos, caprinos e em certas espécies de animais selvagens, estando associada à infecção endotelial no cérebro e com derrame no pericárdio.

#### **1.3.1.3. Género *Anaplasma***

O género *Anaplasma* inclui *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis*, *A. bovis*, *A. phagocytophilum* e *A. platys* (Dumler et al., 2001). As três últimas espécies eram anteriormente classificadas no género *Ehrlichia*, em que *A. phagocytophilum* é um agente de erlichiose granulocítica humana (Dumler et al., 2001).

Anaplasmosse bovina é uma doença presente em todo o mundo, transmitida por carraça, com prevalência substancial nos trópicos e subtropicais e que afecta significativamente a produção mundial de carne bem como de produtos lácteos (Fredricks, 2006; Yu and Walker, 2006). A maioria dos casos ocorrem durante o verão com picos de ocorrência em junho e julho, que coincide com a idade adulta dos carrapatos (Yu and Walker, 2006).

O período de incubação é de 1 a 2 semanas, tal como nas erlichioses, sendo que a história clínica é de extrema importância, no caso de ser identificada a possibilidade de contacto com o vector (Eddlestone et al., 2007). Frequentemente observa-se anemia, leucopenia, trombocitopenia e hipoalbuminémia. Nos casos mais graves, que ocorrem com frequência em doentes imunocomprometidos, e em situações extremas podem ocorrer dispneia, falência renal, distúrbios neurológicos e hemorragias, com desfecho por vezes fatal.

#### **1.3.1.4. Diagnóstico**

O diagnóstico deste tipo de patologias é geralmente baseado apenas na avaliação clínica do animal, associado ao histórico de contacto com o vector, quando mencionado, e à situação epidemiológica, como a época do ano, relato de actividade em zonas arborizadas nas duas semanas anteriores, e contacto próximo com outros animais.

A presença de febre, exantema e escara é sugestiva de infecção por *Rickettsia*. Laboratorialmente associa-se a avaliação do hemograma, a observação de esfregaços de sangue periférico e testes serológicos, que no entanto têm pouco valor no diagnóstico precoce de infecções agudas, pois a detecção dos anticorpos só é possível a partir dos 7 a 10 dias de evolução da doença (Bernabeu-Wittela and Segura-Porta, 2005).

Nas suspeitas por *Rickettsia rickettsii* está referido, além da serologia, também o diagnóstico por imunohistoquímica a partir de biópsia, mas este teste apresenta 70% de sensibilidade (Yu and Walker,

2006) devido à distribuição focal dos agentes nas lesões, além de não estar disponível em muitos laboratórios.

Os kits de imunoenaios estão disponíveis comercialmente para *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. typhi* e *O. tsutsugamushi* considerando 88% de sensibilidade (Yu and Walker, 2006).

O diagnóstico baseado em testes serológicos é retrospectivo, pelo que a detecção por PCR a partir de amostras de sangue ou de biópsias das lesões cutâneas (exantema ou escaras) é o método com maior sensibilidade na fase aguda da doença, no entanto esta técnica não é frequentemente disponibilizada.

A observação de corpos de inclusão (mórulas) no citoplasma dos leucócitos pode ser sugestiva de infecção por agentes dos géneros *Ehrlichia* ou *Anaplasma* (Eddlestone et al., 2007; Fredricks, 2006). A imunofluorescência de anticorpos (IFA) é a técnica mais solicitada pelos laboratórios para o diagnóstico (Eddlestone et al., 2007). Na primeira semana pode ser efectuado um esfregaço de sangue periférico, onde é possível observar mórulas do parasita no citoplasma dos leucócitos, mas este teste requer um observador experiente e não tem valor de diagnóstico (Bernabeu-Wittela and Segura-Porta, 2005). A detecção de DNA do agente por PCR é possível durante a primeira semana de infecção, quando os testes serológicos ainda não podem ser aplicados, sendo considerado o método de diagnóstico mais sensível antes do início da antibioterapia (Wen et al., 1997).

Adicionalmente, os testes disponíveis no mercado apenas permitem a pesquisa discriminada por género de agente, sendo necessário efectuar vários testes para se conseguir avaliar a presença dos vários tipos de agentes possíveis associados a este tipo de quadro clínico, o que torna o processo muito dispendioso.

#### **1.3.1.5. Tratamento**

Visto que este tipo de organismos infectam células do sangue e endotélio, há a possibilidade de poderem ser transmitidas por transfusões sanguíneas ou transplantes de órgãos, pelo que a avaliação para estes agentes é frequentemente recomendada.

Deve ser enfatizado que *Rickettsias* são altamente resistentes à maioria dos antibióticos e o antibiótico de eleição para este tipo de patologias é a doxiciclina (Walker, 1996; Waner and Harrus, 2013) e, em caso de suspeita, é recomendado que seja iniciado empiricamente enquanto se aguardam os resultados laboratoriais, visto poder haver situações clínicas bastante graves mesmo em pacientes anteriormente saudáveis, e tendo em conta a falta de testes de diagnóstico adequados a uma detecção precoce de infecção aguda (Bernabeu-Wittela and Segura-Porta, 2005).

Anaplasmoses e erlichioses em animais poderiam ser controladas e prevenidas pelo controle de artrópodes, utilizando a quimioprofilaxia e a imunização com vacinas.

#### **1.3.2. Classe *Aconoidasida***

Da mesma forma que as bactérias têm genes ribossomais específicos que permitem a identificação de espécies e a construção de redes filogenéticas organizadas, os organismos eucariotas possuem três genes, 28S, 18S e 5,8S (Lack et al., 2012; Rooney, 2004).

A classe *Aconoidasida*, à qual pertencem os parasitas sanguíneos, é composta por duas ordens, *Haemosporida* e *Piroplasmida* (Goater et al. 2014). Espécies incluídas nas famílias *Haemoproteidae*, *Leucocytozoidae* e *Plasmodiida*, classificadas como pertencendo à ordem *Haemosporida*, são parasitas intracelulares obrigatórios (Goater et al., 2014). A ordem *Piroplasmida* são parasitas intracelulares que inclui os géneros *Theileria*, *Babesia* e *Cytauxzoon* (Adi and Simpson, 2012; Goater et al., 2014) e *Rangelia*, na qual a região variável para a identificação filogenética de organismos pertencentes à ordem *Piroplasmida* é no gene 18S (Hunfeld et al., 2008; Lack et al., 2012). Estudos da filogenia molecular revelaram monofilétismo de hematozoários, considerando assim que os *Piroplasmas* e *Haemosporidia* são grupos monofiléticos (Goater et al., 2014).

Parasitas pertencentes à classe *Aconoidasida* residem num vacúolo parasitóforo nas paredes do intestino do agente de transmissão, infectando eritrócitos (Sleigh, 1989), linfócitos e células endoteliais do hospedeiro dependendo do agente parasitário (Bowman, 2014), permitindo a alteração da estrutura e da função das células infectadas (Gohil et al., 2010).

As principais patologias conferidas pela presença de parasitas desta classe são classificadas como febre *red-water* em bovinos (Sleigh, 1989), febre do Texas ou babesiose bovina (Bowman, 2014), febre da carraça, babesiose equina (Zajac and Conboy, 2012), febre East Coast (Elsheikha and Khan, 2011; Bowman, 2014), babesiose, theileriose e citauxzoonose (Bowman, 2014; Goater et al., 2014). São também denominadas por doenças hemorrágicas. Estas são transmitidas por vectores como mosquitos e carraças (Bowman, 2014; Goater et al., 2014), geralmente espécies pertencentes aos géneros *Dermacentor*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus*, e ocasionalmente por *Boophilus microplus* (EFTBA, 2014).

Organismos pertencentes à classe *Aconoidasida* têm grande importância nas doenças emergentes na medicina veterinária, especialmente em bovinos, cavalos e animais domésticos (Goater et al., 2014; Nehrbass-Stuedli et al., 2011). Os agentes classificados como *Babesia*, *Theileria* e *Cytauxzoon* são os principais parasitas que infectam mamíferos como animais domésticos (Sleigh, 1989), bovinos e cavalos, causando doenças que resultam em elevadas perdas na produção animal e nos seus subprodutos. A sua distribuição demográfica incide essencialmente no Sul da América, Austrália, Europa e regiões tropicais e subtropicais (Bock et al., 2004; Hunfeld et al., 2008; Irwin, 2009; Nehrbass-Stuedli et al., 2011;).

#### **1.3.2.1. Género *Babesia***

Os microorganismos pertencentes ao género *Babesia* estão presentes no intestino e na parede do intestino da carraça (Bowman, 2014). Afectam essencialmente bovinos, ovelhas, cabras, cavalos e cães (Bowman, 2014), principalmente em países tropicais e subtropicais (OIE, 2013).

As células infectadas são os eritrócitos do hospedeiro (Hunfeld et al., 2008) tendo um período de incubação que pode variar entre 2 e 3 semanas dependendo da espécie à qual o hospedeiro foi exposto (CFSPH, 2008). Os eritrócitos multiplicam-se devido à resposta imunitária do organismo (Bowman, 2014; Elsheikha and Khan, 2011) levando ao rápido desenvolvimento da patologia, no entanto a longo prazo a presença de *Babesia* destrói os mesmos pelo processo de lise celular (Hunfeld et al., 2008). A importância da incidência destes casos deve-se à função das células vermelhas do sangue, a qual diz respeito ao transporte de oxigénio.

No século XIX, Victor Babes descobriu microorganismos nos eritrócitos dos bovinos na Roménia e associou a hemoglobinúria bovina ou febre *red-water* (Bock et al., 2004; Hunfeld et al., 2008). A babesiose bovina é causada por espécies como: *B. bovis*, *B. bigemina* e *B. divergens* (OIE, 2013). Passados 5 anos, foi determinado que a febre Texas (piroplasmose bovina) (Bock et al., 2004) era causada pela espécie *Babesia bigemina* (Hunfeld et al., 2008).

A babesiose tem sintomas como febre, anemia, bloqueio dos capilares, défice de oxigénio (pela destruição das células infectadas) (Sleigh, 1989), letargia, hemoglobinúria, edema, falta de coordenação, paralisia muscular (Zajac and Conboy, 2012; Cardoso et al., 2010), e em estados mais avançadas pode provocar icterícia (cor amarelada da pele), perda de apetite (Vannier and Krause, 2009) e alteração do tamanho do baço (Vannier and Krause, 2009), levando às elevadas taxas de mortalidade.

#### **1.3.2.2. Género *Theileria***

Os microorganismos pertencentes ao género *Theileria* infectam linfócitos, categoria de glóbulos brancos, do hospedeiro (Sleigh, 1989; Bowman, 2014). As espécies consideradas como as mais patogénicas e que levam às elevadas perdas na produção são *T. annulata* e *T. parva* (OIE, 2014a).

A distribuição da doença é mundialmente homogénea, apresentando taxas de mortalidade de 40-90% na Europa (OIE, 2014a). As condições climatéricas influenciam, apresentando maior influência em períodos de calor (OIE, 2014a). A ocorrência de theileriose pode causar anemia, icterícia, febre e diarreia (Elsheikha and Khan, 2011), fraqueza e dispneia (Bowman, 2014). Após a infecção o tempo de incubação varia entre 12 a 19 dias. (EFTBA, 2014).

#### **1.3.2.3. Diagnóstico**

O diagnóstico destas espécies pode ser feito por imunoensaios utilizando técnicas como IFA e ELISA (OIE, 2014a), esfregaço de sangue pela observação da morfologia (Mosqueda et al., 2012) e PCR, sendo uma das mais utilizadas na biologia molecular (Mosqueda et al., 2012). Pode ainda ser feita sequenciação nucleotídica de DNA extraído da amostra (Cardoso et al., 2010).

#### **1.3.2.4. Tratamento**

No tratamento de babesiose são utilizados agentes babesiacida, diaceturato de diminazeno e dipropionato de imidocarb (Mosqueda et al., 2012; Nehrbass-Stuedli et al., 2011; Vannier and Krause, 2009) podendo ser combinado com antibióticos como atovaquona e azitromicina (Lin and Huang, 2010). O diaceturato de diaceturato é principalmente usado em cavalos e bovinos, que elimina parasitas e previne o reaparecimento dos mesmos (Bowman, 2014; Elsheikha and Khan, 2011).

Para a theileriose é usual tratar com dipropionato de imidocarb e buparvaquone, sendo este um microbiano que inibe a respiração mitocondrial, levando ao atraso no crescimento celular (Elsheikha and Khan, 2011; OIE, 2014a).

#### **1.4. Objectivo**

Pretende-se validar e disponibilizar no mercado um teste de diagnóstico veterinário, que permita uma detecção rápida dos organismos da ordem *Rickettsiales*, nomeadamente dos géneros *Rickettsia*, *Ehrlichia* e *Anaplasma*, e da classe *Aconoidasida*, incluindo os géneros *Babesia* e *Theileria*, sendo estes os que revelam maior importância económica.

Segundo Otranto et al. (2010), vários estudos revelam a que a técnica de PCR é considerada a mais adequada para a detecção de agentes causadores de anemia infecciosa, devido à sua sensibilidade e para estudo da incidência da doença.

Assim, o objetivo deste trabalho consiste no desenvolvimento de testes de diagnóstico veterinário confiável, recorrendo à técnica de PCR, com elevados índices de especificidade e sensibilidade e com preço competitivo no mercado internacional. Para tal será necessário realizar uma análise de mercado, a fim de preparar a comercialização destes testes DIV.



## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Laboratórios Biopremier

Em 2006, a Biopremier começou a pesquisa de novos testes para o sector alimentar e, dois anos mais tarde, o departamento clínico foi criado. Assim, foram criadas áreas laboratoriais independentes de modo a criar um fluxo unidireccional da chegada das amostras até à obtenção do resultado final nos serviços e na investigação.

Todos os laboratórios têm equipamentos independentes e isolados, não havendo troca dos mesmos entre cada divisão nem podendo sair do local onde se encontram. Em todos os laboratórios é obrigatório o uso de equipamentos de protecção, para uso exclusivo dentro do respectivo laboratório, uso de bata e de luvas. Todas as janelas e portas devem encontrar-se fechadas, havendo ainda caixotes específicos para cada tipo de lixo, resíduos comuns e resíduos biológicos. Desta forma, procura-se reduzir o fluxo de contaminação promovendo resultados com maior confiança.

Na Figura 2.1 encontra-se representado o esquema dos laboratórios de investigação e de prestação de serviços.

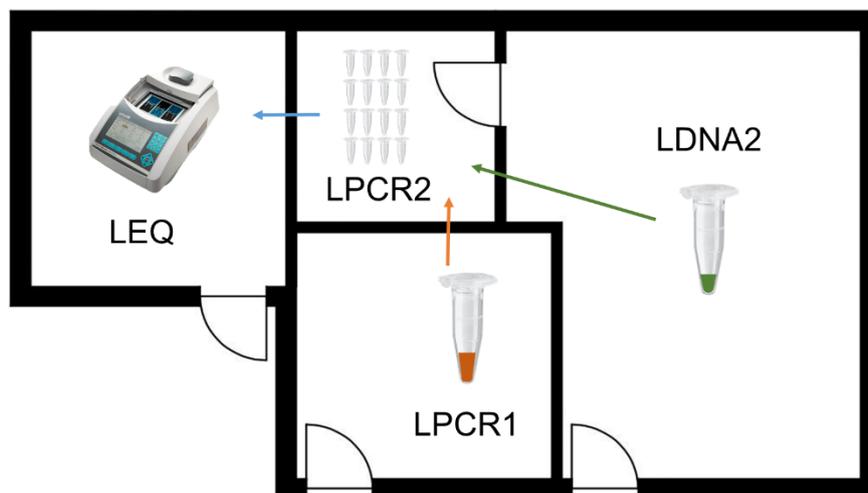


Figura 2.1 – Esquema representativo dos laboratórios de investigação e de prestação de serviços das áreas humana e veterinária da Biopremier Clínica, localizadas no primeiro piso do edifício Tec Labs, pertencentes à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, FCUL.

No laboratório LDNA2 (Laboratório Clínico) começa o processamento da amostra, onde ocorre a extracção de ácidos nucleicos através de um *kit* de extracção de DNA, numa câmara de segurança biológica. A sala de LPCR1 (Laboratório de preparação de *Mix*) é o local onde se armazenam todos os reagentes necessários para a preparação da *mix* a ser usada na reacção de PCR e onde se realiza a mesma de acordo com os protocolos internos.

Após a extracção do DNA e a preparação da *mix* de PCR, estes passam para a sala de LPCR2 onde se faz a distribuição da *mix*, posteriormente é adicionado o DNA bem como os controlos negativos e positivos nas proporções específicas definidas pelo estudo feito anteriormente, o que será abordado neste Capítulo. Nesta sala realiza-se também a quantificação de ácidos nucleicos nas amostras.

Por fim, o ensaio de PCR encontra-se pronto para que se dê a reacção no termociclador na sala dos equipamentos, LEQ. Aquando do término do programa de PCR é necessário observar os resultados que serão revelados na sala dos géis, sala esta comum à agro-alimentar e à clínica.

Assim, são criadas todas as condições para o tratamento das amostras clínicas com o objectivo de detectar um determinado grupo de microorganismos ou uma espécie específica. Todo este processo é efectuado nas instalações da Biopremier com certificações de instalações e validações de procedimentos, de acordo com a regulamentação interna e com os requisitos de empresas certificadoras para o efeito.

## **2.2. Amostas clínicas**

A investigação é realizada com DNA obtido dos serviços mas também de parcerias com outras instituições, ou até mesmo pela aquisição de material genético a partir do qual seja possível a obtenção de DNA em quantidade que permita a reacção de reamplificação.

Para o desenvolvimento desta tese serão usadas essencialmente amostras clínicas de mamíferos como cães, gatos, cabras, ovelhas, cavalos e vacas. O tipo de amostras podem ser tecidos, sangue e isolados microbianos. Todas estas foram extraídas e quantificadas para os testes em estudo.

### **2.2.1. Extracção de DNA**

A extracção de DNA é realizada com um *kit* de extracção, *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Applied Science, Alemanha) que permite o isolamento de DNA genómico a partir de vários tipos de amostra, de forma rápida e eficaz. O procedimento deve ser realizado seguindo as instruções do fabricante, excepto o passo de eluição, o qual foi feito apenas com 100µL de tampão de eluição, como já foi testado anteriormente.

Os DNAs das amostras foram mantidos a 4°C no caso de estarem a ser constantemente utilizados na investigação, e a -20°C foram armazenadas as amostras com utilização apenas nos ensaios finais, de modo a evitar degradação e melhor conservação da mesma a longo prazo.

### **2.2.2. Quantificação de DNA**

Antes de se começarem os ensaios com as amostras clínicas, determinou-se a quantidade de DNA, após a extracção, através do *kit* de quantificação *Qubit™ dsDNA HS Assay Kit* (Invitrogen, EUA) para o equipamento *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen, EUA), baseada em fluorescência de alta sensibilidade e precisão.

De cada vez que o equipamento é utilizado, é realizada uma recta de calibração com os *standards* de referência seguindo as instruções do fabricante tal como o restante procedimento de quantificação das amostras. As amostras a quantificar e os *standards* do *kit* foram colocados à mesma temperatura.

## 2.3. Reagentes de PCR

Como já foi mencionado, a reacção de PCR requer um conjunto de reagentes que proporcionem a amplificação da sequência de DNA específica que permite obter o resultado do teste de diagnóstico.

A *mix* de PCR é composta pelos seguintes reagentes: *primers* desenhados pela Biopremier, 10X NH<sub>4</sub> (Amoníaco) tampão de reacção, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, *enhancers* (no caso de serem necessários), DNA polimerase (enzima). A reacção ocorre num volume final de 25µL. Diferentes combinações de reagentes e de concentrações foram testadas e sucessivamente optimizadas até se chegar à fase de validação.

## 2.4. Análise do produto de PCR

Os produtos de PCR foram submetidos a electroforese em gel de agarose, permitindo a separação das moléculas de DNA em função do seu tamanho. Preparou-se um gel de agarose a 1,5% (m/v) formulado por 6g de agarose e 400mL de tampão de Tris/Borato/EDTA (TBE).

Para a realização da electroforese foi preparado um gel de agarose marcado com EtBr na proporção 1:20 000. Colocou-se o gel na tina de corrida, e após secar foi carregado com produto de PCR (geralmente 5µL) misturada com DNA *Gel Loading Dye* (Thermo Scientific, EUA). No primeiro e no último poço do gel foi ainda adicionado 1,4µL de marcador de pesos molecular, 100pb DNA *Ladder* (Thermo Scientific, EUA).

Após 30 minutos (min) de electroforese a 100 volts (V), o gel foi revelado num transiluminador Ultra-Violeta (UV) com sistema de fotodocumentação de géis e impressão. Na preparação desta técnica foram sempre utilizadas luvas de aceto nitrilo devido aos riscos biológicos provocados pelo EtBr.

### 2.4.1. Purificação dos produtos de PCR

Sempre que se mostrou ser necessário sequenciar produtos de PCR, foi utilizado um *kit* para a purificação prévia do produto de PCR, *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel, Alemanha). No caso da existência de fragmentos de PCR únicos, a purificação fez-se directamente a partir da reacção, enquanto que nas situações em que a visualização em gel apresentava vários fragmentos, a purificação fez-se a partir da excisão do fragmento para sequenciar, a partir do gel.

Seguiu-se as instruções do fabricante em todos os passos, excepto no caso de se cortar a banda, pois foi considerado que a banda teria aproximadamente 40mg de gel adicionando NTI (solução do *kit*) na proporção recomendada.

## 2.5. Teste de diagnóstico de anemia infecciosa

Anteriormente à presente Tese de Mestrado, a Biopremier tinha desenvolvido um teste sob a forma de serviço acreditado para a detecção dos mesmos agentes. No entanto, a importância de explorar o mercado sob a forma de um *kit* de diagnóstico *in vitro*, levou a que se desenvolvesse a transposição deste teste para produto. Dado que se iria ter que alterar a estrutura do teste, aproveitou-se para

incrementar os parâmetros de sensibilidade deste. Para uma maior facilidade de utilização dos laboratórios, as reacções em *simplex* teriam de passar a *duplex*, amplificando não apenas os agentes causadores de anemias infecciosas, como também um controlo positivo interno (CPI). Nesta situação, testou-se um controlo positivo interno baseado na amplificação de DNA presente naturalmente na amostra (DNA do animal a analisar). Após vários testes conseguiu-se otimizar a presença do controlo para resultados satisfatórios, permitindo avaliar a presença de inibidores de PCR, e validar a extracção de DNA realizada na amostra.

A adição de mais amplificações a ocorrerem em simultâneo numa reacção de PCR, resulta geralmente um decréscimo da sensibilidade e na possibilidade do aparecimento de inespecificidades, não raramente noutras regiões do DNA para além da seleccionada como alvo. Deste modo, um dos objectivos do desenvolvimento deste *kit* seria o de manter e de preferência melhorar os índices de sensibilidade e especificidade do teste em *simplex*.

Para além deste facto, pretendiam-se comparar os resultados obtidos com os de outros *kits* presentes no mercado, avaliando também potenciais concorrentes. O teste para a detecção de anemia infecciosa já se encontra validado para detecção em *simplex*, com os *primers* específicos e com os *primers* controlo em ensaios independentes, assim, as condições foram optimizadas de modo a poder ter um teste que proporcione dois resultados num só ensaio, PCR *multiplex*.

### 2.5.1. Desenho dos *primers*

No desenvolvimento do *kit* de detecção de agentes causadores de anemia infecciosa foram testados três *primers* controlo, um *primer forward* e dois *primers reverse* e foram mantidos os *primers* específicos que já tinham sido validados para o serviço prestado pela Biopremier, como presente na Tabela 2.1. Para estes *primers* foram ainda avaliadas várias concentrações, de modo a chegar às melhores condições do teste em *duplex*.

Tabela 2.1 – Lista de *primers* utilizados no estudo e desenvolvimento de testes em regiões alvo.

	Nome do <i>Primer</i>	Tamanho do alvo (pb)	Gene
<i>Aconoidasida</i>	AconoiF2	700	18S
	AconoiRev2		
<i>Rickettsiales</i>	RickOF2	600	16S
	RickORev1		
CPI	Euk1400F2	350	18S
	ITS5Rmod		
	ITS5Rsup		

Adicionalmente, foram testados diversos tipos de DNA polimerase, de diferentes marcas e várias concentrações de MgCl<sub>2</sub>, de modo a facilitar a reacção sem comprometer a sua especificidade.

### 2.5.2. Testes de *annealing*

A temperatura de *annealing* não foi alterada face ao serviço já validado, uma vez que se manteve a classe de *primers* e não se revelou necessário fazer tal alteração.

### 2.5.3. Testes de especificidade

Os testes de especificidade foram feitos com grupos de organismos não específicos ou grupos de organismos taxonomicamente próximos dos agentes a detectar ou até com a possibilidade de amplificar com os *primers* considerados em cada *kit* de detecção, verificando se há necessidade de facilitar ou dificultar a reacção de acordo com os resultados.

A quantidade de DNA utilizada no PCR depende da quantificação da extracção. Cada amostra foi testada em duplicado com quantidades até 20ng, sendo que quando a concentração é inferior a 4ng/μL utiliza-se o máximo de DNA, considerando sempre que a reacção ocorre com 5μL.

## 2.6. Validação

A validação diz respeito à determinação do desempenho do teste, realizada após o desenvolvimento do mesmo. Durante a fase de desenvolvimento são também realizados vários testes intercalares de avaliação de desempenho do teste com o intuito de determinar futuras experiências e ainda a necessidade ou não de se continuar na fase de desenvolvimento.

Após as condições aferidas para a detecção, foram realizados testes para verificar a eficácia do *kit* com isolados bacterianos e fúngicos, amostras clínicas inoculadas com *E. coli* transformadas com a região alvo a ser detectada para cada um dos agentes.

Na Tabela 2.2 estão presentes as fórmulas necessárias para avaliar a qualidade do produto, em conjunto com os critérios de aceitação para cada parâmetro.

Tabela 2.2 – Fórmulas para calcular os índices de especificidade, sensibilidade clínica e precisão, e os respectivos valores de aceitação para avaliação do teste desenvolvido. Considera-se que RN – resultado negativo, RP – resultado positivo, FP – falso positivo e FN – falso negativo (Kawamura, 2002).

	Fórmula	Critério de aceitação
Especificidade (E)	$\frac{RN}{(RN + FP)}$	≥ 95%
Sensibilidade Clínica (SC)	$\frac{RP}{(RP + FN)}$	≥ 85%
Precisão (P)	$\frac{(RP + RN)}{(RP + RN + FP + FN)}$	

### 2.6.1. Testes de especificidade

Para os testes de especificidade foram seleccionadas determinadas amostras biológicas com a maior homologia possível para que os *primers* possam amplificar a referida sequência, ou amostras de espécies com proximidade taxonómica, bem como espécies sensíveis à doença para as quais é aplicado o teste. Na Tabela 2.3 é apresentada a lista de espécies utilizadas para o teste.

Tabela 2.3 – Lista de amostras usadas nos ensaios de especificidade (Rick – *Rickettsiales* e Aconoi – *Aconoidasida*). Encontram-se marcados com (x) as amostras que foram submetidas a cada um dos testes.

<b>Código Biopremier</b>	<b>Espécies</b>	<b>Amostras</b>	<b>Rick</b>	<b>Aconoi</b>
MB 194	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Isolado bacteriano	x	x
MB 218	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Isolado bacteriano	x	x
MB 309	<i>Bosea thiooxidans</i>	Isolado bacteriano	x	x
MB 174	<i>Campylobacter jejuni</i>	Isolado bacteriano	x	x
MB 188	<i>Escherichia coli</i>	Isolado bacteriano	x	x
MB 181	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Isolado bacteriano	x	x
MB 219	<i>Leptospira interrogans</i>	Isolado bacteriano	x	x
MB 101	<i>Micrococcus luteus</i>	Isolado bacteriano	x	x
MB 43	<i>Mycoplasma capricolum</i>	Isolado bacteriano	x	x
MB 42	<i>Mycoplasma mycoides</i>	Isolado bacteriano		x
MB 313	<i>Paracoccus aminovorens</i>	Isolado bacteriano	x	x
MB 10	<i>Staphylococcus aureus</i>	Isolado bacteriano	x	x
MB 145	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Isolado bacteriano	x	x
MB 555	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Isolado bacteriano	x	x
MB 427	<i>Rickettsia hoogstraalii</i>	Isolado bacteriano		x
MF 54	<i>Candida albicans</i>	Isolado fúngico	x	x
MF 77	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Isolado fúngico	x	x
X96	<i>Bos sp.</i>	Leite	x	x
X63	<i>Bos sp.</i>	Leite	x	x
X247	<i>Capra hircus</i>	Leite	x	x
Par 22	<i>Cryptosporidium sp.</i>	Fezes	x	x
Par 44	<i>Cryptosporidium sp.</i>	Fezes	x	x
Par 40	<i>Cystoisospora belli</i>	Fezes	x	x
Par 49	<i>Toxoplasma sp.</i>	Cultura	x	x
X235	<i>Cytauxzoon manul</i>	Sangue	x	
X230	<i>Equus caballus</i>	Sangue	x	x
X11	<i>Felis sp.</i>	Sangue	x	x
X12	<i>Felis sp.</i>	Sangue	x	x
H67	<i>Homo sapiens</i>	Sangue	x	x
C1	<i>Equus caballus</i>	Tecido	x	x
C63	<i>Capra hircus</i>	Tecido	x	x

C122	<i>Canis lupus familiaris</i>	Tecido	x	x
C145	<i>Canis lupus familiaris</i>	Tecido	x	x
C74	<i>Ovis aries</i>	Tecido	x	x
C109	<i>Ovis aries</i>	Tecido	x	X
C35	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Tecido	x	x
C37	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Tecido	x	x
C81	<i>Sus scrofa</i>	Tecido	x	x
C17	<i>Sus scrofa</i>	Tecido	x	x
DSM-19748 (MB 342)	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	DSMZ	x	x
DSM-15972	<i>Asaia siamensis</i>	DSMZ	x	x
DSM-20384	<i>Lactococcus lactis</i>	DSMZ	x	x
DSM-22781	<i>Mycoplasma bovis</i>	DSMZ	x	x
NCTC-10123	<i>Mycoplasma agalactiae</i>	Isolado bacteriano	x	x
CECT-2958(MF 83)	<i>Tricophyton interdigitale</i>	CECT	x	x
EIL 68 (MB 364)	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	EQAS Eurofins	x	x
AI 2.4B	<i>Anaplasma marginale</i>	CIRAD		x
AI 11.3B	<i>Rickettsia africae</i>	CIRAD		x
AI 9.5B	<i>Ehrlichia ruminantium</i>	CIRAD		x
AI 5(1:10)	<i>Babesia bigemina</i>	CIRAD	x	
AI 7.2B	<i>Babesia bovis</i>	CIRAD	x	
AI 4.4B	<i>Theileria spp</i>	CIRAD	x	
C132	<i>Theileria annulata</i>	Sangue	x	

Os testes foram realizados de forma a aumentar as dificuldades para a obtenção de especificidade, avaliando o desempenho do teste em situações mais extremas, nomeadamente utilizando quantidades de DNA significativamente maiores do que aquelas que se prevê que sejam utilizadas na prática, e ainda desvios de temperatura, baixando a restringência da reacção, simulando erros no equipamento.

Nestes ensaios foram utilizados 20-50ng de DNA, sempre que possível, dependendo da quantificação, caso contrário eram adicionados 5µL de DNA, que é o volume máximo que pode ser testado.

Foram realizados PCRs com programas definidos, um programa com 2°C abaixo e outro com 2°C acima, assegurando que a especificidade não é alterada no caso do termociclador não se encontrar calibrado ou ter ajustes diferentes de temperatura face ao que foi utilizado durante o desenvolvimento dos kits.

## 2.6.2. Testes de sensibilidade analítica

Os ensaios de sensibilidade analítica foram realizados com o objectivo de estimar o número de cópias detectadas de cada gene. A determinação foi baseada assumindo a existência de 5 cópias do 18S rDNA por genoma em *Aconoidasida* (Stanczak et al., 2015) e uma cópia do 18S rDNA por genoma em *Rickettsiales*. Assim, foram preparadas diluições em duplicado, conforme mostrado na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Espécies utilizadas para os ensaios de sensibilidade analítica, vindas de uma parceria com o Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD).

Detecção	Código Biopremier	Espécies
Classe <i>Aconoidasida</i>	AI4	<i>Theileria sp.</i>
	AI7	<i>Babesia bovis</i>
Ordem <i>Rickettsiales</i>	AI2	<i>Anaplasma marginale</i>
	AI9	<i>Rickettsia africae</i>
	AI11	<i>Ehrlichia ruminantium</i>

Os produtos de PCR destas estirpes foram previamente clonados com o *TA Cloning Kit, Dual Promoter* (pCRII) (Life Technologies, EUA). Alguns clones passaram pelo processo de selecção a partir do *screening* de forma a confirmar a incorporação do fragmento correcto e, posteriormente, foram feitas várias passagens dos clones seleccionados para uma nova placa de *Luria-Bertani Agar* (LBA) suplementada.

Para a contagem de células numa suspensão de clonagem foi preparada uma solução com 200µL de tampão *Phosphate Buffered Saline* (PBS) e 5µL de corante tolúeno vermelho para cada amostra de referência. Em seguida, colocou-se 10µL da suspensão numa câmara de Neubauer e realizou-se a contagem do número total de células da suspensão

De acordo com o valor obtido preparou-se uma diluição única para que fosse considerada como a solução inicial e facilitar as seguintes diluições. As diluições em série foram feitas em duplicado e - adicionado a estas suspensões em amostras de sangue de bovino, negativo para os agentes de detecção.

### 2.6.3. Testes de sensibilidade clínica

Nesta etapa foram testadas amostras clínicas de DNA provenientes da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) de ensaios interlaboratoriais e de serviços prestados pela empresa. Foram realizados dois ensaios com as mesmas amostras mas com diferentes *kits*, um com as condições de *kit* Biopremier e outro com os *kits* da Bioneer quer para a detecção de *Rickettsiales* (AccuPower® *Rickettsiales* 3-Plex PCR kit), quer para a detecção de *Aconoidasida* (AccuPower® *Babesia & Theileria* PCR *kit*), sendo *kits* que se encontram no mercado competidor.

Assim, a sensibilidade clínica é o indicador que permite dar a probabilidade de uma amostra de um animal com infecção ter um resultado positivo. Para este efeito, é necessário ter amostras com resultado atribuído, que se pode fazer utilizando o *gold standard* ou outros testes para o efeito. Em alguns casos, o quadro clínico antes e depois da implementação de terapêutica também é utilizado.

### 3. Apresentação de resultados e Discussão

Para o desenvolvimento do teste, de detecção de agentes causadores de anemia infecciosa, há um conjunto de etapas a cumprir. Primeiramente é necessário proceder ao desenho do teste que assenta na selecção da tecnologia a utilizar e desenhar as moléculas que proporcionam a detecção. Como o desenvolvimento do produto é a passagem de um serviço já existente na Biopremier, então será necessário fazer ensaios de optimização.

Segundo Otranto et al. (2010), vários estudos revelam a importância da utilização da técnica de PCR, face à citologia e à serologia, para a detecção de agentes causadores de anemia infecciosa. Uma das grandes desvantagens da utilização da serologia no diagnóstico, é que os anticorpos podem ser detectados vários meses após o tratamento da infecção, assim não estuda a incidência mas a prevalência, sendo o PCR mais aconselhável devido à sua elevada sensibilidade e por ser a mais adequada no caso da infecção ser recente, podendo fazer a detecção numa fase mais precoce (Aziz et al., 2014).

No teste anteriormente validado como serviço, eram utilizados dois pares de *primers* para os grupos-alvo e um terceiro par de *primers* para a reacção de controlo externo, nomeadamente: RickOF2/RickORev1 para a detecção de *Rickettsiales*, AconoiCF2/AconoiCRev2 para a detecção de *Aconoidasida*, e Euk1400Fmod/ITS5Rmod para a reacção controlo.

Assumiu-se como estratégia partir das condições químicas e térmicas do serviço para a optimização das condições no teste para *kit*, em que o primeiro passo era a incorporação de um CPI nas detecções, passando de reacções em *simplex* para *duplex*.

A etapa seguinte consiste na optimização do teste, onde se testam diferentes concentrações dos reagentes, introdução de novos reagentes, ciclos de amplificação com combinações de diferentes temperaturas e tempos.

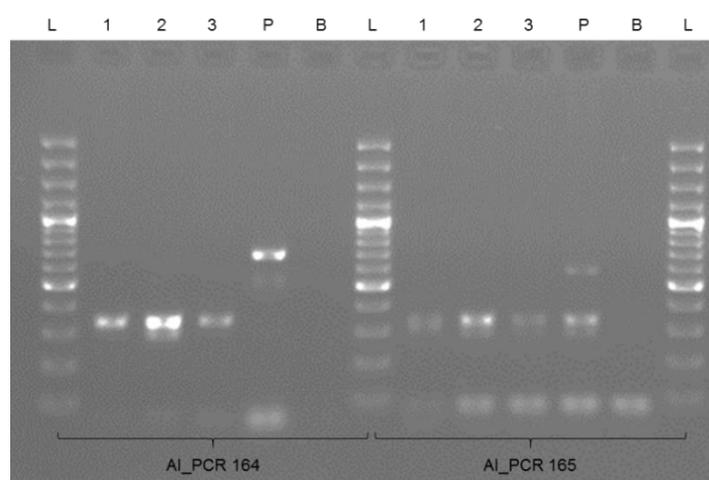


Figura 3.1 – Gel de agarose a 1,5% (m/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras negativas de bovino (1), cão (2) e gato (3), do controlo positivo (P) *Babesia bovis* no AI\_PCR 164 e *Ehrlichia ruminantium* no AI\_PCR 165 e do controlo negativo (B). L – marcador de pesos moleculares.

Na Figura 3.1 encontram-se os ensaios AI\_PCR 164 e AI\_PCR 165, para a detecção de *Aconoidasida* e *Rickettsiales*, respectivamente. Em ambos os PCRs foram utilizadas amostras negativas.

Verifica-se que a banda de 350pb corresponde ao controlo interno das amostras e está presente em todas as amostras clínicas, no entanto, o sinal apresenta-se fraco. O controlo do ensaio é uma amostra positiva que revela a banda específica a 600pb, mas fraca no caso da detecção de *Rickettsiales*.

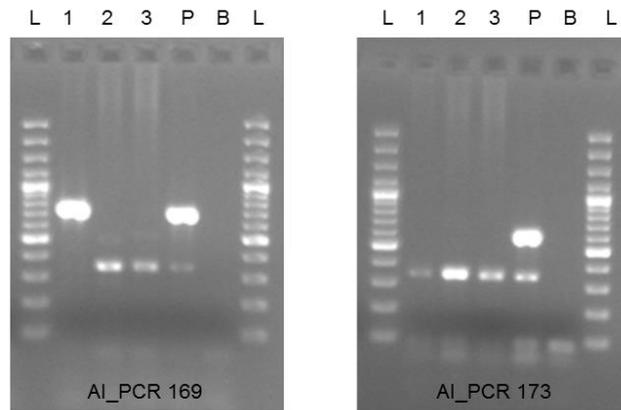


Figura 3.2 – Géis de agarose a 1,5% (m/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras clínicas, amostra positiva de bovino com espécie sequenciada como *Theileria annulata* (1), e duas amostras negativas de cão (2) e gato (3), do controlo positivo (P) *Babesia bovis* no AI\_PCR 169 e *Ehrlichia ruminantium* no AI\_PCR 173.

No sentido de aumentar o sinal para os grupos-alvo foi aumentada a concentração dos *primers* específicos e diminuída a concentração dos *primers* controlo para que a primeira amplificação esteja facilitada em relação à última. Este procedimento é normal, dado que em condições de competição das diferentes amplificações pelos reagentes, a reacção que interessa privilegiar é sempre a dos *targets*, dado que nas detecções positivas, o controlo interno pode até desaparecer, dado que a sua utilidade é apenas necessária nas amostras negativas. Foram testadas diferentes combinações de variação de concentração, com as mesmas amostras, e os melhores resultados encontram-se presentes na Figura 3.2. Em ambos os ensaios de optimização, a concentração dos *primers* específicos é de 0,9 $\mu$ M e dos *primers* controlo é de 0,3 $\mu$ M. Comparando a Figura 3.1 e 3.2, pode verificar-se que a intensidade do sinal de ambas as amostras controlo aumentou com a alteração das condições iniciais.

Foram testadas amostras positivas com número de cópias por genoma conhecido, de forma a avaliar a amplificação do DNA do agente infeccioso e simultaneamente a sensibilidade.

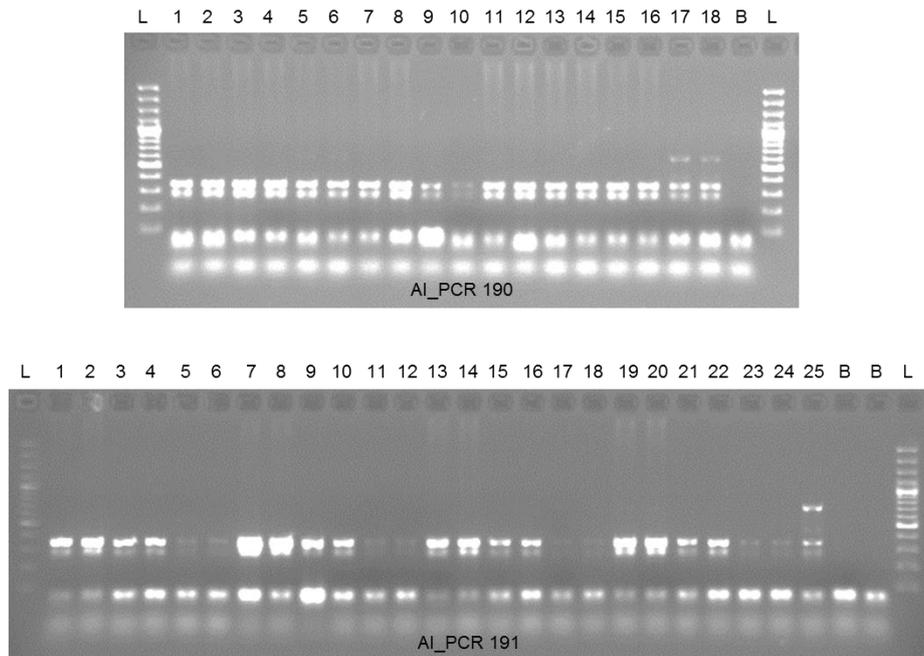


Figura 3.3 – Géis de agarose a 1,5% (m/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras positivas, anteriormente clonadas. AI\_PCR 190: *Anaplasma marginale* B (1 e 2), *Rickettsia africana* clone 3 C (3 e 4), clone 5 C (5 e 6), clone 5 D (7 e 8), clone 5 E (9 e 10), *Ehrlichia ruminantium* clone 3 C (11 e 12), clone 3 D (13 e 14), clone 6 D (15 e 16) e clone 6 B diluído 1:10 (17 e 18). AI\_PCR 191: *Theileria spp* clone 4 D (1 e 2), clone 4 E (3 e 4), clone 4 F (5 e 6), clone 6 D (7 e 8), clone 6 E (9 e 10), clone 6 F (11 e 12), *Babesia bovis* clone 2 D (13 e 14), clone 2 E (15 e 16), clone 2 F (17 e 18), clone 4 D (19 e 20), clone 4 E (21 e 22), clone 4 F (23 e 24) e clone 4 B diluído 1:10 (25). Considera-se que a B são 100 cópias de genoma, C são 10, D é 1, E é diluição 1:10 de D e F é diluição 1:10 da E.

Assim, na Figura 3.3 pode observar-se a dificuldade da amplificação do DNA do agente, mas o sinal do controlo interno encontra-se bastante forte, pois a reacção deve estar favorecida neste sentido. Este ensaio revela diminuição da sensibilidade do teste para a detecção do agente patogénico, e como tal, facilitou-se a reacção para contrariar o presente e aumentar o sinal do alvo.

Desta forma, foram testadas várias combinações de concentrações dos *primers forward* e *reverse*, específicos para a detecção de *Rickettsiales*, e dos *primers* controlo, utilizando *spiked samples* como amostras, ou seja, amostras negativas artificialmente infectadas com *Rickettsia hoogstraalii*.

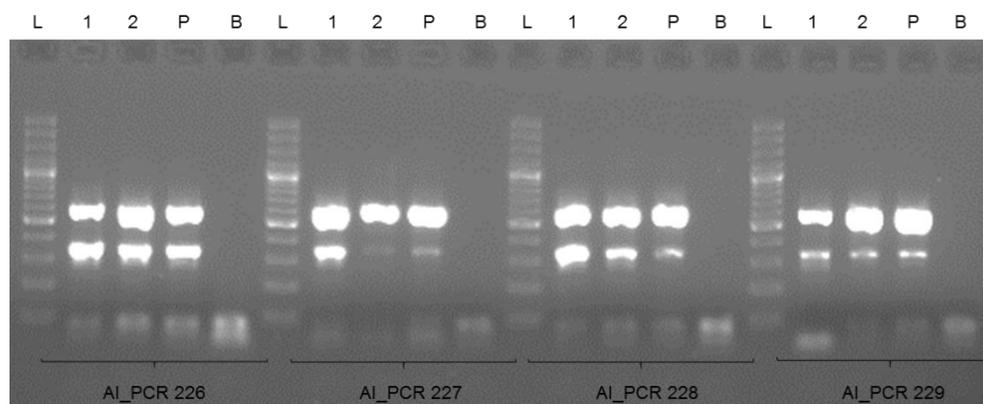


Figura 3.4 – Gel de agarose a 1,5% (p/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras clínicas negativas de cão (1) e bovino (2), ambas artificialmente infectadas com *R. hoogstraalii*. Nos quatro géis o

controlo positivo utilizado foi o mesmo utilizado nas *spiked samples*. AI\_PCR 226 com 1,2µM de RickOF2, 0,7µM RickORev1 e 0,5µM de Euk1400F2/ITS5Rmod. AI\_PCR 227 com 1,2µM de RickOF2, 0,7µM RickORev1 e 0,35µM de Euk1400F2/ITS5Rmod. AI\_PCR 228 com 1,2µM de RickOF2, 0,8µM RickORev1 e 0,5µM de Euk1400F2/ITS5Rmod. AI\_PCR 229 com 1,2µM de RickOF2, 0,8µM RickORev1 e 0,35µM de Euk1400F2/ITS5Rmod.

Assim, na Figura 3.4 verifica-se que, nos AI\_PCR 227 e AI\_PCR 228, as bandas do controlo interno são diferentes em ambos os ensaios, sabendo que a amostra de partida é a mesma, considerando que a quantidade de DNA do animal é a mesma, e conseqüentemente a banda do alvo é mais intensa proporcionalmente à diminuição da intensidade da banda do controlo. Estes ensaios revelam que há competição dos reagentes entre os alvos a amplificar.

No entanto, o AI\_PCR 226 e AI\_PCR 229 apresentam homogeneidade nas bandas do controlo, revelando possuírem as melhores condições, optando pelo ensaio que consome menos reagente, neste caso *primer*, de modo a evitar reacções cruzadas ou de competição. Assim, selecciona-se o AI\_PCR 229 para os próximos ensaios com 1,2µM RickOF2, 0,8µM RickORev1 e 0,35µM Euk1400F2/ITS5Rmod.

O mesmo teste foi feito para a detecção de *Aconoidasida*, mas com concentrações diferentes. Foram testadas diferentes amostras clínicas artificialmente infectadas com *Babesia bovis*, com diluições 1:1000 e 1:5000, de forma a compreender a sensibilidade, como variações de concentrações dos *primers* específicos e dos controlos.

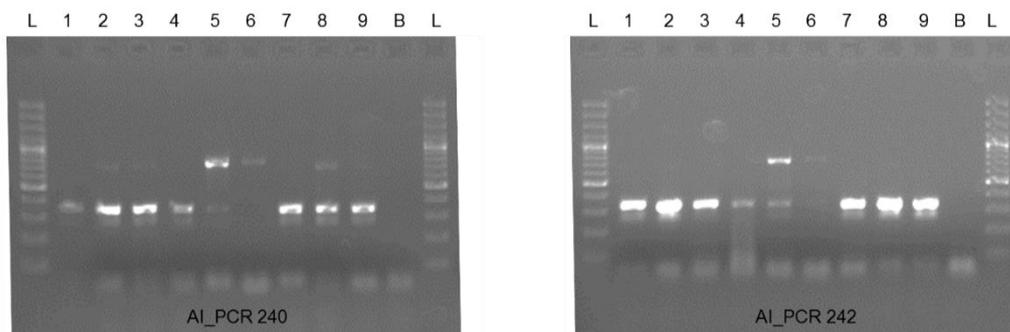


Figura 3.5 – Géis de agarose a 1,5% (p/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras clínicas negativas de gato (1), bovino (4), cavalo (7), e amostra positiva de bovino naturalmente infectada com *Theileria annulata* diluída 1:10 (5) e 1:100 (6). Para as amostras de gato e cavalo foram realizadas *spiked samples* com DNA de *Babesia bovis* diluído 1:1000 (2 e 8, respectivamente) e 1:5000 (3 e 9, respectivamente). Em ambos os ensaios foram testadas diferentes condições com as mesmas amostras. AI\_PCR 240 com 0,7µM de AconoiCF2, 0,7µM AconoiCRev2 e 0,35µM de Euk1400F2/ITS5Rmod. AI\_PCR 242 com 0,7µM de AconoiCF2, 0,7µM AconoiCRev2 e 0,5µM de Euk1400F2/ITS5Rmod.

Na Figura 3.5, encontram-se representadas as duas melhores condições, de quatro ensaios realizados. Verifica-se que no ensaio 242 o sinal da banda do controlo se encontra mais forte, pois a concentração do *primer* é superior ao ensaio 240. No entanto, ambos os PCRs têm a mesma concentração de *primers* específicos. As bandas presentes a 600pb nos poços 2, 3 e 8 do AI\_PCR 240 encontram-se ausentes no AI\_PCR 242, pelo que o primeiro apresenta melhor sensibilidade para o grupo-alvo, mantendo sempre amplificação do controlo interno.

De forma a compreender o comportamento do controlo interno, foi desenhado um novo *primer reverse* do controlo, designado de ITS5Rsup, mais direccionado à amplificação de organismos superiores, vertebrados. Foram realizadas reacções em paralelo com a diferença no *primer reverse* do controlo, ou seja ITS5Rmod e ITS5Rsup, com variações das concentrações dos *primers* específicos de acordo com as características do novo *primer*. Nestes ensaios foram utilizadas *spiked samples* em amostras de diferentes animais com diluições 1:10, 1:100 e 1:1000.

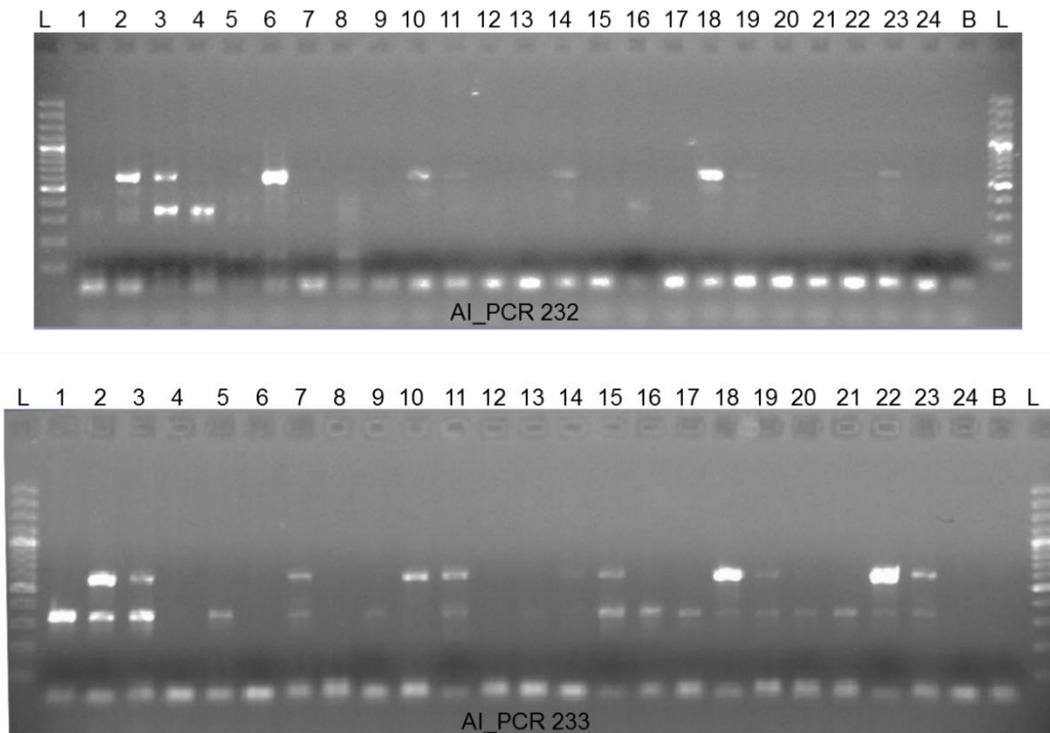


Figura 3.6 – Géis de agarose a 1,5% (m/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras clínicas negativas de cão (1), bovino (5), gato (9), cavalo (13), cabra (17) e ovelha (21). Para todas as amostras referidas foram realizadas *spiked samples* com DNA de *Rickettsia hoogstraalii* diluído 1:10, 1:100 e 1:1000. Em ambos os ensaios foram testados *sets* de *primers* diferentes com as mesmas amostras. AI\_PCR 232 com 1,2µM de RickOF2, 0,8µM RickORev1 e 0,35µM de Euk1400F2/ITS5Rmod. AI\_PCR 233 com 1,2µM de RickOF2, 0,8µM RickORev1 e 0,35µM de Euk1400F2/ITS5Rsup.

Em três variações de concentrações testadas, e esta, que se encontra apresentada na Figura 3.6 revelou os melhores resultados qualitativos com concentrações superiores aos restantes ensaios. Em ambos os ensaios, as bandas que representam a detecção do agente patogénico encontram-se com sinais semelhantes. Pela análise da Figura 3.6 é possível observar a diferença do comportamento dos *primers reverse* em cada uma das situações para a amplificação do controlo interno, sabendo que a matriz de todas as amostras contém DNA de eucarionte. No AI\_PCR 232 há uma diminuição, significativa, do sinal em comparação com o ensaio AI\_PCR 169, na Figura 3.2, podendo haver menor afinidade com o *primer* ITS5Rmod. Quando se testam as mesmas condições mas com o *primer reverse* novo, ITS5Rsup, verifica-se que no AI\_PCR 233 o DNA do hospedeiro é amplificado com um sinal forte comparavelmente ao ensaio 169, não comprometendo a sensibilidade da reacção.

Após optimização das concentrações dos *primers* das reacções em *duplex*, testaram-se várias concentrações da enzima DNA *polymerase* já utilizada na realização do serviço, aqui designada de E1, e uma enzima designada de E2. A E1 é uma enzima termoestável de elevado rendimento, sendo muito utilizada em ensaios rotineiros. Já a E2 é uma *Hotstart* direccionada para ensaios altamente específicos, de forma a aumentar a afinidade para o DNA alvo, revelando em determinadas condições elevado desempenho e boa especificidade.

Na Figura 3.7, encontram-se representados os dois melhores resultados quanto à *performance* das enzimas em estudo, para a detecção de agentes pertencentes à ordem *Rickettsiales*. Foram utilizadas *spiked samples* de 1:10 e 1:100, em três amostras clínicas negativas.

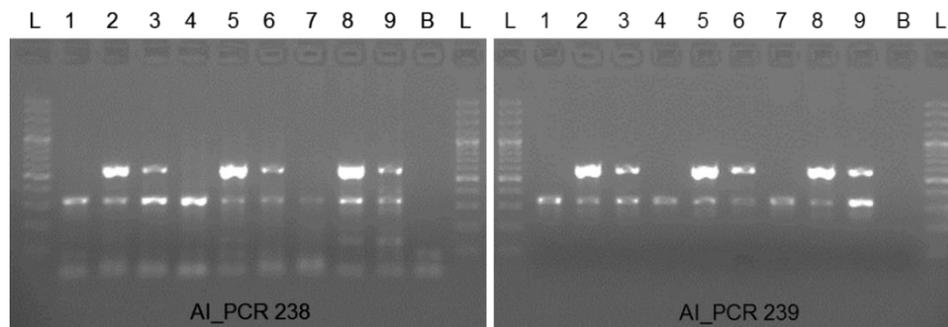


Figura 3.7 – Géis de agarose a 1,5% (m/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras clínicas negativas de cão (1), gato (4) e bovino (7). Para todas as amostras referidas foram realizadas *spiked samples* com DNA de *Rickettsia hoogstraalii* diluído 1:10 e 1:100. Em ambos os ensaios foram testados concentrações diferentes de enzima *polymerase* com as mesmas amostras. AI\_PCR 238 com 2,5U de E1. AI\_PCR 239 com 1U de E2. Ambos os ensaios com 1,2 $\mu$ M de RickOF2, 0,8 $\mu$ M RickORev1 e 0,35 $\mu$ M de Euk1400F2/ITS5Rsup.

Pela observação da figura, pode afirmar-se que o AI\_PCR 239 apresenta mais homogeneidade no sinal do controlo e com sensibilidade coerente comparativamente ao ensaio 238, que foi realizado com 2,5U de E1. Importante é, também, o facto de no PCR 239 se observar a ausência de fragmentos inespecíficos. Considerou-se que a enzima mais vantajosa para o ensaio seria a E2. A utilização desta enzima proporciona melhores resultados, apesar de mais cara, mas sendo utilizada em menores quantidades que a E1. O preço da enzima não é uma desvantagem quando calculado o preço por reacção.

Posteriormente ao estudo dos custos por reacção, foram testadas DNA polimerases de outras marcas mais económicas. A Figura 3.8 mostra o ensaio em que foram testadas as mesmas amostras com duas novas enzimas, a E3 e a E4.

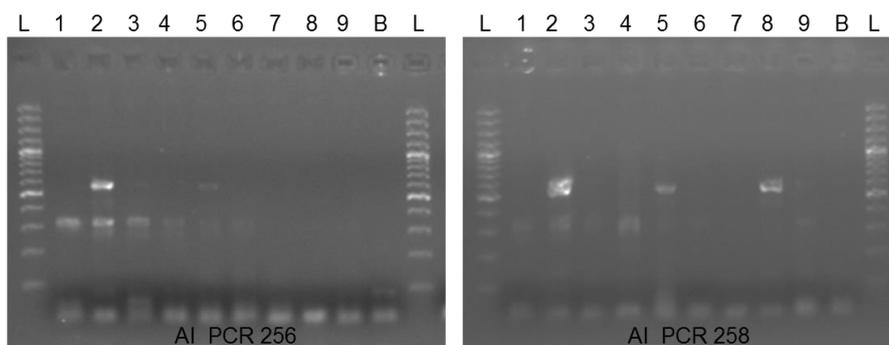


Figura 3.8– Géis de agarose a 1,5% (m/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras clínicas negativas de cão (1), gato (4) e bovino (7). Para todas as amostras referidas foram realizadas *spiked samples* com DNA de *Rickettsia hoogstraalii* diluído 1:10 e 1:100. Em ambos os ensaios foram testados concentrações diferentes de enzima *polymerase* com as mesmas amostras. AI\_PCR 256 com 1U de E3. AI\_PCR 259 com 1U de E4. Ambos os ensaios com 1,2µM de RickOF2, 0,8µM RickORev1 e 0,35µM de Euk1400F2/ITS5Rsup.

Comparativamente à Figura 3.7, em ambos os ensaios observa-se perda de sensibilidade do teste para as condições já aferidas.

Desta forma, as condições de preparação da *mix* de PCR, para a realização do teste de detecção de agentes patogénicos pertencentes à ordem *Rickettsiales*, encontram-se finalizadas, uma vez que foram comparadas com as condições de serviço e apresentaram melhorias significativas.

No caso do teste para a detecção de organismos incluídos na classe *Aconoidasida*, após optimização das concentrações dos *primers* das reacções em *duplex*, também foram testadas várias concentrações da enzima.

Na Figura 3.9, encontram-se representados os dois melhores resultados quanto à *performance* das enzimas em estudo. Foram utilizadas *spiked samples*, em três amostras clínicas negativas.

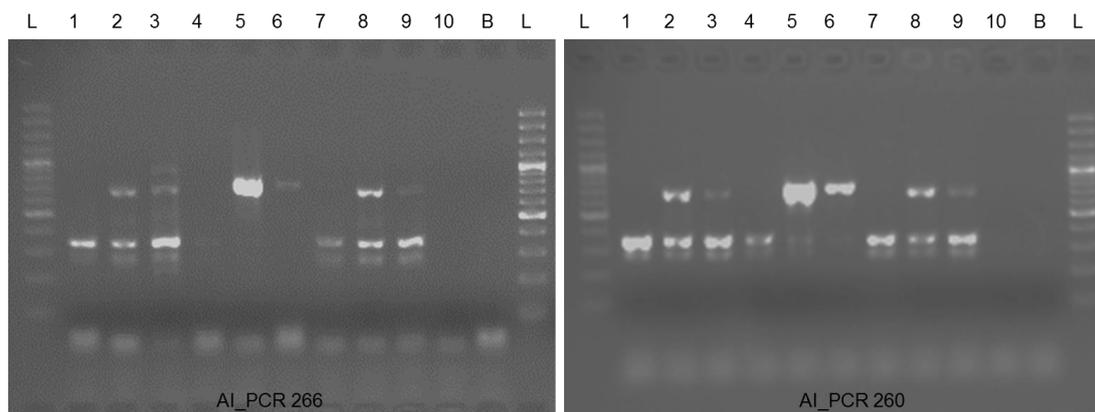


Figura 3.9 – Géis de agarose a 1,5% (m/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras clínicas negativas de gato (1), bovino (4), cavalo (7), amostra positiva de bovino naturalmente infectada com *Theileria annulata* diluída 1:10 (5) e 1:100 (6) e DNA de *Cryptosporidium* (10). Para as amostras de gato e cavalo foram realizadas *spiked samples* com DNA de *Babesia bovis* diluído 1:1000 (2 e 8, respectivamente) e 1:5000 (3 e 9, respectivamente). Em ambos os ensaios foram testados concentrações diferentes de enzima *polymerase* com as mesmas amostras. AI\_PCR 266 com 2U de E1. AI\_PCR 260 com 1U de E2. Ambos os ensaios com 0,8µM de AconoiCF2/AconoiCRev2 e 0,35µM de Euk1400F2/ITS5Rmod.

Pela observação destes géis, as diferenças não são tão visíveis como no ensaio dos *Rickettsiales*, mas analisando atentamente, no PCR 266, aparecem bandas não específicas. Neste mesmo teste a amplificação do controlo interno perde sinal comparativamente ao AI\_PCR 240 (Figura 3.5), mas ganha sensibilidade nos alvos.

Ao analisar o AI\_PCR 260, este indica melhores condições devido à especificidade da reacção, não ocorrendo amplificação inespecífica, o sinal do controlo é ligeiramente melhorado, em comparação com o PCR 240, e a sensibilidade aumenta significativamente.

Foi testada, ainda, uma amostra de *Cryptosporidium* em ambos os ensaios, devido à proximidade filogenética, pertencendo ao mesmo Filo (*Apicomplexa*) que os *Aconoidasida*, não se tendo obtido amplificação, apresentando para este caso boa especificidade.

Com este objectivo foram testadas novas concentrações para o cloreto de magnésio. Estas foram aumentadas para 1,25mM e 1,5mM, de forma a facilitar a reacção, diminuindo a restringência, podendo levar ao aumento da sensibilidade mas também à diminuição da especificidade. Com ambas as concentrações verificou-se o aparecimento de *fingerprint*, comprometendo a especificidade do teste em questão. Com o objectivo de não comprometer a especificidade e sensibilidade experimentaram-se novas combinações de concentrações de *primers* e de MgCl<sub>2</sub>.

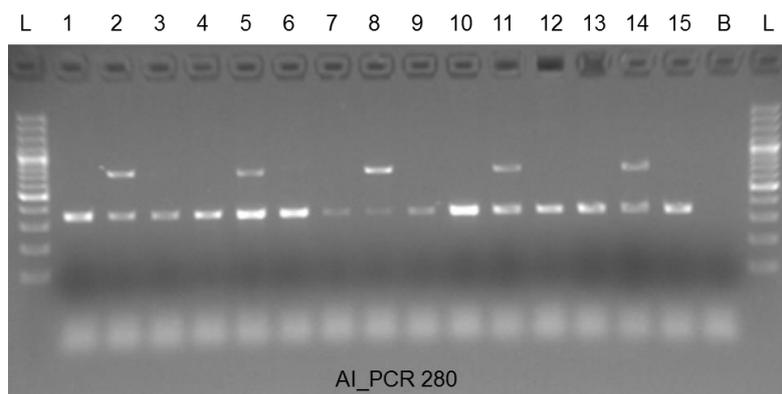


Figura 3.10 – Gel de agarose a 1,5% (m/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras clínicas negativas de bovino (1), cavalo (4) e gato (7, 10 e 13). Para as amostras de bovino, cavalo e gato foram realizadas *spiked samples* com DNA de *Babesia bovis* diluído 1:1000 (2, 5, 8, 11 e 14, respectivamente) e 1:5000 (3, 6, 9, 12 e 15, respectivamente). Ensaio com 1,15mM de MgCl<sub>2</sub>, 1µM de AconoiCF2/Rev2 e 0,3µM de Euk1400F2/ITS5Rmod.

Na Figura 3.10, encontra-se o ensaio com melhores resultados, pois as restantes condições, com valores de concentração de *primers* superiores às representadas, apenas amplificavam o controlo interno. Em condições com concentrações de *primers* do controlo interno, superiores ao do PCR 280, os resultados obtidos mostram um decréscimo de sensibilidade para o grupo-alvo.

Desta forma, as condições de preparação da *mix* de PCR, para a realização do teste de detecção de agentes patogénicos pertencentes à classe *Aconoidasida*, encontram-se finalizadas, uma vez que foram comparadas com as condições de serviço e apresentaram melhorias significativas.

Todos os ensaios mencionados foram realizados utilizando o programa validado para o serviço, 94°C durante 30 segundos (seg) (desnaturação), 58,5°C durante 30 seg. (*annealing*) e 72°C durante 60 seg. (extensão), e com 35 repetições deste, ou seja, 35 ciclos no programa de PCR.

Para ambas as reacções de amplificação foram testados, em paralelo, diferentes programas, de forma a reduzir o tempo necessário para a obtenção dos resultados sem comprometer qualquer parâmetro já aferido. Os programas testados encontram-se na seguinte tabela.

Tabela 3.1 – Diferentes programas testados com diferentes tempos para cada fase de um ciclo de PCR, desnaturação, *annealing* e extensão.

<b>Programa</b>	<b>Desnaturação</b>	<b>Annealing</b>	<b>Extensão</b>
<b>#serviço</b>	30	30	60
<b>#1</b>	30	30	30
<b>#2</b>	30	30	20
<b>#3</b>	30	30	15
<b>#4</b>	30	30	10
<b>#5</b>	30	30	5
<b>#6</b>	30	30	2
<b>#7</b>	30	30	0
<b>#8</b>	30	20	5
<b>#9</b>	15	20	10

Com base nos resultados obtidos, quer para a detecção de *Rickettsiales* quer para *Aconoidasida*, seleccionou-se ao programa #3. Nos restantes ensaios observou-se perda de sensibilidade para o agente e para o DNA do hospedeiro, e também a falta de amplificação, devido à curta duração do programa.

Visto que as condições totais do teste parecem finalizadas, resta passar à última etapa de desenvolvimento de um teste clínico, a fase de validação, pois se forem testadas mais variáveis estaria a desenvolver-se um teste a partir do início.

Iniciou-se o estudo da sensibilidade analítica com o objectivo de estimar o número mínimo de cópias do genoma que o teste detecta. Para esse efeito, e com base no que se encontra descrito na literatura, assumiu-se a existência de 5 cópias por genoma do gene 18S do rDNA em espécies da classe *Aconoidasida* (Stanczak et al., 2015); e de 1 cópia por genoma do gene 16S do rDNA para espécies da ordem *Rickettsiales* (Pang and Winkler, 1993). Para a os ensaios de sensibilidade analítica seleccionaram-se as seguintes espécies, de géneros diferentes, introduzindo a maior diversidade genética possível: *Theileria spp.*, *Babesia bovis*, *Anaplasma marginale*, *Rickettsia africae* e *Ehrlichia ruminantium*. Deste modo, foram amplificados os fragmentos a detectar para cada um dos agentes, a partir de amostras provenientes do CIRAD, entidade com a qual tinha sido previamente estabelecido um protocolo de colaboração. Os fragmentos amplificados foram clonados em *E. coli*. a partir de colónias com o fragmento inserido, foram realizadas contagens de suspensões iniciais para que nos ensaios a realizar se utilizassem as quantidades correspondentes a 1000, 100, 10 e 1 cópia do genoma

de cada um dos agentes. Estas suspensões foram, antes de se efectuar a extracção, adicionadas a amostras negativas de sangue bovino para os agentes a detectar. As extracções foram realizadas com recurso a várias concentrações durante a fase de extracção para incluir as variabilidades existentes na realidade durante este passo. As amostras foram utilizadas o mais cedo possível após extracção, reproduzindo o que acontece na realidade, e evitando a degradação das amostras.

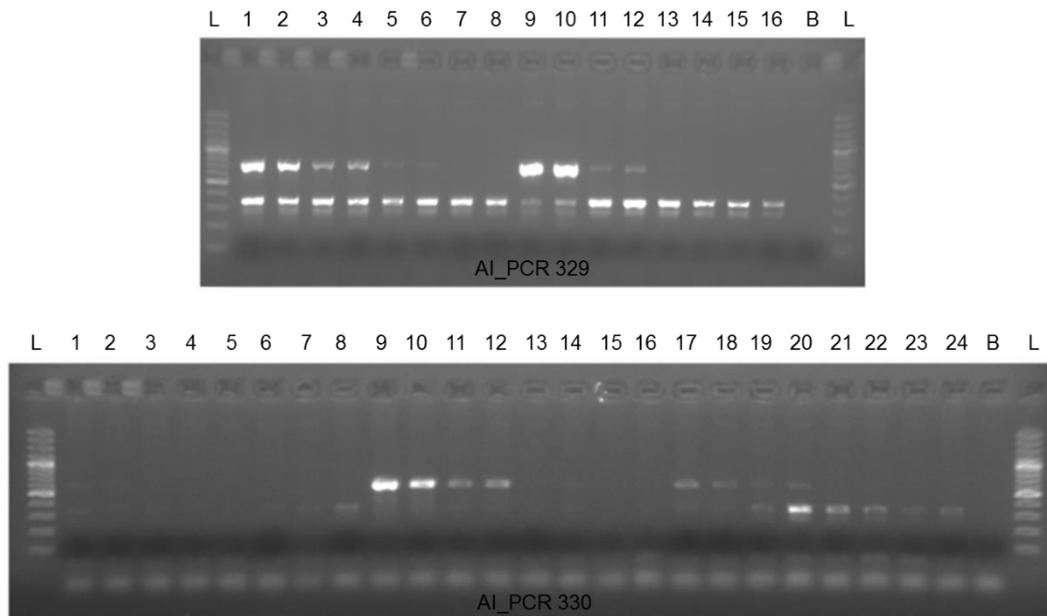


Figura 3.11 – Géis de agarose a 1,5% (m/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras positivas, anteriormente clonadas. AI\_PCR 329: *Theileria spp* clone 7 A (1), A' (2), B (3), B' (4), C (5), C' (6), D (7), D' (8), *Babesia bovis* clone 8 A (9), A' (10), B (11), B' (12), C (13), C' (14), D (15) e D' (16). AI\_PCR 330: *Anaplasma marginale* clone 4 A (1), A' (2), B (3), B' (4), C (5), C' (6), D (7), D' (8), *Rickettsia africae* clone 4 A (9), A' (10), B (11), B' (12), C (13), C' (14), D (15) D' (16), *Ehrlichia ruminantium* clone 6 A (17), A' (18), B (19), B' (20), C (21), C' (22), D (23) e D' (24). Considera-se que a A são 1000 cópias de genoma, B são 100, C são 10 e D é 1 cópia. Todas as amostras foram testadas em duplicado para testar a qualidade da extracção. AI\_PCR 329 com 1µM de AconoiCF2/AconoiCRev2 e 0,3µM de Euk1400F2/ITS5Rmod. AI\_PCR 330 com 1,2µM de RickOF2, 0,8 µM de RickORev1e 0,35µM de Euk1400F2/ITS5Rsup.

No gel referente ao AI\_PCR 329, encontra-se representado o ensaio que permite a determinação do limite de detecção para a classe *Aconoidasida*, tendo sido utilizadas as duas estirpes de maior importância da patologia, *Babesia bovis* e *Theileria spp*. Verifica-se que o teste detecta até 10 cópias do genoma para *Theileria spp*. (poço 5 e 6) e 100 cópias do genoma para *B. bovis* (poço 11 e 12).

Para o cálculo da sensibilidade analítica para a ordem *Rickettsiales* foram utilizadas três estirpes dos géneros mais representativos das patologias que se pretendem detectar com este teste (*Anaplasma marginale*, *Rickettsia africae* e *Ehrlichia ruminantium*). Nos poços 1 e 2 do gel AI\_PCR 330, o sinal da amplificação de *A. Marginale*, corresponde a 1000 cópias do genoma, é muito fraco. Para as outras duas espécies, o teste detecta até 100 cópias do genoma (poço 11, 12, 19 e 20).

Com a finalidade de aumentar a sensibilidade de ambos os testes, testou-se aumentar o número de ciclos do programa de PCR para 40 ciclos. Deste modo, aumenta-se a quantidade de DNA amplificado, sem que seja expectável o aparecimento de inespecificidade. Os resultados obtidos foram melhores, tal como mostrado na Figura 3.12.

As amostras testadas foram as que correspondiam aos limites de detecção do ensaio anterior, e algumas diluições, de forma a permitir aferir directamente o número de cópias do genoma que o teste amplifica.

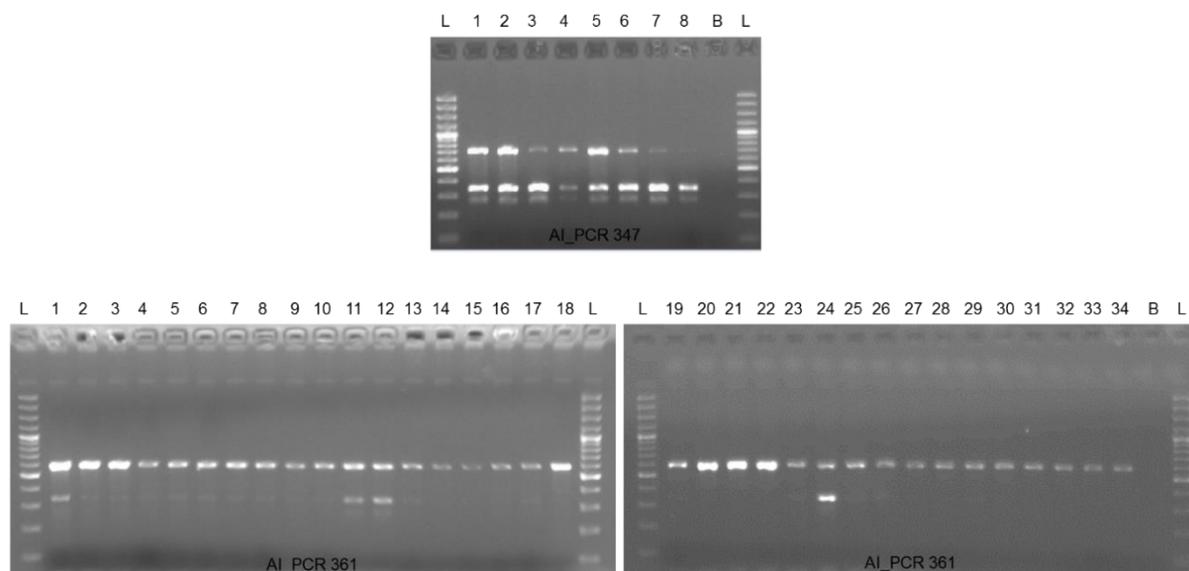


Figura 3.12 – Géis de agarose a 1,5% (p/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras positivas, anteriormente clonadas. AI\_PCR 347: *Theileria* spp clone 7 C (1), C' (2), D (3), D' (4), *Babesia bovis* clone 8 C (5), C' (6), D (7) e D' (8). AI\_PCR 361: *Anaplasma marginale* clone 4 A (1, 2 e 3), B (4, 5 e 6), B 1:2 (7, 8 e 9), B 1:3 (10, 11 e 12), B 1:5 (13, 14 e 15), *Rickettsia africae* clone 4 C (16), C 1:2 (17), C' (18) C' 1:2 (19), *Ehrlichia ruminantium* clone 6 A (20, 21 e 22), B (23, 24 e 25), B 1:2 (26, 27 e 28), B 1:3 (29, 30 e 31), B 1:5 (32, 33 e 34). Considera-se que a A são 1000 cópias de genoma, B são 100, C são 10 e D é 1 cópia. Todas as amostras foram testadas em duplicado para testar a qualidade da extracção. AI\_PCR 347 com 1 $\mu$ M de AconoiCF2/AconoiCRev2 e 0,3 $\mu$ M de Euk1400F2/ITS5Rmod. AI\_PCR 361 com 1,2 $\mu$ M de RickOF2, 0,8  $\mu$ M de RickORev1e 0,35 $\mu$ M de Euk1400F2/ITS5Rsup.

Em ambos os géis verificam-se melhorias significativas da sensibilidade. O resultado foi variável para a detecção da ordem *Rickettsiales* (AI\_PCR 361) consoante o género, correspondente a 20 cópias do genoma para *A. marginale*, 2 cópias do genoma para *R. africae* e 20 cópias do genoma para *E. ruminantium*, pelo que se determinou um limite de detecção de valor médio de 14 cópias de genoma, em relação aos três resultados obtidos. Para a detecção da classe *Aconoidasida* foi possível aumentar a sensibilidade, correspondendo a 1 cópia do genoma para ambas as espécies testadas.

Tendo os valores dos limites de detecção determinados, foram realizados os testes de especificidade utilizando, sempre que possível, a quantidade de DNA compreendida entre 20 e 50ng, com o objectivo de aumentar a dificuldade da especificidade. As espécies biológicas testadas tiveram como critério de selecção a maior homogeneidade possível com as sequências dos *primers*, ou seja, aquelas em que haveria, teoricamente, maior dificuldade em diferenciar e as de categorias taxonómicas mais próximas, bem como as espécies susceptíveis a estas patologias às quais o teste será aplicado. Em paralelo, avaliou-se a redução de 2°C do programa de PCR, diminuindo a restringência e aumentando uma vez mais a dificuldade na especificidade, AI\_PCR 352 (Figura 3.13) e AI\_PCR 355 (Figura 3.14).

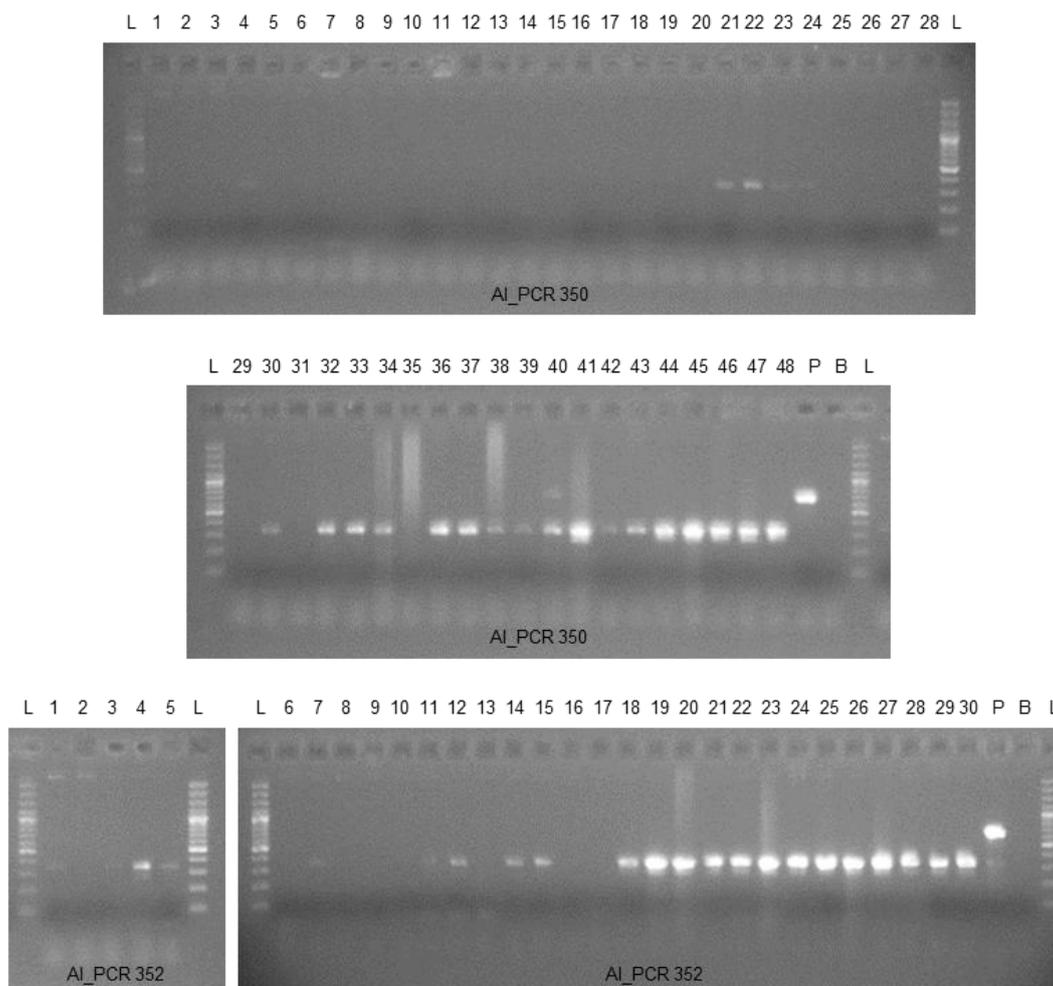


Figura 3.13 – Géis de agarose a 1,5% (m/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras clínicas, estirpes de colecção, ensaios interlaboratoriais, isolados bacterianos, isolados fúngicos e DNAs de vertebrados, para os ensaios de especificidade a 58,5°C (AI\_PCR 350) e 56,5°C (AI\_PCR 352) para a detecção de organismos pertencentes à classe *Aconoidasida*. Ambos os ensaios com 1µM de AconoiCF2/AconoiCRev2 e 0,3µM de Euk1400F2/ITS5Rmod.

Para os ensaios de especificidade de *Aconoidasida*, foram analisadas 48 amostras que se encontram seleccionadas na Tabela 2.4 (Figura 3.13, AI\_PCR 350). Verifica-se em algumas amostras, a ausência da banda do controlo, devido à utilização de amostras não clínicas em que o DNA do hospedeiro não se encontra presente. No poço 40 do AI\_PCR 350 foi testada uma amostra de tecido de *Equus caballus*, anteriormente testada para anemia infecciosa e com resultado negativo, no entanto surge uma banda a 600pb. Foi feita a confirmação por sequenciação de DNA e foi detectado *Babesia equi*, não sendo, portanto, uma inespecificidade.

No AI\_PCR 352 foi baixada a temperatura em 2°C, diminuindo a restringência da reacção. Foram utilizadas menos amostras de vertebrados e alguns isolados, no entanto, a especificidade não foi afectada.

Para o teste de especificidade para a detecção de *Aconoidasida* não houve qualquer problema de especificidade mesmo com o aumento dos ciclos do programa de PCR, e face às condições optimizadas.

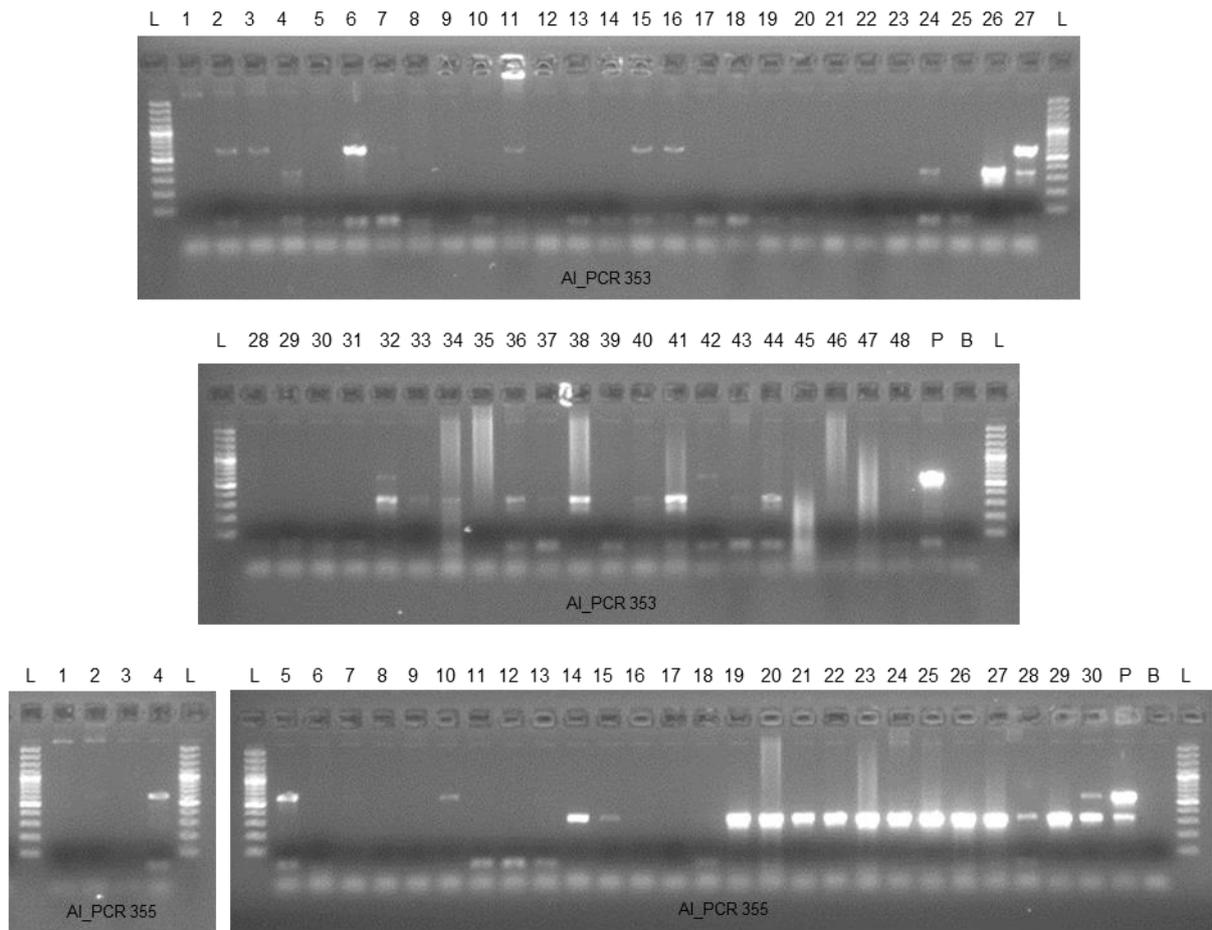


Figura 3.14 – Géis de agarose a 1,5% (p/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras clínicas, estirpes de colecção, ensaios interlaboratoriais, isolados bacterianos, isolados fúngicos e DNAs de vertebrados, para os ensaios de especificidade a 58,5°C (AI\_PCR 353) e 56,5°C (AI\_PCR 355) para a detecção de organismos pertencentes à ordem *Rickettsiales*. Ambos os ensaios com 1,2µM de RickOF2, 0,8 µM de RickORev1e 0,35µM de Euk1400F2/ITS5Rsup.

Para os ensaios de especificidade de *Rickettsiales*, foram analisadas 48 amostras que se encontram seleccionadas na Tabela 2.4 (Figura 3.14, AI\_PCR 353). Verifica-se a ausência da banda do controlo em várias amostras, pela mesma razão que a descrita para o PCR 350.

Não foram encontrados casos de falsos positivos, com as seguintes excepções: isolado de *Streptococcus dysgalactiae*, em que se obtém amplificação quando a quantidade de DNA é muito elevada (30ng). No entanto, quando esta é reduzida para 1ng, quantidade ainda assim bastante superior ao espectável que ocorra em amostras de sangue, a amplificação é negativa. Ocorreu amplificação em 4 amostras, em que após sequenciação do fragmento detectado, se realizou um BLAST na base de dados do *Genebank*. As maiores homologias correspondiam a sequências do 16S do rDNA de bactérias intracelulares não identificadas, e não isoladas, pertencentes a um grupo filogenético descrito em vários artigos, e que se considera serem afiliados de *Rickettsiales* e *Rhodospirillales*.

No poço 27 do AI\_PCR 353 foi testada uma amostra clínica de bovino, anteriormente testada para anemia infecciosa e com resultado positivo e sequenciada como *Theileria annulata*, no entanto surge uma banda a 600pb. Foi feita a confirmação por sequenciação de DNA e foi detectado *Anaplasma*

*bovis*, não sendo portanto uma inespecificidade, mas uma amplificação anteriormente não detectada, fruto do aumento de sensibilidade do novo teste.

O género *Wolbachia* foi testado num ensaio diferente e terá uma amplificação dificultada devido à sequência dos *primers*, podendo, de acordo com a amostra em causa e quantidade de bactérias na mesma, dar resultados positivos ou negativos, pelo que não deverá ser aplicado caso se pretenda pesquisar este género.

No AI\_PCR 355 foi baixada a temperatura em 2°C, diminuindo a restringência da reacção, aumentando a probabilidade de amplificar espécies mais próximas taxonomicamente e com maior homologia na sequência dos *primers*. Foram utilizadas menos amostras de vertebrados e alguns isolados, no entanto, a especificidade não foi afectada, e os resultados foram semelhantes ao ensaio AI\_PCR 353.

Para o teste de especificidade para a detecção de *Rickettsiales* não houve qualquer problema de especificidade mesmo com o aumento dos ciclos do programa de PCR, e face às condições optimizadas.

Para terminar o processo de validação do teste com duas reacções independentes, foram realizados os ensaios de sensibilidade clínica com amostra clínicas testadas anteriormente com as condições de serviço, provindas de algumas parcerias e da prestação de serviços Biopremier.

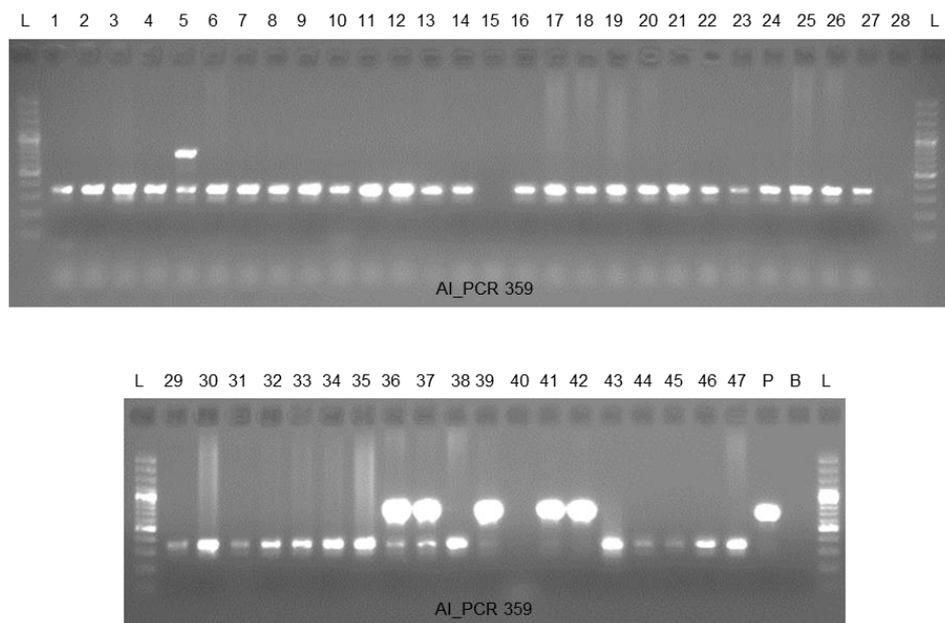


Figura 3.15 – Géis de agarose a 1,5% (m/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras clínicas para ensaio de sensibilidade clínica com as condições aferidas para a detecção de organismos pertencentes à classe *Aconoidasida*. AI\_PCR 359 com 1µM de AconoiCF2/AconoiCRev2 e 0,3µM de Euk1400F2/ITS5Rmod.

Foram analisadas 47 amostras clínicas, 35 da FMV, 4 da UTAD e 8 de serviços prestados. Nas condições de serviço todas as amostras da FMV foram dadas como negativas, as da UTAD foram todas positivas e posteriormente sequenciadas para conhecer a espécie, e as 8 amostras de serviços, 4 foram positivas para *Aconoidasida* e as outras 4 foram negativas. Nas condições do *kit*, uma amostra da FMV teve resultado positivo (AI\_PCR 359, poço 5), sequenciada como *Babesia canis vogeli*, as amostras da UTAD mantiveram o resultado positivo para as mesmas espécies detectadas anteriormente, e as

amostras de serviço apenas duas tiveram amplificação, devido à degradação das amostras ao longo do tempo. Esta conclusão foi obtida após ensaio utilizando as condições de serviço. Face ao serviço, os resultados com as novas condições mostraram uma sensibilidade superior.

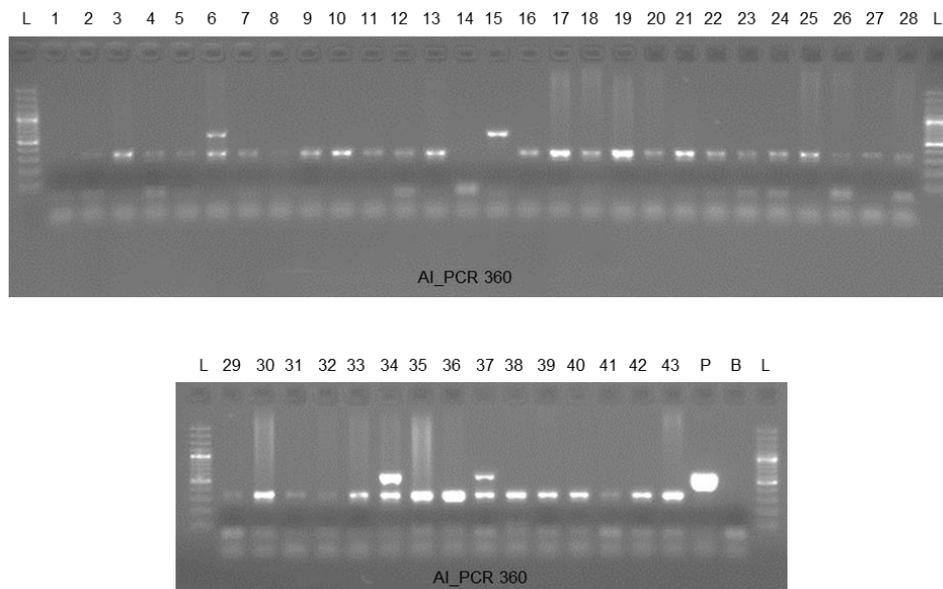


Figura 3.16 – Géis de agarose a 1,5% (m/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras clínicas para o ensaio de sensibilidade clínica com as condições aferidas para a detecção de organismos pertencentes à ordem Rickettsiales. AI\_PCR 360 com 1,2 $\mu$ M de RickOF2, 0,8  $\mu$ M de RickORev1 e 0,35 $\mu$ M de Euk1400F2/ITS5Rsup.

Foram analisadas 43 amostras clínicas, 35 da FMV, 4 da UTAD e 4 de serviços prestados. Nas condições de serviço todas as amostras da FMV foram dadas como negativas, nas da UTAD, 2 foram dadas como positivas e posteriormente sequenciadas para conhecer a espécie; e as 4 amostras de serviços estavam referenciadas como negativas. Nas condições do *kit*, 3 amostras da FMV tiveram resultado positivo (AI\_PCR 360, poço 6, 15 e 34), tendo sido identificadas as espécies *Ehrlichia canis* (6) e *Anaplasma platys* (15 e 34). Nas amostras de serviço, nenhuma teve amplificação, e nas amostras da UTAD, apenas uma manteve o resultado positivo para *Rickettsiales* devido à degradação das amostras ao longo do tempo, confirmada do mesmo modo que para a detecção *Aconoidasida*.

No sentido de avaliar a sensibilidade do teste, procedeu-se igualmente a ensaios comparativos com *kits* comerciais. Foram seleccionados *kits* cujas informações sobre o processo de validação, pareciam ser as mais completas e com melhores resultados. Deste modo, seleccionaram-se os seguintes *kits* da Bioneer: AccuPower® Rickettsiales 3-Plex PCR *kit* e AccuPower® Babesia & Theileria PCR *kit*.

Para ambas as detecções foram testadas 35 amostras da FMV, 4 da UTAD e 4 provindas de serviços. Todas estas amostras com resultados conhecidos e sequenciados, permitindo assim comparação de resultados dos diferentes fabricantes. Pela utilização do teste de detecção de *Babesia* e *Theileria* da Bioneer, verificou-se 7 resultados positivos, tal como o teste da Biopremier. Para a detecção de *Rickettsiales*, pelo *kit* da Bioneer, 4 amostras são positivas, enquanto que pelas condições da Biopremier obteve-se 5 amostras com amplificação de DNA do agente patogénico. A amostra dada

como negativa pelo *kit* da empresa concorrente, corresponde a *Anaplasma bovis*, espécie que de acordo com as instruções de uso, deveria ser detectada.

Em adição aos ensaios anteriores, foram testadas amostras contendo DNA de *Theileria annulata* e *Anaplasma bovis*, em diferentes diluições.

Para a detecção de *Rickettsiales*, obteve-se uma sensibilidade, no mínimo, de 5 vezes melhor do que no *kit* Bioneer; em concordância com o facto de as 14 cópias do genoma de sensibilidade analítica ser 5 vezes melhor do que as 70 cópias dadas pelo fabricante Bioneer.

Para a detecção de *Aconoidasida* (*Babesia* e *Theileria*), obteve-se uma sensibilidade 25 vezes melhor do que no *kit* Bioneer; este último com uma sensibilidade descrita pelo fabricante equivalente a 10 cópias.

De acordo com as fórmulas presentes na Tabela 2.2, obteve-se 98,7% de especificidade, 100% de sensibilidade e de 98,8% de precisão para a detecção de *Rickettsiales*, e 100% de especificidade, de sensibilidade e de precisão para a detecção de *Aconoidasida*.

## 4. Da tecnologia para o mercado

Em países desenvolvidos, como a França (Criado-Fornelio et al., 2009) e Hungria (Hornok et al., 2014), as taxas de prevalência da anemia infecciosa estão entre 15 – 30%, no entanto dependendo da espécie pode variar entre 1 e 45% (Mans et al., 2015). Já em países como Brasil (Silveira et al., 2014), África do Sul (Mtshali and Mtshali, 2013), Nigéria (Nwoha, 2013) e Quênia (Njiiri et al., 2015), sendo estes países subdesenvolvidos, os valores rondam em média os 55%, e no Uganda (Oura et al., 2011) pode atingir 95% de gado bovino infectado.

No caso da ocorrência da doença em bovinos são verificadas quebras na produção em grande escala (explorações), na saúde dos animais envolvidos, na produção e qualidade do leite. No caso dos agentes causadores de anemia afectarem os cavalos há um impacto na *performance* quando se fala em animais de competição. Actualmente não há consciencialização da importância da doença e dos custos associados a ela.

Neste capítulo será abordada a análise do potencial mercado do *kit* desenvolvido pela Biopremier, que detecta agentes causadores de anemia infecciosa. Estes agentes afectam significativamente os animais de companhia, mas as consequências da incidência da doença não são representativas. Portanto, o presente estudo foca-se apenas na análise de mercado dos animais de produção, equinos e bovinos.

### 4.1. Análise de Mercado

A infecção em bovinos e equinos, por agentes causadores de anemia infecciosa, provoca impacto económico (AU-IBAR, 2013) subjacente à produção de leite e na comercialização destes animais, essencialmente na venda de carne e na importação e exportação de cavalos de competição. No entanto, a medicina veterinária não está sensibilizada quanto aos custos elevados inerentes à contaminação dos animais, por bactérias ou parasitas pertencentes ao grupo de microorganismos causadores de anemia infecciosa.

As entidades reguladoras como os Departamentos da Agricultura de diversos países, não apresentam leis direccionadas para um diagnóstico obrigatório quanto à detecção de anemia infecciosa, mas sim planos de controlo para a doença, começando pela vacinação e medidas de prevenção. Há sim a obrigatoriedade para um seguimento especializado (LSUAgCenter, 2015), por parte do médico veterinário, nas explorações de produção, independentemente do fim do animal, quer seja para consumo quer seja para desporto.

Caso o veterinário se depare com uma situação de ameaça da doença, há medidas a serem tomadas quanto ao seu controlo, requerendo assim o processo de quarentena. Em países como Estados Unidos da América (EUA) (LSUAgCenter, 2015), Brasil (Diário Oficial da União, 2008) e Austrália (RIRDC, 2002) é recomendado a realização de análises sanguíneas.

No caso de anemia infecciosa causada por *Babesia*, quando detectada nos EUA, o *United States Department of Agriculture* (USDA) exige 3 dias de quarentena no caso de equinos vindos dos seguintes países: Afeganistão, Albânia, Austrália, Áustria, Bélgica, Bermuda, Ilhas Virgens Britânicas, China, República Checa, Dinamarca, Estónia, Finlândia, França, Alemanha, Grécia, Holanda, Hong Kong,

Hungria, Islândia, Índia, Indonésia, Irlanda, Israel, Itália, Japão, Jordânia, Líbano, Luxemburgo, Macau, Malta, México, Noruega, Nova Zelândia, Paquistão, Filipinas, Polónia, Portugal, Roménia, Rússia, Escócia, Espanha, Coreia do Sul, Suécia, Suíça, Turquia, República Árabe Unido e Reino Unido.

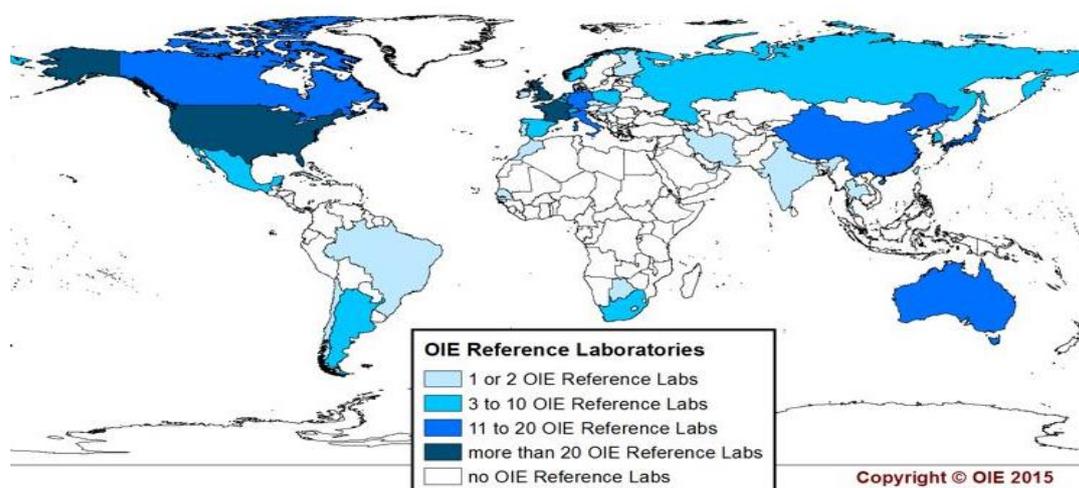
Este processo de isolamento implica custos com medicamentos e associados ao alojamento dos animais, de forma que não tenha contacto com os restantes existentes na exploração. Quando existe suspeita é feito directamente o tratamento e não o diagnóstico, trazendo mais custos, enquanto que com o *kit* de detecção permite o rastreio de animais saudáveis, diminuindo os custos e o risco de contaminação.

Segundo a World Organisation for Animal Health (OIE) existe uma lista, actualizada em 2014, de testes prescritos, em que correspondem a ensaios exigidos pela organização (OIE, 2014a), considerando que estes são os mais relevantes para a determinação do estatuto sanitário dos animais. A OIE considera os serviços veterinários como um bem público mundial, no entanto não são exigidos testes para anemia infecciosa e parasitária. Assim, torna-se importante a sensibilização destes órgãos para o impacto causado pela doença.

#### 4.1.1. Número de potenciais clientes no mercado

Os potenciais clientes do mercado dos *kits* de diagnóstico de anemia infecciosa são os laboratórios veterinários que possuem equipamento especializado que permite a realização da técnica de PCR. O veterinário recolhe a amostra de sangue do animal, de acordo com as especificações determinadas pelo laboratório, e procede à análise deste. Assim, o *kit* desenvolvido pela Biopremier tem como mercado-alvo os laboratórios veterinários com equipamento tecnológico adequado. Nesta secção será avaliado o número de potenciais clientes com interesse na compra do *kit* de detecção de anemia infecciosa.

Segundo a OIE, na Figura 4.1 encontra-se a distribuição mundial de laboratórios de referência, podendo verificar-se que a Europa e os EUA representam um grande número de laboratórios de diagnóstico para várias doenças, pois a tecnologia e os métodos utilizados a nível veterinário estão em contínuo desenvolvimento de forma a aumentar o controlo da saúde animal.



Fonte: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/map/>

Figura 4.1 – Representação geográfica da distribuição mundial de laboratórios de referência segundo parâmetros de selecção da OIE.

Foi realizado um levantamento dos principais laboratórios veterinários, de acordo com a densidade de laboratórios de referência em determinadas regiões mundiais, Austrália, Brasil, China, Europa e EUA, sendo estes os países com maior número de bovinos e equinos como se pode verificar no estudo realizado para o valor de mercado potencial (Tabela 4.2 e 4.3).

Na seguinte tabela, estão representados laboratórios que realizam diagnóstico veterinário com utilização de técnicas de biologia molecular, principalmente em animais de exploração, e que, actualmente, não têm o serviço de detecção de anemia infecciosa causada por parasitas ou bactérias.

Tabela 4.1 – Lista de laboratórios de referência com condições para a realização de biologia molecular, em países como Austrália, Brasil, China, Europa, EUA e Portugal.

<b>Laboratório</b>	<b>País</b>
Veterinary Pathology Diagnostic Services, The University of Sydney	Austrália
Australian Animal Health Laboratory, Csiro	Austrália
Elizabeth Macarthur Agricultural Institute	Austrália
Unidad Laboratorial San Pablo	Brasil
Quebec Laboratory Network	Canadá
Western Laboratory Network	Canadá
Laboratory of Equine Infectious Anemia, Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences	China
Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV)	Portugal
Diagnostic Laboratories, The University of Georgia Veterinary	EUA
Poultry Research and Diagnostic Laboratory, Mississippi State University	EUA
Veterinary Medical Center, The Ohio State University	EUA
National Veterinary Services, United States Department of Agriculture	EUA
Neogen	EUA
Biobest	Reino Unido
The Pirbright Institute	Reino Unido
CreSA	Espanha
Laboratório de Sanidad Animal	Espanha
Neiker	Espanha
Servicio de Laboratorio y Control - SeLyC.	Espanha
Sophia-Antipolis Laboratory	França
Laboratoire CERBA	França
CIRAD	França
ISAE	França
Labeo Frank Duncombe	França
Friedrich-Loeffler-Institut (FLI)	Alemanha

Fonte: *World Organisation for Animal Health (OIE)*

Os laboratórios que se localizam no Canadá fazem parte da subdivisão da Canadian Food Inspection Agency, sendo esta uma organização governamental, que trabalha em parceria com a Public Health Agency of Canada, de forma a proporcionar serviços no controlo alimentar e animal.

Já nos EUA, os laboratórios são maioritariamente pertencentes a Institutos ou a Universidades uma vez que estes detêm de hospitais veterinários. Tem-se ainda o exemplo da Neogen, que sendo uma empresa multinacional, tem maior facilidade em chegar aos mercados nacionais e uma maior carteira de clientes directos.

#### 4.1.2. Valor do mercado potencial

Como já referido anteriormente, o maior impacto económico causado pela doença em estudo é sobre animais de produção, mais especificamente em bovinos e equinos. Portanto, o estudo de mercado foi feito apenas para esta classe de animais.

Foi feita uma análise dos principais produtores mundiais de gado bovino e de equinos em 2013, presente na Tabela 4.2 e 4.3, respectivamente, de forma a compreender o tamanho do mercado. Os países seleccionados são os apresentados na Tabela 4.1, de acordo com a quantidade de laboratórios de referência existentes.

Na tabela 4.2, encontram-se representados os principais produtores de gado do mundo de 2013, em que o líder da lista é o Brasil devido à forte exploração. A Índia apresenta valores de produção superiores aos do Brasil, no entanto não são considerados para este estudo uma vez que não se utiliza o gado bovino para fins comerciais, tendo em vista questões religiosas. Como se verifica na Tabela 4.2, o Brasil tem o maior número de bovinos, a nível mundial, para comercialização.

Tabela 4.2 – Número de cabeças de gado em 2013 dos principais produtores mundiais.

País	Brasil	China	EUA	Europa	Austrália	Canadá	Portugal
Nº de bovinos	217 399 800	113 636 600	89 299 600	88 330 596	29 290 769	12 215 000	1 471 000

Fonte: <http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>

Não só os bovinos têm um enorme impacto na produção e comercialização de carne e dos seus subprodutos, mas também os equinos são afectados no que diz respeito à *performance* quando se trata de cavalos de competição. Todos estes factores têm elevada importância económica.

Foi feito o levantamento do número de equinos em 2013, considerando os mesmos países, em que quem lidera a Tabela 4.3 são os EUA com 10 350 000 cavalos. Os valores apresentados pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)* para a produção equina em Portugal acaba por ser insignificante face aos valores dos EUA ou da China.

Tabela 4.3 – Número de equinos em 2013 dos principais produtores mundiais.

País	EUA	China	Brasil	Europa	Canadá	Austrália	Portugal
Nº de equinos	10 350 000	6 337 380	5 437 000	3 666 450	407 000	267 000	19 500

Fonte: <http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>

Como se pode verificar nas Tabelas 4.2 e 4.3, os números de produção de bovinos e equinos são elevados nos países apresentados, havendo a necessidade de manter o controlo da saúde animal através de testes de diagnóstico, neste caso, especificamente para anemia infecciosa causada por parasitas e bactérias. Para que este tipo de análises, apresente elevada sensibilidade analítica e para que seja possível a sua realização é necessário possuir equipamento especializado, e quando se trata de testes de PCR, há equipamento específico para o efeito, um termociclador, que pode custar aproximadamente €5 000. Desta forma, apenas os laboratórios veterinários são capazes de utilizar este tipo de testes.

A análise do valor de mercado potencial foi realizada com base no mercado português. Foram feitos contactos com laboratórios nacionais como o Inno e o Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) de forma a compreender quantos testes são realizados anualmente para a detecção da doença em estudo. Os valores presentes na Tabela 4.4 referem-se ao diagnóstico maioritariamente a animais de companhia, não sendo valores exactos mas aproximados de acordo com as informações prestadas, como se encontra no Anexo 1.

Tabela 4.4 – Principais laboratórios de diagnóstico veterinário em Portugal com os respectivos números de testes de detecção de anemia infecciosa, em todo o tipo de animais, realizados por ano.

<b>Laboratórios</b>	<b>Nº testes por ano</b>
Inno	≈650
Laboratório Medicina Veterinária (LMV)	≈5
INIAV	≈12
GeneVet	≈400
DNATech	≈200
Biopremier	≈10
<b>Total</b>	<b>1 277</b>

Fonte: Os dados foram obtidos através de entrevistas com responsáveis dos laboratórios veterinários em Portugal (Anexo 1).

Quer o INIAV quer a GeneVet fazem os testes de acordo com protocolos internos sem necessitar de comprar um *kit* de diagnóstico. O LMV faz subcontratação do serviço à Segalab, Laboratório de Sanidade Animal e Segurança Alimentar, que por sua vez subcontrata a Biopremier. O Inno tem o maior volume de testes feitos por uma empresa concorrente, Idexx.

A partir do número total de bovinos e equinos produzidos em Portugal num ano, e considerando o número de testes de diagnóstico realizados para a detecção de anemia infecciosa, pelos dados fornecidos pelos laboratórios nacionais, poderia ser feita uma estimativa para cada país em função do respectivo número de animais produzidos, pela razão calculada para os dados obtidos em Portugal. No entanto, não se conhece a percentagem de testes que são realizados somente a animais de produção, nem foi possível obter este tipo de informação quer em laboratórios nacionais quer internacionais. Contudo, de acordo com os laboratórios nacionais a maioria dos testes são realizados a animais de companhia.

Devido à falta de informação, assumiu-se que são realizados anualmente 1 277 testes para detecção de anemia infecciosa a animais de companhia. Segundo a The European Pet Food Industry (FEDIAF) e o INIAV, em 2013 Portugal possui cerca de 2 600 000 animais de companhia, cães e gatos. Assim, considera-se que para 2 600 000 animais de estimação em Portugal apenas 1 277 são sujeitos ao diagnóstico de anemia infecciosa. Pela mesma razão pode-se calcular o número de testes que deveriam ser realizados para os animais de produção.

Na Tabela 4.5, encontram-se os números totais de animais de produção para Brasil, China, EUA, Europa, Austrália, Canadá e Portugal, considerando que a estimativa do mercado potencial é feita a partir da razão entre o número de testes realizados pelos laboratórios nacionais e o número de animais de estimação de Portugal no ano de 2013.

O cálculo do número de kits apresentado na Tabela 4.5 foi feito tendo em conta que um kit da Biopremier permite testar 96 amostra sanguíneas, assim sendo, dividiu-se o mercado potencial por 96, para se chegar ao número de kits por país.

Tabela 4.5 – Representação anual do número de testes realizados nos principais países produtores de gado bovino e de equinos, estimando o valor aproximado de *kits* com potencial comercialização, considerando que o mercado potencial corresponde à mesma razão de testes realizados a animais de estimação e ao número destes animais em Portugal em 2013.

	<b>Brasil</b>	<b>China</b>	<b>EUA</b>	<b>Europa</b>	<b>Austrália</b>	<b>Canadá</b>	<b>Portugal</b>
<b>Nº de bovinos</b>	217 399 800	113 636 600	89 299 600	88 330 596	29 290 769	12 215 000	1 471 000
<b>Nº de equinos</b>	5 437 000	6 337 380	10 350 000	3 666 450	267 000	407 000	19 500
<b>Nº total de animais</b>	222 836 800	119 973 980	99 649 600	91 997 046	29 557 769	12 622 000	1 490 500
<b>Mercado potencial</b>	85706	46144	38327	35383	11368	4855	573
<b>Nº de kits</b>	893	481	400	369	119	51	6

Fonte: <http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>

Pela análise da Tabela 4.5 tem-se que os mercados mais fortes são o Brasil e a China, uma vez que detêm das maiores produções mundias de bovinos, e os EUA lideram a produção de equinos. Pelos valores apresentados, torna-se importante penetrar nestes grandes mercados.

O somatório do número de *kits* necessários, para a realização do controlo animal para anemia infecciosa e parasitária, corresponde a 2 319. Se for considerado o preço do *kit* igual a 500€ (preço do *kit* praticado pela Biopremier), o valor do mercado potencial corresponde a €1 159 500.

Se ao invés da venda directa do *kit* para laboratórios, for a Biopremier a prestar o serviço de detecção, alargando assim o mercado para países como os que são mencionados, seriam feitos cerca de 222 357 testes, apresentando um potencial mercado com aproximadamente €7 782 488.

O mercado aparenta ser diminuto face às regiões analisadas, mas como revelam os estudos de mercado veterinário há perspectivas de crescimento pela aquisição da técnica de PCR, adaptação ao desenvolvimento tecnológico e pela opção por testes com maior abrangência na detecção de agentes,

uma vez que a terapêutica não varia significativamente. Espera-se que haja um impulsionamento no mercado para que este seja criado e aumentado, tal como já aconteceu com a área alimentar e a implementação e utilização de Next Generation Sequencing na Biopremier, e como outras empresas já proporcionaram.

No entanto há que reunir esforços de várias empresas de forma a direccionar e a concentrar o mercado nos produtos de elevada tecnologia e fiabilidade para o controlo da sanidade animal e de forma a levar ao contínuo desenvolvimento tecnológico.

As necessidades na sanidade animal estão presentes a partir do momento que há o mínimo conhecimento das doenças, o que muda ao longo do tempo é a sensibilização para a doença, a adaptação ao aparecimento de novas tecnologias, a procura e a oferta no mercado.

#### **4.1.3. Maturidade e crescimento do mercado**

Ao longo dos últimos anos, o mercado veterinário sofreu um impacto em termos de desenvolvimento tecnológico, de forma a acompanhar a tecnologia utilizada no diagnóstico humano, havendo maior oferta pela presença de novos produtos e serviços que levam ao crescimento do mercado (MarketsandMarkets, 2014).

De acordo com um relatório de 2014, entre 2009 e 2014 houve um crescimento anual de 2.6% (IBISWorld, 2014) nos serviços prestados por laboratórios veterinários nos EUA, e é esperado um crescimento de 8% até 2018 (MarketsandMarkets, 2014). O facto deste crescimento ser ainda tão lento pode dever-se à falta de regulamentação face à importância e controlo deste tipo de doenças. Em 2018 espera-se uma maior procura de testes de diagnóstico veterinário na Ásia e América do Sul devido ao aumento do *stock* animal nestas regiões, podendo levar à diminuição da quota de mercado na América do Norte.

Como referido anteriormente, e representado na Figura 4.1, França, Reino Unido e Estados Unidos são os países que possuem maior número de laboratórios de referência que por sua vez apresentam maior desenvolvimento nas técnicas de biologia molecular face aos restantes países com laboratórios de referência, que utilizam outro tipo de técnicas de menores custos, mas que poderão ser menos sensíveis e até morosas. O mercado ainda se encontra em crescimento e adaptação face ao diagnóstico molecular e caminha para a inovação.

#### **4.1.4. Análise de competidores**

Foi realizada uma pesquisa dos vários testes de diagnóstico de agentes causadores de anemia infecciosa para clínica veterinária, disponíveis no mercado, fazendo deles o mercado competidor. Os parâmetros considerados foram o tipo de técnica, o tempo necessário para a obtenção dos resultados, o número de espécies detectadas, o número de *kits* utilizados para a detecção das espécies referidas e o número de reacções correspondente, a sensibilidade do teste para a espécie a detectar e o preço de comercialização. Estes dados encontram-se na Tabela 4.6 e foram utilizados para comparar com os do *kit* desenvolvido na Biopremier face aos já existentes.

Tabela 4.6 – Dados adquiridos a partir da consulta dos *sites* de empresas que apresentam um largo *portfólio* de testes de diagnóstico veterinário, e que comercializam, especificamente, *kits* de PCR para detecção de anemia infecciosa, na área veterinária. (Rick – Espécies pertencentes à ordem *Rickettsiales*, Aconoi – Espécies pertencentes à classe *Aconoidasida*)

Empresa	Técnica	Tempo	Espécies	Nº de kits	Nº de reacções	Sensibilidade Especificidade	Preço
Biopremier	PCR	1h30	143 Rick	1	96+96	14 cópias	500 €
			122 Aconoi			1 cópia	
Bioneer <sup>(1)</sup>	PCR	1h30	17 Rick	2	96+96	70 cópias	305 €
		1h30	33 Aconoi			10 cópias	405 €
BioinGentech <sup>(2)</sup>	PCR	3h cada	11 Rick	25	96 cada kit	-	250 €
			14 Aconoi				
Abaxis <sup>(3)</sup>	ELISA	10 min	5 Rick	2	1	Sens. 93% Espec. 96%	-
IDEXX <sup>(4)</sup>	ELISA	10 min	4 Rick	1	1	Sens. 93% Espec. 95%	-

Fontes: (1) <http://eng.bioneer.com/diagnostic/Livestock/Babesia-Theileria-overview.aspx>  
<http://eng.bioneer.com/diagnostic/Livestock/Rickettsiales3-Plex-overview.aspx>  
(2) <http://www.bioingentech.com/List%20of%20Veterinary%20PCR%20Kits.php>  
(3) <http://www.abaxis.com/veterinary/products/rapid-tests.html>  
(4) <http://www.idexx.com/small-animal-health/products-and-services/snap-4dx-plus-test.html>

Um dos parâmetros estudados foi o tipo de técnica utilizada na realização do teste diagnóstico, e como se pode verificar na seguinte tabela são apresentadas duas técnicas distintas, PCR e ELISA, em que as principais vantagens da técnica de ELISA são o tempo e o custo reduzido.

Mas se for considerada apenas a técnica de PCR para efeitos de comparação, verifica-se que o *kit* desenvolvido pela Biopremier tem vantagens em todos os parâmetros estudados, desde o tempo de obtenção de resultados até à sensibilidade do teste. Ou seja, tem menor tempo de reacção, permite a detecção do maior número de espécies causadoras de anemia infecciosa e parasitária, apenas com um *kit*, e pelos valores de sensibilidade e especificidade discutidos e apresentados no capítulo anterior.

Actualmente considera-se que o melhor produto competidor que se encontra no mercado veterinário, utilizando PCR e com melhor documentação técnica, é o da Bioneer. Sendo este o competidor líder, pode-se então comparar ao produto desenvolvido.

Enquanto a Biopremier apresenta apenas um *kit* para ambas as detecções, bactérias e parasitas, com o mesmo protocolo de utilização, o *kit* da Bioneer tem dois protocolos diferentes e dois programas de PCR diferentes, implicando maior demora na obtenção dos resultados para o teste.

Como presente na Tabela 4.6, pode verificar-se que o *kit* da Biopremier detecta mais de 250 espécies apenas num *kit* de detecção enquanto que são necessários dois *kits* da Bioneer para a detecção de 55 espécies. Para a detecção de espécies pertencentes à ordem *Rickettsiales* o *kit* da Biopremier tem como limite de detecção 14 cópias do genoma, apresentando uma sensibilidade 5 vezes melhor do que as 70 cópias dadas pelo competidor líder. Já o limite de detecção de espécies pertencentes à classe *Aconoidasida* é 1 cópia por genoma apresentando uma sensibilidade 10 vezes superior ao do *kit* da concorrência.

Simultaneamente, deve-se analisar o preço por reacção em função do número de espécies detectadas. Pois o preço praticado pela Biopremier é de €500 para a detecção de mais de 250 espécies, enquanto que para a detecção de 55 espécies com o *kit* da Bioneer é de €750, contando que a sensibilidade é significativamente menor.

Em relação às empresas, que se apresentam na tabela acima, foram estudadas apenas as que têm maior força no mercado do diagnóstico não só veterinário mas também humano.

A empresa líder do mercado é a IDEXX Laboratories que surgiu nos Estados Unidos em 1983 com o objectivo de entrar no mercado clínico para detecção de doenças em gado. Ao longo dos anos tem-se vindo a distinguir na realização de serviços e produção de *kits* de imunoensaios. Actualmente, o mercado expandiu-se para animais de companhia e de produção, sendo um laboratório de referência e líder do mercado internacional. Em 2008 ultrapassou 1 bilião de dolares de receitas e em 2012 a IDEXX Laboratories e VCA Antech detêm de 45-50% (MarketsandMarkets, 2014) do mercado veterinário.

Tal como a americana IDEXX, a Abaxis tem há mais de vinte anos como missão fornecer, ao mercado de medicina humana e veterinária, dispositivos de diagnóstico rápido para amostras sanguíneas que permitam responder às necessidades de saúde. O VetScan, dispositivo para diagnóstico veterinário, foi introduzido no mercado em 1995.

A Bioneer surgiu na Coreia em 1992, sendo empresa de biotecnologia, direccionada para a biologia molecular e, recentemente para o desenvolvimento de *kits* de diagnóstico veterinário. Já a BioinGentech é uma empresa de biotecnologia de menor dimensão, no Chile, que disponibiliza produtos e serviços que permite o diagnóstico em humanos e animais, recorrendo essencialmente à biologia molecular.

#### **4.1.5. Outros stakeholders relevantes no mercado**

Na saúde animal há questões relacionadas com os tipos de doenças e o controlo das mesmas, de forma a controlar simultaneamente a cadeia alimentar, assegurar a saúde pública e permitir a oferta de alimentos seguros.

Para assegurar a saúde animal, é necessária a existência de serviços veterinários bem estruturados, capacitados e aptos para detecção e adopção precoce das medidas de controlo e erradicação das doenças. Nesse sentido, torna-se essencial a presença de entidades que regulamentem este mercado.

Em Portugal, a agência que regulamenta e controla a qualidade das explorações de produção de animais é a Direcção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV). Esta tem como função avaliar as políticas de segurança alimentar, de protecção animal e de sanidade animal, investindo nas funções de Autoridade Sanitária Veterinária. Quando toca à regulamentação do gado bovino, o DGAV tem de realizar o registo de nascimento e registo de existência e deslocações de bovinos. Esta entidade está directamente ligada a outras que permitem controlar a sanidade animal, como a Organização de Produtores Pecuários (OPP). As OPP são estruturas que executam os programas de erradicação e vigilância de doenças dos animais e acções de controlo para a prevenção das doenças constantes do Programa Nacional de Saúde Animal, em bovinos, ovinos e caprinos. Actualmente existem planos e programas sanitários de erradicação para a encefalopatia espongiiforme bovina (BSE), tuberculose

bovina, brucelose bovina e leucose enzoótica bovina. Esta organização realiza intervenções sanitárias necessárias para o rastreio das doenças em causa.

Em relação à Europa, o Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças, fundado na Suécia em 2005, tem como objectivo a identificação, avaliação e comunicação de ameaças emergentes para a saúde humana e veterinária. Para atingir esta missão, a agência trabalha em parceria com organismos de proteção de saúde, como European Parliament, The Council and Presidency of the European Union, European Commission, World Health Organization (WHO), para fortalecer e desenvolver a vigilância de doenças infecciosas em todo o continente e sistemas de alerta precoce.

Na América do Norte, a saúde animal é regulamentada pela The Canadian Food Inspection Agency, tendo como objectivo assegurar a qualidade alimentar contribuindo para a sanidade animal, a fim de minimizar e gerir os riscos. Para além de ser uma agência reguladora também faz prestação de serviços de laboratório.

Nos EUA, em 1862 surgiu do Departamento de Agricultura (USDA) com finalidade de expandir os mercados para os produtos agrícolas e apoiar o desenvolvimento económico internacional, tentando melhorar a qualidade da alimentação e de saúde. Através da investigação e desenvolvimento de tecnologia, USDA ajuda a reduzir as perdas económicas das indústrias de gado e aves e da comunidade agrícola rural associado a doenças infecciosas, genéticas e metabólicas. Em 1972 surgiu Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), sob responsabilidade da USDA, que trabalha para prevenir a existência de pragas e doenças e promove a saúde da agricultura na América.

Na América do Sul, mais especificamente no Brasil, não existe nenhuma agência de regulamentação que trabalhe específica e exclusivamente no controlo e prevenção de doenças animais, mas existe uma parceria de forte ligação entre o Ministério da Agricultura e a OIE que reconhece os serviços veterinários como um bem público.

O principal representante australiano nas questões do estatuto sanitário animal é The Office of the Chief Veterinary Officer, proporcionando o desenvolvimento de políticas e estratégias nacionais e da prestação de aconselhamento científico para minimizar os potenciais impactos.

Atualmente, a China ocupa o primeiro lugar no mundo em termos de produção de cereais, algodão, frutas, legumes, carnes, aves, ovos e produtos da pesca, e tem ligações cada vez mais estreitas com outros países para cooperação na área agrícola com algumas das principais organizações agrícolas e de financiamento internacionais. Como tal, a China necessita de uma entidade reguladora como o Ministério da Agricultura da República Popular da China (MOA-RPC). Este tem dado prioridade ao trabalho na agricultura, adoptando políticas e medidas importantes para apoiar o desenvolvimento do sector agrícola e fazendo a aplicação extensiva da ciência e tecnologia agrícola.

Assim, deve tentar-se promover a importância da doença através de campanhas de sensibilização à mesma fazendo chegar a estas entidades e divulgar quer o *kit* quer o serviço prestado pela Biopremier, tal como já existe.

#### **4.1.6. Ameaças e barreiras à entrada no mercado**

De acordo com a análise de competidores internacionais, verifica-se que o mercado é forte pela presença de grandes empresas de biotecnologia como a Abaxis e a IDEXX que possuem

maioritariamente o mercado veterinário. Este tipo de empresas já detém estratégias de distribuição definidas, realização de projectos de inovação, vinculação de parcerias com entidades que permitem a divulgação dos produtos, tal como uma vasta carteira de clientes no mercado veterinário.

Desta forma, a Biopremier sendo uma empresa de reduzida dimensão na área veterinária e com recente entrada na comercialização de *kits* de diagnóstico molecular, tem maior dificuldade em penetrar no mercado. Desta forma, encontra-se em estudo o patenteamento da tecnologia, relatórios de validação do *kit* desenvolvido e acreditação do mesmo, podendo atribuir maior força na entrada deste.

O patenteamento é possível uma vez que traz melhorias da técnica com um novo *set de primers* que apresentam maior gama de detecção, com melhores resultados, podendo apresentar-se na classificação internacional de patentes como C12Q 1/68, que corresponde a medições ou testes que envolvem ácidos nucleicos.

#### **4.1.7. Oportunidade de parcerias**

Face às barreiras apresentadas e face à concorrência, a Biopremier, como uma empresa promissora na biotecnologia para o diagnóstico molecular, deve publicitar todos os seus serviços e produtos que tem para oferecer ao mercado veterinário. Assim, a criação de parcerias pode ser uma estratégia vantajosa de dar a conhecer os serviços, tal como apresentar um novo produto de diagnóstico veterinário. Desta forma, pode haver um crescimento empresarial permitindo entrar rapidamente nos novos mercados, criar oportunidades de optimização da tecnologia e melhorar o serviço ao cliente.

Para o desenvolvimento do serviço de detecção de anemia infecciosa e parasitária foram feitas parcerias com instituições académicas, que foram necessárias para o desenvolvimento do *kit* de diagnóstico veterinário. Estas parcerias consistiram na cedência de amostras sanguíneas para os testes de optimização da reacção de PCR.

Foram cedidas amostras sanguíneas de diferentes animais e instituições, como, sangues de bovinos cedidos pelo Professor Doutor João Cannas da Silva, sangues de bovinos cedidos pelo Professor Doutor Miguel Saraiva Lima e Professor Doutor George Stilwell da Faculdade de Medicina Veterinária e sangues de cães cedidos pelo Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho no âmbito de um projecto em conjunto com Ana Margarida Alho, aluna de Doutoramento da FMV.

O CIRAD cedeu DNAs de referência, com identificação das espécies, extraído a partir de sangues de bovino e de cão, corações, pulmão, cérebro de cabra e culturas celulares para os testes de especificidade e de sensibilidade analítica no desenvolvimento do serviço de detecção de anemia infecciosa da Biopremier.

Recentemente, foi realizada uma reunião na FMV com um especialista em epidemiologia, de forma a obter mais informação quanto à distribuição da doença causada por parasitas e bactérias, nos bovinos e nos equinos. No entanto, os dados de prevalência destes casos não aparecem disponíveis ou então nunca foi realizado um estudo neste contexto. Como tal, foi proposto uma parceria entre a Faculdade e a Biopremier para fazer uma avaliação com cerca de 100 amostras sanguíneas de cavalos nacionais. Este estudo seria vantajoso uma vez que haveria a possibilidade de ser publicado em revista, como a Veterinária Atual, em que aborda estudos, produtos, serviços, tecnologia e investigação na área

veterinária. Seria mais uma forma de poder divulgar a empresa, os seus serviços e o produto para o qual as amostras estão a ser testadas.

Pode ser ainda criada uma parceria com distribuidores internacionais, cujo objectivo é introduzir o produto no mercado externo, como EUA, Brasil, Europa e China. Uma vez que a Biopremier tem capacidade para chegar ao mercado ibérico, pode criar uma rede de distribuição. O *kit* desenvolvido pode ser também divulgado em feiras e congressos, apresentando sempre a Biopremier e os seus produtos na área clínica.

## **4.2. Modelo de Negócio**

### **4.2.1. Proposta de valor**

Como já referido, o mercado na área humana para diagnóstico clínico a partir de técnicas de biologia molecular encontra-se muito bem estruturado, desenvolvido e em contínuo estudo face aos resultados promissores na saúde humana. Já na clínica veterinária tal não se verifica, mas já começam a aparecer os primeiros testes no mercado que irão levar ao crescimento deste, tal como se sucedeu com a medicina humana. Este crescimento acontecerá quando a comunidade científica estiver consciencializada da doença e começarem a surgir os primeiros surtos.

Para que este crescimento no mercado veterinário seja notório é necessário avaliar os impactos causados por determinadas doenças nos animais. As perdas económicas podem ser de diferentes ordens: perdas directas pela morte dos animais e diminuição de produção, ou perdas indirectas em consequência das medidas de quarentena, como vacinas e controlo das infraestruturas.

O produto desenvolvido pela Biopremier foi idealizado de modo a contribuir na prevenção de anemia infecciosa, causada por parasitas e bactérias, em animais de produção e de companhia, podendo, assim, proporcionar melhorias na sanidade animal minimizando os impactos mencionados.

O *kit* de detecção de anemia infecciosa, pela técnica de PCR, é um produto de biologia molecular, uma área em crescimento no diagnóstico veterinário. Este vai de encontro com as necessidades dos laboratórios veterinários, proporcionando a detecção de dois grandes grupos de espécies causadores da doença, com elevada sensibilidade e confiança.

O produto desenvolvido tem uma vantagem, face à concorrência, quanto à incorporação de um controlo que avalia a qualidade da amostra testada, possui controlo positivo interno, ou seja avalia a existência do DNA, a eficiência da extração do DNA a partir da amostra sanguínea do animal e a presença de inibidores que põem em causa a reacção, no caso destes existirem.

A utilização do *kit* permite a redução de custos dos produtores durante o processo de quarentena, uma vez que se faz o rastreio antes de isolar o animal supostamente infectado, evitando a contaminação de animais saudáveis e reduzindo os gastos no tratamento a estes.

Fazendo uma análise quantitativa do produto, este apresenta vantagens significativas, quanto ao preço por reacção para 250 espécies detectadas e, como já dito, o *kit* da Biopremier faz a detecção de dois grande grupos de espécies causadores de anemia infecciosa em reacções independentes, mas quer o protocolo de utilização quer o programa de PCR são os mesmos, levando à redução do tempo até se obter o resultado final, positivo ou negativo, para a doença.

Este *kit* para além de poder ser comercializado para laboratórios especializados e com condições tecnológicas para a realização do teste, pode ainda ser utilizado pela Biopremier na prestação de serviços não só para laboratórios que não possuem equipamentos e técnicos qualificados, mas também para hospitais e clínicas veterinárias.

#### 4.2.2. Cadeia de valor

A Biopremier poderá actuar de três formas na comercialização do *kit* veterinário: com a venda directa do *kit*, com a prestação do serviço ou ainda na venda da tecnologia. Neste sentido, haverá três tipos de cadeias de valor possíveis.

##### A) Venda directa do *kit*

A venda pode ser feita directamente pela Biopremier ou pela presença de um distribuidor formulando assim uma parceria que possibilita maior facilidade na entrada no mercado internacional.

Na Figura 4.2 encontra-se representado o esquema da cadeia de valor para a venda directa do *kit* pela Biopremier.



Figura 4.2 – Representação esquemática da cadeia de valor para a venda directa do *kit* pela Biopremier.

A venda directa do *kit* pela Biopremier para laboratórios veterinários é possível quando feita na Península Ibérica. Já no caso dos demais países é importante estabelecer parcerias com distribuidores internacionais de produtos na área veterinária, na medida que têm melhor conhecimento do mercado, cultura, estratégias de venda mais eficazes e das necessidades.

A cadeia de valor do *kit* de detecção de anemia infecciosa em animais, encontra-se representada na Figura 4.3, mostrando a sequência de etapas na venda do produto recorrendo a parcerias.



Figura 4.3 – Representação esquemática da cadeia de valor para a venda do *kit*, recorrendo a parcerias com distribuidores.

A cadeia de valor para a comercialização do produto começa pela compra dos reagentes e suportes físicos que constituem o *kit*. Posteriormente dá-se a produção do mesmo que é feita nas infra-estruturas da Biopremier de acordo com os protocolos de produção que asseguram a qualidade do produto. Por fim ocorre a comercialização do *kit* de detecção de anemia infecciosa e parasitária para laboratórios veterinários com biologia molecular.

## B) Prestação de serviço

Para além da venda do *kit* para laboratórios especializados, pode-se considerar também, a prestação do serviço pela Biopremier utilizando o kit, como se verifica na Figura 4.4.



Figura 4.4 – Representação esquemática da cadeia de valor para a prestação de serviço a partir da utilização interna do produto.

No caso de se prestar o serviço, como é feito actualmente, existem etapas demoradas, desde a primeira consulta com o animal até ao diagnóstico (Figura 4.4). Esta hipótese começa com uma consulta para a aquisição da amostra sanguínea do animal, que pode ser realizada em hospitais, clínicas e laboratórios veterinários. Esta será transportada para os laboratórios da Biopremier, pelos seus parceiros de distribuição. Após a realização do teste, é enviado, pela Biopremier, um relatório que apresenta o resultado de forma simplificada, fornecendo o resultado ao médico veterinário que fará o diagnóstico clínico final do animal.

Poderá acontecer, ainda, que no caso do teste ser positivo para qualquer das detecções, o médico queira saber especificamente qual a espécie que afecta o animal, e aí a Biopremier poderá fazer um serviço de sequenciação do produto de PCR.

## C) Venda ou licenciamento da patente

Há ainda a opção de poder comercializar a inovação e o desenvolvimento a uma outra empresa, como representado na Figura 4.5.



Figura 4.5 – Representação esquemática da cadeia de valor para a comercialização da inovação e do desenvolvimento.

Como todos os desenvolvimentos tecnológicos feitos por empresas ou até por grupos de investigação, este não é excepção e também poderá ser vendido todo o desenvolvimento do teste, relatórios de validação, reagentes unicamente produzidos para o *kit* e o registo da patente. Seria importante que a empresa interessada na compra fosse uma empresa líder na biotecnologia, com experiência na área veterinária e com força no mercado de diagnóstico veterinário.

#### 4.2.3. Modelo de receitas

O teste desenvolvido pode ser comercializado de três formas distintas, tal como demonstrado nas cadeias de valor acima descritas.

##### A) Venda directa do *kit*

Se for vendido como produto para laboratórios veterinários é pelo valor de €500, em que é possível fazer a detecção de dois grupos de espécies em apenas um *kit*. Na Península Ibérica a venda pode ser feita directamente a partir da Biopremier, e para os restantes países deve-se recorrer a parcerias com distribuidores internacionais.

De forma a conquistar o mercado veterinário, e consequentemente aumentar o volume de receitas, podem ser realizadas campanhas de desconto por quantidade vendida. Também pode motivar-se as empresas distribuidoras aumentando a taxa da parceria no caso destes efectuarem vendas superiores a um determinado número de *kits* por ano. Ou ainda, a realização de parcerias com empresas distribuidoras de equipamentos de biologia molecular e tentar a fidelização do teste face ao equipamento, ou seja, na compra de um termociclador apresentar sempre o *kit* de detecção de anemia infecciosa da Biopremier, como sendo um teste de qualidade, levando também ao aparecimento do serviço de detecção da doença nos laboratórios veterinários, e ao mesmo tempo leva à sensibilização da incidência da mesma.

##### B) Prestação de serviço

A Biopremier pode manter a prestação do serviço, como faz actualmente, e até alargar a sua carteira de clientes uma vez que o teste demonstra melhorias face ao serviço actual, tendo um preço por detecção de €35.

##### C) Venda ou licenciamento da patente

Em último caso, a empresa poderá tomar a decisão de vender a tecnologia desenvolvida, em que o seu valor terá de ser avaliado de acordo com o tamanho e força do mercado, tendo sempre em conta que é uma tecnologia muito utilizada na biologia molecular, é um método rápido, barato e simples de produzir inúmeras cópias de uma determinada molécula de DNA. Esta forma de obtenção de receita deve ser ponderada entre ambas as partes e devem ser analisados factores como regime de exclusividade da venda, quais as áreas geográficas de comercialização, valor da patente e até por quanto tempo.

O “valor da patente” está relacionado com o seu potencial de valorização e exploração económica. Essa valorização e exploração económica, para além da comercialização directa do produto, opera-se através da venda da patente ou, finalmente, pelo licenciamento dos direitos de exploração da patente a terceiros. A Biopremier como titular da patente poderá vendê-la a outra empresa, ou pode licenciar a utilização da invenção e receber os *royalties* das vendas como remuneração dessa licença. Pode ainda estabelecer uma cláusula de desempenho de acordo com as vendas anuais realizadas, de forma a evitar que a licença da patente seja adquirida e não tenha qualquer utilização.

O teste encontra-se totalmente aferido e finalizado, não precisando sofrer quaisquer ensaios de validação, uma vez que o relatório de validação também já se encontra formalizado, sendo também um factor que influencia no valor da venda.

Como apresentado, o *kit* da Biopremier pode ser comercializado em forma de produto ou como serviço prestado pela mesma, tendo duas fontes de receita contínua. Podendo ainda vender a tecnologia, sendo uma fonte de receita única.

#### **4.2.4. Processo de produção**

A produção do *kit* é feita nos laboratórios de produção da Biopremier, independentemente deste ser comercializado ou utilizado para a realização de serviços internos. No entanto, as infraestruturas a utilizar dependem da estratégia utilizada.

No caso da prestação de serviços, os laboratórios encontram-se no primeiro piso, tal como representado na Figura 2.1. Todo o procedimento, desde a recepção da amostra até à obtenção do resultado final, encontra-se descrito no Capítulo 2. Materiais e Métodos, na secção Laboratórios Biopremier. Para a realização de qualquer trabalho prático nestas salas é necessário ter conhecimento das regras de cada uma e preencher todo o tipo de documentação necessária para o uso de equipamentos, reposição de *stocks*, utilização de equipamentos, realização de higienização e respectiva eficácia. Desta forma é mantido o controlo das instalações garantindo qualidade na realização do serviço.

### **4.3. Estratégia comercial**

#### **4.3.1. Previsão de vendas**

A previsão de vendas é aplicada à estratégia de comercialização do *kit* a laboratórios veterinários num prazo de 5 anos, correspondendo ao intervalo de 2016 a 2020, fazendo uma análise semestral.

Na Tabela 4.5 considerou-se a estimativa do mercado potencial, feito a partir da razão entre o número de testes realizados pelos laboratórios nacionais e o número de animais de estimação de Portugal no ano de 2013. Desta forma, assumiu-se que o mercado corresponde a €1 159 500 sendo comercializados 2 319 *kits*.

Entre 2016 e 2020 a sensibilização para esta doença terá de ser promovida como uma preocupação pela sanidade animal, e esta poderá ser conquistada por vários caminhos: a alteração da regulamentação para a obrigatoriedade deste teste a animais de produção comercializados e a existência de surtos da doença. Se esses esforços forem feitos, acredita-se que o mercado poderá crescer até 30%, ou seja 1 em cada 3 animais farão o teste de anemia infecciosa. Para tal, a Biopremier terá de criar uma forte estratégia de divulgação de um novo produto com características únicas no mercado, que levarão ao aumento da procura deste teste.

O ano de 2015 é um ano com enorme importância na entrada do produto no mercado. Uma vez que o *kit* se encontra finalizado, o último semestre de 2015 é essencial para a produção do *kit* nas infraestruturas da Biopremier, apresentação de um novo mercado, divulgação do novo produto, iniciação de diversas parcerias, e ainda o processamento de toda a documentação necessária para submeter patente internacional.

Após uma introdução teórica no mercado, no ano de 2016 assume-se que sejam realizadas vendas directas a laboratórios veterinários em Portugal e Espanha. Nesta fase é crucial tentar manter a

presença em feiras e congressos, onde facilmente se dá a conhecer o produto. Em 2017 espera-se que as vendas aumentem 50%, com a expectativa de que a Biopremier chega à Europa. Após esta entrada, em 2018 prevê-se chegar aos laboratórios situados na China, Austrália, Canada e USA, levando à duplicação das vendas. No quarto ano, espera-se um crescimento suficiente para manter as necessidades dos laboratórios veterinários. No entanto em 2020, deseja-se que a biologia molecular já esteja no topo dos testes de diagnóstico e que o teste de anemia infecciosa causada por bactérias e parasitas esteja a ser requisitado pela obrigatoriedade.

Durante estes 5 anos, espera-se uma mudança da consciência científica quanto a este tipo de doenças, e que também sejam desenvolvidos mais testes de diagnóstico na área veterinária, facilitando a entrada deles no mercado uma vez que já há parcerias e clientes que conhecem os produtos e a empresa.

#### **4.3.2. Riscos do produto**

Como já mencionado, o mercado da biologia molecular é recente e pouco divulgado, mas já é dominado por empresas com enorme potencial na área de diagnóstico, começando a tornar-se num mercado muito competitivo. Contudo, a Biopremier, no que toca aos *kits* de diagnóstico molecular, encontra-se em constante evolução e conquista nas diversas áreas de trabalho. Agora, com a entrada deste teste na medicina veterinária, que demonstra resultados de confiança e de elevada sensibilidade e especificidade, o risco é menor devido às vantagens apresentadas face à concorrência.

O principal risco inerente ao produto é o tipo de crescimento que o mercado poderá sofrer. O mercado pode não crescer ou pode crescer de forma mais lenta do que o esperado em 5 anos. O factor tempo irá depender dos avanços tecnológicos e da consciencialização da comunidade científica.

Para a entrada do produto no mercado internacional há necessidade de estabelecer parcerias com distribuidores com carteiras de clientes bem estruturadas. Pode ser um risco quanto às cláusulas contractuais, no caso destas não serem bem estabelecidas levando à diminuição de receitas, quando os distribuidores seleccionados não cumprirem com os objectivos garantidos. Assim, deve-se estipular medidas que impossibilitem a redução de vendas, como o estabelecimento de estratégias de motivação financeira e compromisso de um determinado número de vendas a curto prazo. Todo este processo após a realização da parceria deve ser formalizado no contrato e deve ser acompanhado com relatórios mensais, que permita à Biopremier ter conhecimento das operações realizadas.

Há riscos associados à produção do *kit* pela Biopremier, devendo haver sempre uma boa gestão do *stock* em função das vendas, de forma a evitar acumulação de *kits* no caso de haver quebras no mercado levando ao gasto de recursos económicos quando não se dá escoamento do produto em questão.

#### **4.3.3. Pontos fortes da empresa**

É fundamental promover de forma eficiente a qualidade dos *kits* desenvolvidos e da própria empresa, com o fim de aproveitar as oportunidades do mercado.

A Biopremier já se encontra no mercado da biologia molecular há mais de 10 anos, tendo começando pela prestação de serviços especializados. Em 2009 a área agro-alimentar e em 2014 a clínica humana

da Biopremier iniciaram o desenvolvimento de testes diagnóstico, que já se encontram no mercado internacional com elevada confiabilidade.

A sua localização é uma vantagem, uma vez que estabelece parceria com a FCUL permitindo estar associada à comunidade científica da Faculdade. O facto de ser uma empresa portuguesa sediada em Lisboa permite o fácil acesso ao mercado da Península Ibérica, e fortes relações com os restantes países europeus. Portugal mostra elevado interesse e constante actividade na inovação e desenvolvimento de dispositivos aplicáveis à saúde humana e animal.

Actualmente, a penetração num novo mercado, face ao crescimento da empresa e à adaptação dos métodos utilizados ao uso da biologia molecular, pode trazer oportunidades para todas as áreas de trabalho, mostrando a versatilidade da Biopremier. O *kit* apresentado pelo grupo de investigação da clínica veterinária demonstra resultados altamente competitivos aos testes existentes no mercado, e assim também se torna promissor não só como produto mas também como serviço que pode ser prestado pela empresa.

O preço do *kit* é mais um ponto forte face à concorrência, à qualidade do produto, e principalmente face ao número de espécies detectadas.

A razão preço/número de espécies detectadas pelo *kit* da Biopremier é um ponto forte face à concorrência, pois este teste apesar de ser ligeiramente mais caro permite a detecção de um grande número de organismos pertencentes à ordem *Rickettsiales* e à classe *Aconoidasida* que causam anemia infecciosa. No entanto, as soluções existentes no mercado são mais económicas e conseguem detectar os principais agentes causadores de anemia infecciosa. Contudo, deve mencionar-se como um ponto forte da Biopremier o facto do *kit* desenvolvido ser mais sensível na detecção das espécies desejadas, quando comparada com os *kits* da concorrência, o que sem dúvida poderá levar a uma preferência pelo *kit* apresentado.

Para além da tecnologia, a equipa de trabalho da empresa é essencial para garantir qualidade dos serviços prestados e dos produtos desenvolvidos. A equipa da Biopremier Clínica é constituída por profissionais de áreas relacionadas, medicina veterinária, biologia e genética humana. É uma equipa com experiência na manipulação de material genético, em equipamentos de biologia molecular e com visão do mercado clínico. São profissionais polivalentes com capacidade de adaptação a qualquer área existente na empresa.

Um ponto forte não só para a empresa mas também para o produto em si, é a possível existência de patente para alguns reagentes, pois a técnica e o tipo de teste já existem no mercado. Este factor acaba por se tornar numa ameaça para as empresas concorrentes.

#### **4.3.4. Definição da posição estratégica**

A Biopremier, empresa de inovação e serviços em biotecnologia, visa pela qualidade dos serviços prestados e pelo desenvolvimento de produtos de diagnóstico molecular com características competitivas face ao mercado e às empresas concorrentes.

A realização de parcerias com unidades de investigação e universidades têm grande impacto para a entrada no mercado e na dimensão da empresa, fortalecendo a posição que ocupa.

#### 4.3.5. Marketing Mix

O *Marketing Mix* controla 4 sectores que em conjunto levam à resposta desejada, de acordo com o mercado-alvo, pela empresa. O produto, o preço, a distribuição e a comunicação levam ao posicionamento do produto no mercado.

##### 4.3.5.1. Produto

O *kit* desenvolvido insere-se na área de diagnóstico veterinário, com tecnologia inovadora na biologia molecular. Este teste é direccionado a animais de companhia e de produção, aplicado à detecção de anemia infecciosa, causada por bactérias e parasitas, levando ao controlo da sanidade animal. Apenas as amostras sanguíneas podem ser analisadas. É um produto de fácil utilização mas que requer equipamento específico, termociclador. Este *kit* será constituído por três tubos, PreMix, água e enzima, numa embalagem com características térmicas específicas.

##### 4.3.5.2. Preço

O valor do produto é essencial para o mercado, visto ser a expectativa do consumidor quanto aos benefícios. O *kit* de detecção de anemia infecciosa da Biopremier será comercializado por €500 para 96 reacções. Este valor tem como referência o principal concorrente e os custos de produção, no entanto, como já referido, foram realizados testes que demonstraram elevada sensibilidade e especificidade, levando à obtenção de resultados de confiança. Este valor pode ser reduzido no caso de ser requisitado um *kit* com menos reacções, para além de que poderá haver descontos na compra em quantidades.

##### 4.3.5.3. Distribuição

De forma a transpôr o produto para os mercados externos e explorar posicionamentos adequados às características específicas do produto, face aos consumidores alvo, há necessidade de criar canais de distribuição, garantindo uma oferta de qualidade e aposta em novos produtos. Assim, deve apostar-se em marcas de distribuição nos países que foram mencionados durante o estudo dos laboratórios de referência, que coincidem com os países que apresentam maior número de produção de equinos e bovinos. Na Tabela 4.7 encontram-se os principais distribuidores com os respectivos contactos e com o número de empresas que criaram parceria.

Tabela 4.7 – Lista dos principais distribuidores nas regiões demográficas consideradas no estudo dos laboratórios de referência.

Distribuidores	País	Fornecedores	Contacto
R-Biopharm <sup>(1)</sup>	Austrália	7	<u>Morada:</u> 34 Woodfield Boulevard Caringbah NSW 2229 <u>Telefone:</u> (02) 9668 0600 <u>E-mail:</u> sales@labdiagnostics.com.au
Ngaio Diagnostics <sup>(2)</sup>	Nova Zelandia	25	<u>Morada:</u> 81 Halifax St. East, Nelson 7010, <u>Telefone:</u> +64 3 548 4727 <u>E-mail:</u> sai.palagummi@ngaio.co.nz

Nordep Bio-Diagnostics Co <sup>(3)</sup>	China	5	<u>Morada:</u> 3Luohu District, Shenzhen Jintang Street, No. 48 , Cai Wuwei Regent Tower Room 2602 , South Block <u>Telefone:</u> (0755) 8344-7218 <u>E-mail:</u> shenzhen@nordep.com.cn
Anapure BioScientific <sup>(4)</sup>	China	6	<u>Morada:</u> Dongzhimen street outside the east A 2nd International Building A 20A (100027) <u>Telefone:</u> + 86-010-84478816 <u>E-mail:</u> info@anapure.com
Genese <sup>(5)</sup>	Brasil	> 30	<u>Morada:</u> Rua Diogo Vaz, 291 - Cambuci, São Paulo <u>Telefone:</u> 55 11 3341.6987
Scientifca inc. <sup>(6)</sup>	Miami	-	<u>Morada:</u> 1221 Brickell Avenue Suite 900, FL 33131 <u>Telefone:</u> 305 669-0731 <u>E-mail:</u> customerservice@scientificainc.com
Midwest Veterinary Purchasing (MVP) <sup>(7)</sup>	Canadá	> 150	<u>Morada:</u> 1600 Inkster Boulevard in Winnipeg, Manitoba <u>Telefone:</u> (204)233-8152 <u>E-mail:</u> info@midwestvet.com
Aventix <sup>(8)</sup>	Canadá	15	<u>Morada:</u> 4350 Mainway Burlington, ON L7L 5R7 <u>Telefone:</u> (905)332-4744
Animal Health International <sup>(9)</sup>	EUA e Canadá	> 1000	<u>Morada:</u> 822 7th St Ste 740 Greeley, CO 80631 <u>Telefone:</u> 800-854-7664 <u>E-mail:</u> webteam@animalhealthinternational.com
Inivitech <sup>(10)</sup>	Reino Unido	-	<u>Morada:</u> 4a/4b Molesworth Business Estate, Molesworth, Huntingdon, Cambs PE28 0QG <u>Telefone:</u> 0845 313 3348 <u>E-mail:</u> sales@invitech.co.uk
BestBion <sup>(11)</sup>	Alemanha	> 10	<u>Morada:</u> Horbeller Str. 33 50858 Köln <u>Telefone:</u> +49 2234 98795 0
Biozol Diagnostica GmbH Vertrieb <sup>(12)</sup>	Alemanha	> 40	<u>Morada:</u> Obere Hauptstrasse 10b 85386 Eching <u>Telefone:</u> + 49-89-37 99 666-6 <u>E-mail:</u> info@biozol.de
All.Diag <sup>(13)</sup>	França	-	<u>Morada:</u> 8 RUE ETTORE BUGATTI - CS28006 FRANCE - 67038 STRASBOURG Cedex <u>Telefone:</u> +33 3 88 78 80 88 <u>E-mail:</u> commande@alldiag.com

- Fontes: (1) <http://www.r-biopharm.com/>  
(2) <http://www.ngaio.co.nz/>  
(3) <http://www.nordep.com.cn/>  
(4) <http://www.anapure.com/index.aspx>  
(5) <http://www.gendiag.com.br/>  
(6) <http://www.scientificainc.com/>  
(7) <http://www.midwestvet.com/index.jsp>  
(8) <http://www.aventix.ca/index.html>  
(9) <http://www.animalhealthinternational.com/>  
(10) <http://www.invitech.co.uk/default.asp>  
(11) <http://www.bestbiondx.de/>  
(12) <http://www.biozol.de/>  
(13) <http://www.alldiag.com/indexus.html>

Todas as empresas distribuidoras aqui presentes são médias e grandes distribuidoras que representam médias e grandes empresas direccionadas para o diagnóstico, não só veterinário mas também humano e alimentar. Os produtos e soluções apresentados por estes distribuidores são comercializados para centros de investigação, laboratórios hospitalares, laboratórios veterinários e laboratórios ambientais permitindo o progresso científico e tecnológico e melhorando a saúde animal.

À excepção da Invitech, que foi criada em 2008, todas as restantes empresas têm mais de 15 anos de experiência de produtos com eficiência e alta tecnologia através de parcerias sólidas com fabricantes internacionais.

A R-Biopharm Australia é uma distribuidora de produtos e soluções inovadoras, que desde 1988 representa países como: Reino Unido, Itália, Holanda, França, Espanha, Canada, EUA, América Latina, Brasil, Austrália e China.

A Ngaio Diagnostics, fundada em 1991 representam fabricantes como Bio-X Diagnostics, Biomed, VetAll Laboratories (VAL) e Vetericyn na área de diagnóstico veterinário, distribuindo *kits* ELISA.

Na China em 1997 foi fundada a Anapure BioScientific, distribuidora de alta tecnologia com sede em Pequim, Xangai, Guangzhou, Chongqing, Chengdu e Qingdao. A sua missão reside no fornecimento de tecnologia, qualidade e serviços especializados, de parceiros como Merck, Idexx Laboratories, ThermoFisher, Neogen e Abbott Laboratories, para ajudar os laboratórios no progresso científico e tecnológico. Em 1999 foi fundada a Nordep Bio-Diagnostics Co, em que o principal objectivo é satisfazer as necessidades dos laboratórios, centros de investigação, hospitais e clínicas com produtos que permitam detecção rápida, como os apresentados por empresas como Abaxis, SurgiVet, DMS Laboratories, BVT e Analycon.

No Brasil, em 1992, foi fundada a Genese Produtos Diagnósticos com o objetivo de facilitar a realização de exames e projetos de investigação, através de uma sólida parceria com fabricantes internacionais para distribuição de produtos com eficiência e alta tecnologia. Foi pioneira no Brasil na distribuição de produtos para o diagnóstico *in vitro*.

Scientifica Inc. é distribuidora há mais de 25 anos de reagentes e equipamentos, a preços competitivos, na área da microbiologia e da biologia. Esta encontra-se sediada em Miami, mas tem carteira de clientes por toda a região Latino-Americana.

Na América do Norte, a distribuidora canadense Midwest Veterinary Purchasing (MPV) oferece produtos veterinários e serviços de qualidade. São representantes de marcas como Abbott Laboratories, Bayer Inc., Abaxis Inc., BioVet Inc., Idexx Laboratories Inc., Novartis, Pfizer, entre outras multinacionais. Em 2001 foi fundada a Aventix com o objectivo de proporcionar melhorias na saúde animal. A criação de parcerias com fabricantes internacionais (Abaxis e Heska) fez com que a Aventix comercializasse os seus produtos no Canadá, EUA, Europa e Ásia, levando ao crescimento do mercado tornando-se líder no diagnóstico veterinário.

Animal Health International Inc. é a distribuidora americana líder na saúde animal, representa mais de 1000 fabricantes e tem um *portfólio* alargado de produtos desde vacinas, testes de diagnóstico e produtos farmacêuticos até equipamentos e *software*. Têm centros de distribuição e representantes de vendas em 9 estados americanos, sendo os principais no Hawaii e no Canadá.

Na Europa, a Invitech fundada em 2008 tem como objectivo a escolha de produtos que permitam o desenvolvimento e inovação nos laboratórios europeus, acentando na qualidade dos produtos apresentados. Em 1989 surge a distribuidora mais eficiente da Alemanha, Biozol Diagnostica GmbH Vertrieb, tendo mais de um milhão de produtos de diferentes fabricantes, entre os quais anticorpos e *kits* de diagnóstico humano e veterinário. A francesa All.Diag, fundada em 1993, é uma das líderes entre os laboratórios de análises clínicas. Encontra-se representada em mais de 40 países, que fornecem produtos de diagnóstico e de saúde e equipamentos utilizados na biologia molecular de elevada qualidade e inovadores.

Para além da realização de parcerias com distribuidoras internacionais, a Biopremier pode fazer a distribuição na Península Ibérica, uma vez que se encontra bem posicionada geograficamente.

#### 4.3.5.4. Comunicação

O produto pode ser anunciado no *site* da Biopremier, em artigos publicados a respeito do *kit* e em revistas que abordem a medicina veterinária, diagnóstico molecular e biotecnologia. A realização de campanhas de sensibilização são fundamentais para a promover quer os riscos da doença quer o teste desenvolvido.

Presença em feiras e congressos também é importante para a imagem da empresa. Na Tabela 4.8, encontram-se a próximas feiras com maior interesse para a divulgação do *kit* da Biopremier.

Tabela 4.8 – Levantamento das principais feiras internacionais na área veterinária.

Feira	Local	Data	Tema
Biotechnica 2015 <sup>(1)</sup>	Deutsche Messe AG Hannover Deutsche Messe AG, Alemanha	6 - 8 Outubro	Evento europeu líder em biotecnologia
Animal Vetex 2016 <sup>(2)</sup>	BVV Veletrhy Brno, Republica Checa	3 - 7 Abril	Feira Internacional de Veterinária
Veterinary Medical Career Fair 2016 <sup>(3)</sup>	Washington, D.C.	6 Março	Sem informação

Fontes: (1) <http://www.biotechnica.de/home>

(2) <http://www.bvv.cz/en/animal-vetex/product-categories/>

(3) <http://www.aavmc.org/Meetings.aspx>

Estas três feiras irão apresentar temas como os seguintes: diagnósticos e medicamentos, aparelhos veterinários e equipamentos, instrumentos e aparelhos para a higiene dos animais, informática e literatura para a medicina veterinária e biotecnologia médica. Este tipo de eventos não serve só para mostrar e divulgar o produto, mas também dar a conhecer a empresa portuguesa.

Na tabela 4.9 são mencionados alguns congressos que irão apresentar avanços tecnológicos na área veterinária no ano de 2016.

Tabela 4.9 – Levantamento de alguns congressos internacionais que permitem a divulgação do produto desenvolvido.

<b>Congressos</b>	<b>Local</b>	<b>Data</b>	<b>Tema</b>
The NAVC Conference 2016 <sup>(1)</sup>	Orlando, Florida	16 -20 Janeiro	Congresso Internacional de Veterinária
BSAVA Congress 2016 <sup>(2)</sup>	International Convention Center, Birmingham, Reino Unido	7 - 10 Abril	Liderança na área veterinária
The Egyptian Society For Cattle Diseases 2016 <sup>(3)</sup>	Hurghada, Egipto	1-4 Fevereiro	Técnicas de diagnóstico

Fontes: (1) <https://navc.com/conference/>

(2) <http://www.bsava.com/Portals/4/knowledgevault/congress/files/congress16preview.pdf>

(3) <http://cms.advetresearch.com/index.php/soc/soc>

Inovação médica e técnicas de diagnóstico são alguns dos temas abordados, no entanto os congressos não têm apenas conferências mas também exposição de empresas, dos seus produtos e serviços, sendo mais uma possível forma de entrada no mercado.

Em suma, as relações públicas e a força de vendas são as variáveis mais importantes no *marketing mix* da comunicação dado que este é um mercado *Business-to-business*. Esta deve ser a aposta principal no caso de se optar pela comercialização do *kit* através da venda directa para laboratórios, pois o mesmo já não se verifica no caso da prestação de serviços



## 5. Conclusões

Face às necessidades expostas à ocorrência de anemia infecciosa é importante a entrada de um novo *kit* no mercado, no entanto a comunidade científica tem de estar sensibilizada para a doença.

Para a optimização da reacção do teste foram desenhados *primers* para a detecção de dois grandes grupos de agentes causadores de anemia infecciosa, usando a técnica de PCR. Estes permitem a diferenciação de anemia causada por bactérias da ordem *Rickettsiales* ou anemia causada por parasitas da classe *Aconoidasida*. Ambas as *mixes* amplificam um controlo positivo interno, ou seja, amplifica DNA naturalmente presente nas amostras clínicas veterinárias, avaliando não só a presença de inibidores mas também o processo de extracção do DNA. O teste deverá ser aplicado a amostras sanguíneas e é composto por duas reacções independentes com o mesmo programa de PCR.

Ambos os testes foram sujeitos a variações de algumas condições, com o objectivo de aumentar a sensibilidade e especificidade, parâmetros que foram avaliados durante a fase de validação. O estudo das variações foram a fase mais longa e complexa do processo de optimização, que irá atribuir as características ideais ao desempenho do *kit*. Os resultados obtidos para os índices de especificidade e sensibilidade foram superiores aos critérios de aceitação. Tal como os limites de detecção de cada teste foram superiores aos *kits* presentes no mercado.

De acordo com os ensaios realizados e com os valores finais apresentados considera-se que o presente teste permite a obtenção de resultados fiáveis e de acordo com as exigências esperadas, tendo em conta a importância do diagnóstico no tratamento da doença provocada por bactérias ou parasitas. O *kit* permite a detecção de DNA de espécies pertencentes à ordem *Rickettsiales* com excepção do género *Wolbachia*; e à classe *Aconoidasida*, com excepção do género *Plasmodium*. Foi possível detectar o primeiro caso nacional de *Cytauxzoon manul*, um género de parasita.

A comparação realizada entre o *kit* da Biopremier com um *kit* da concorrência, que possui características favoráveis à detecção destes agentes, comprovou que o teste desenvolvido apresenta melhorias face aos testes que se encontram no mercado de diagnóstico veterinário. Não excluindo o factor preço que torna o produto extremamente apelativo face aos atributos apresentados.

O teste será de fácil execução e interpretação, proporcionando a possibilidade de detecção precoce do agente da doença, nas situações de suspeita de infecção, sem necessidade de efectuar múltiplas análises para pesquisa individualizada de cada um dos agentes possíveis, uma vez que é aplicada a mesma terapêutica. Este é compatível com os equipamentos de PCR convencional habitualmente existentes nos laboratórios veterinários.

O teste apresenta inovação na abordagem do diagnóstico, direccionada primameiramente para a terapêutica, na qual não implica custos nos casos negativos. Dependendo do resultado obtido, o veterinário poderá decidir tratar o animal com antibiótico, antiparasitário, conjugar ambos ou requerer mais exames. O *kit* da Biopremier é o primeiro teste comercializado com detecção do maior número de agentes, em que todas as espécies são de difícil detecção quando usada a microbiologia clássica.

A passagem de um serviço de detecção *simplex* para um teste *duplex*, em que ocorre detecção qualitativa de *Rickettsiales* (*Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*) e *Aconoidasida* (*Babesia*, *Theileria*, *Cytauxzoon*, *Leucocytozoon*, *Hepatocystis*), por PCR, tem características favoráveis à entrada do teste como *kit* no mercado.

Actualmente, o mercado não se encontra regulamentado para a obrigatoriedade da realização deste teste. No entanto, espera-se que nos próximos 5 anos a sociedade científica se torne sensibilizada para a ocorrência da doença e de todas as suas consequências a nível económico e a nível de sanidade animal.

Este produto é exclusivamente direccionado a laboratórios veterinários com equipamentos adequados para a realização da reacção de PCR. O levantamento do mercado realizou-se sobre as regiões demográficas com maior densidade de laboratórios de referência, de acordo com dados fornecidos pela OIE.

A análise do potencial mercado foi realizada apenas a animais de produção, bovinos e equinos, no entanto o teste pode ser aplicado também a animais de companhia. Assumiu-se que 1% da totalidade dos animais realizaria o teste de detecção de anemia infecciosa.

Contudo, espera-se uma evolução científica, aparecimento de novas tecnologias e surtos da doença, para que daqui a 5 anos, o mercado possa contar com a realização de testes para 30% (1 em cada 3 animais) dos animais totais dos países considerados. Para tal, as entidades reguladoras da sanidade animal têm de tomar medidas de prevenção e controlo da doença.

O produto desenvolvido tem características que tornam a sua entrada no mercado, mais fácil, mesmo com empresas competidoras fortes. A sua entrada pode ocorrer de três formas: comercialização do produto, com redes de distribuição bem definidas, prestação de serviço como é feito actualmente, ou ainda a venda de toda a ideia e desenvolvimento. Todo o tipo de documentação de certificação e validação do *kit*, já se encontram realizados, restando apenas a submissão da patente. Estes e factores internos da empresa, como a equipa de investigação e a sua localização geográfica são pontos fortes para a empresa.

Actualmente, a Biopremier optou por fazer comercialização directa do produto por €500 e a prestação do serviço clínico. O preço *versus* as características deste teste são vantagens que permitirão maior facilidade de entrada no mercado. De forma a permitir a divulgação, quer do produto quer da empresa, torna-se essencial a presença do *kit* Biopremier em feiras e congressos.

Em suma, o teste foi desenvolvido com sucesso e com características apelativas ao mercado-alvo, laboratórios veterinários. O estudo de mercado revelou que é possível fazer a diferença na área de biologia molecular com a entrada de um novo *kit*.

## 6. Bibliografia

- Adi S M, Simpson A G B. *The Revised Classification of Eukaryotes*. J. Eukaryot. Microbiol., **2012**, 59(5):429–493.
- AU–IBAR: African Union, Interafrican Bureau for Animal Resources. *Anaplasmosis*. **2013**, (<http://www.au-ibar.org/anaplasmosis>, consultado a 22 de Abril de 2015).
- Aziz K B A, Khalil W K B, Mahmoud M S, Hassan N H A, Mabrouk D M, Suarez C E. *Molecular Characterization of Babesiosis Infected Cattle: Improvement of Diagnosis and Profiling of the Immune Response Genes Expression*. Global Veterinaria, **2014**, 12(2):197–206.
- Barnewall R E, Ohashi N, Rikihisa Y. *Ehrlichia chaffeensis and E. sennetsu, but Not the Human Granulocytic Ehrlichiosis Agent, Colocalize with Transferrin Receptor and Up-Regulate Transferrin Receptor mRNA by Activating Iron-Responsive Protein 1*. Infect Immun., **1999**, 67(5):2258–2265.
- Berg J M, Tymoczko J L, Stryer L. 6.1.5. Selected DNA Sequences Can BE Greatly Amplified by the Polymerase Chain Reaction – Biochemistry. W. H. Freeman, **2002**, 5<sup>th</sup> Edition, 209–215.
- Bernabeu-Wittela M, Segura-Porta F. *Enfermedades producidas por Rickettsia*. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin., **2005**, 23(3):163–172.
- Bock R, Jackson L, Vos A, Jorgense W. *Babesiosis of cattle*. Parasitology, **2004**, 129:S247–S269.
- Bouyer D H, Stenos J, Crocquet-Valdes P, Moron C G, Popov V L, Zavala-Velazquez J E, Foil L D, Stothard D R, Azad A F, Walker D H. *Rickettsia felis: molecular characterization of a new member of the spotted fever group*. Int J Syst Evol Microbiol., **2001**, 51(2):339–47.
- Bowman D D. *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. Elsevier Health Sci., **2014**, 10<sup>th</sup> Edition, 110–113.
- Breed R S, Murray E G D, Smith N R. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The Williams & Wilkins Company, **1957**, 7<sup>th</sup> Edition, 934–956.
- Cardoso L, Yisaschar-Mekuzas Y, Rodrigues F T, Costa A, Machado J, Diz-Lopes D, Baneth G. *Canine babesiosis in northern Portugal and molecular characterization of vector-borne co-infections*. Parasites & Vectors, **2010**, 3:27.
- CFSPH: Center for Food Security & Public Health. *Bovine Babesiosis*. **2008**.
- Criado-Fornelio A, Buling A, Pingret J L, Etievant M, Boucraut-Baralon C, Alongi A, Agnone A, Torina A. *Hemoprotozoa of domestic animals in France: Prevalence and molecular characterization*. Veterinary Parasitology, **2009**, 159:73–76.
- Diário Oficial da União. *Brasília – DF, sexta-feira, 4 de abril de 2008*. **2008**, ([http://sites.unasp.edu.br/portal/secretariageral/Documentos/DOU/2008-1/04/DO1\\_2008\\_04\\_04.pdf](http://sites.unasp.edu.br/portal/secretariageral/Documentos/DOU/2008-1/04/DO1_2008_04_04.pdf), consultado a 22 de Abril de 2015).
- Dumler J S, Barbet A F, Bekker C P J, Dasch G A, Palmer G H, Ray S C, Rikihisa Y, Rurangirwa F R. *Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HE*

agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **2001**, 51:2145–2165.

Eddlestone S M, Gaunt S D, Neer T M, Boudreaux C M, Gill A, Haschke E, Corstvet R E. *PCR detection of Anaplasma platys in blood and tissue of dogs during acute phase of experimental infection*. *Experimental Parasitology*, **2007**, 115:205–210.

EFTBA: European Federation of Thoroughbred Breeders Associations. *EFTBA Veterinary Newsletter 12 – Equine Piroplasmiasis: Babesia caballi and Theileria equi*. **2014**.

Elsheikha H, Khan N A. *Essentials of Veterinary Parasitology*. Horizon Scientific Press, **2011**, 108–161.

Ferla M P, Thrash J C, Giovannoni S J, Patrick W M. *New rRNA Gene-Based Phylogenies of the Alphaproteobacteria Provide Perspective on Major Groups, Mitochondrial Ancestry and Phylogenetic Instability*. *PLoS One*, **2013**, 8(12).

Fredricks D N. *The Prokaryotes – Introduction to the Rickettsiales and Other Intracellular Prokaryotes*. **2006**, 3<sup>rd</sup> Edition, 5:457–466.

Galvão M A, Silva L J, Nascimento E M, Calic S B, Sousa R, Bacellar F. *Riquetsioses no Brasil e Portugal: ocorrência, distribuição e diagnóstico*. *Ver. Saúde Pública*, **2005**, 39(5):850–856.

Garrity G M. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer Sci., **2001**, 2<sup>nd</sup> Edition, 2:97–105.

Georgiades K, Madoui M A, Le P, Robert C, Raoult D. *Phylogenomic Analysis of Odysella thessalonicensis Fortifies the Common Origin of Rickettsiales, Pelagibacter ubique and Reclimonas americana Mitochondrion*. *PLoS ONE*, **2011**, 6(9).

Goater T M, Goater C P, Esch G W. *Parasitism: The Diversity and Ecology of Animal Parasites*. Cambridge University Press, **2014**, 2<sup>nd</sup> Edition, 67.

Gohil S, Kats L M, Sturm A, Cooke B M. *Recent insights into alteration of red blood cells by Babesia bovis: moovin' forward*. *Trends in Parasitology*, **2010**, 26(12):591–599.

Gortz H D, Schmidt H J. *Bergey's manual of systematic bacteriology – Family III. Holosporaceae fam. nov.* Springer-Verlag, **2005**, 2<sup>nd</sup> Edition, 2:146–160.

Grote J, Thrash J C, Huggett M J, Landry Z C, Carini P, Giovannoni S J, Rappé M S. *Streamlining and Core Genome Conservation among Highly Divergent Members of the SAR11 Clade*. *mBio of Amer. Soc. Microb.*, **2012**, 3(5)

Hornok S, Mester A, Takács N, Mera I G F, Fuente J, Farkas R. *Re-emergence of bovine piroplasmiasis in Hungary: has the etiological role of Babesia divergens been taken over by B. major and Theileria buffeli?*. *Parasites & Vectors*, **2014**, 7:434–437.

Hunfeld K P, Hildebrandt A, Gray J S. *Babesiosis: Recent insights into an ancient disease*. *International Journal for Parasitology*, **2008**, 38:1219–1237.

IBISWorld. *Veterinary Laboratory Testing Service in the US: Market Research Report*. **2014**, (<http://www.ibisworld.com/industry/veterinary-laboratory-testing-services.html>, consultado a 8 de Maio de 2015).

Irwin P J. *Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control*. *Parasites & Vectors*, **2009**, 2(1).

- Kang Y J, Diao X N, Zhao G Y, Chen M H, Xiong Y, Shi M, Fu W M, Guo Y J, Pan B, Chen X P, Holmes E C, Gillespie J J, Dumler S J, Zhang Y Z. *Extensive diversity of Rickettsiales bacteria in two species of ticks from China and the evolution of the Rickettsiales*. BMC Evolutionary Biology, **2014**, 14:167.
- Kawamura T. *Interpretação de Teste sob a Visão Epidemiológica. Eficiência de um Teste*. Arq. Bras. Cardiol., **2002**, 79(4):437–441.
- Kubista M, Andrade J M, Bengtsson M, Forootan A, Jona´k J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N. *The real-time polymerase chain reaction*. Molecular Aspects of Medicine, **2006**, 27:95–125.
- Lack J B, Reichard M V, Van Den Bussche R A. *Phylogeny and evolution of the Piropasmida as inferred from 18S rRNA sequences*. International Journal for Parasitology, **2012**, 42:353–363.
- Lin M Y, Huang H P. *Use of a doxycycline-enrofloxacin-metronidazole combination with/without diminazene diaceturate to treat naturally occurring canine babesiosis caused by Babesia gibsoni*. Acta Veterinaria Scandinavica, **2010**, 52:27–29.
- LSUAgCenter: Louisiana State University – Agriculture Center. *Equine Piropasmosis*. **2015**, ([http://www.lsuagcenter.com/en/crops\\_livestock/livestock/animal\\_health/horses/Equine-Piropasmosis.htm](http://www.lsuagcenter.com/en/crops_livestock/livestock/animal_health/horses/Equine-Piropasmosis.htm), consultado a 22 de Abril de 2015).
- MarketsandMarkets. *Veterinary Diagnostics Market by Products (Clinical Chemistry, Hematology Analyzers, Molecular Diagnostics, Immunodiagnosics, Diagnostics Imaging), by Animals (Companion, Food-producing, Dog, Livestock, Poultry, Swine) - Global Forecast to 2018*. **2014**, (<http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/veterinary-diagnostics-market-26017452.html>, consultado a 8 de Maio de 2015).
- Montagna M, Sasserá D, Epis S, Bazzocchi C, Vannini C, Lo N, Sacchi L, Fukatsu T, Petroni G, Bandi C. *“Candidatus Midichloriaceae” fam. nov. (Rickettsiales), an Ecologically Widespread Clade of Intracellular Alphaproteobacteria*. Appl. Environ. Microbiol., **2013**, 79(10):3241–3248.
- Mosqueda J, Olvera-Ramírez A, Aguilar-Tipacamú G, Cantó G J. *Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis*. Current Medicinal Chemistry, **2012**, 19:1504–1518.
- Moulder J W. *Bergeys’ Manual of Determinative Bacteriology – Rickettsiales*. Waverly Press. Baltimore, **1974**, 882–915.
- Mtshali M S, Mtshali P S. *Molecular diagnosis and phylogenetic analysis of Babesia bigemina and Babesia bovis hemoparasites from cattle in South Africa*. BMC Veterinary Research, **2013**, 9:154.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. *Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction*. Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology, **1986**, 263–273.
- Nehrbass-Stuedli A, Boykin D, Tidwell R R, Brun R. *Novel Diamidines with Activity against Babesia divergens In Vitro and Babesia microti In Vivo*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **2011**, 3439–3445.
- Nicholson W L, Allen K E, McQuiston J H, Breitschwerdt E B, Little S E. *The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people*. Elsevier, **2010**, 205–212.

- Njiri N E, Bronsvort B M, Collins N E, Steyn H C, Troskie M, Vorster I, Thumbi S M, Sibeko K P, Jennings A, Wyk I C, Mbole-Kariuki M, Kiara H, Poole E J, Hanotte O, Coetzer K, Oosthuizen M C, Woolhouse M, Toye P. *The epidemiology of tick-borne haemoparasites as determined by the reverse line blot hybridization assay in an intensively studied cohort of calves in western Kenya*. *Veterinary Parasitology*, **2015**, 210:69–76.
- Nwoha R. Prevalence of trypanosomosis in livestock and pet animals in Ikwano L.G.A. of Abia State. *J Veterinar Sci Technol.*, **2013**, 4(4):88–90.
- OIE: World Organisation for Animal Health. *Bovine Babesiosis - Aetiology Epidemiology Diagnosis Prevention and Control References*. **2013**.
- OIE: World Organisation for Animal Health. *OIE Terrestrial Manual 2014 – Chapter 2.4.16. – Theileriosis*. **2014**.
- OIE: World Organisation for Animal Health. *OIE Terrestrial Manual 2014 – List of tests for international trade*. **2014a**.
- Otranto D, Testini G, Dantas-Torres F, Latrofa M S, Diniz P P, Caprariis D, Lia R P, Mencke N, Stanneck D, Capelli G, Breitschwerdt E B. *Diagnosis of Canine Vector-Borne Diseases in Young Dogs: a Longitudinal Study*. *Journal of Clinical Microbiology*, **2010**, 3316–3324.
- Oura C A, Tait A, Asimwe B, Lubega G W, Weir W. *Haemoparasite prevalence and Theileria parva strain diversity in Cape buffalo (Syncerus caffer) in Uganda*. **2011**, 175(3–4):212–219.
- Pang H, Winkler H H. *Copy number of the 16S rRNA gene in Rickettsia prowazakii*. *J Bacteriol.*, **1993**, 175(12):3893–3896.
- Pelt-Verkuil E, Belkum A, Hays J P. *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Springer Sci., **2008**, 1–118.
- Reardon M J, Pierce K R. *Acute Experimental Canine Ehrlichiosis – I. Sequential Reaction of the Hemic and Lymphoreticular Systems*. *Vet. Pathol.*, **1981**, 18:48–61.
- RIRDC: Rural Industries Research & Development Corporation. *Equine Exotic Diseases – A manual for horse owners*. **2002**.
- Rooney A P. *Mechanisms Underlying the Evolution and Maintenance of Functionally Heterogeneous 18S rRNA Genes in Apicomplexans*. *Molecular Biology and Evolution*, **2004**, 21(9): 1704–1711.
- Roux V, Raoult D. *Phylogenetic analysis of members of the genus Rickettsia using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB)*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **2000**, 50:1449–1455.
- Schuller M, Sloots T P, James G S, Halliday C L, Carter I W J. *PCR for Clinical Microbiology*. Springer Sci., **2010**.
- Silveira J, Rabelo E, Lima P, Chaves B, Flávio M, Ribeiro B. *Post-mortem hemoparasite detection in free-living Brazilian brown brocket deer (Mazama gouazoubira, Fischer 1814)*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, **2014**, 23(2):206–215.
- Sleigh M A. *Protozoa and Other Protists*. Cambridge University Press, **1989**, Chapter 1.

Stanczak J, Cieniuch S, Lass A, Biernat B, Racewicz M. *Detection and quantification of Anaplasma phagocytophilum and Babesia spp. in Ixodes ricinus ticks from urban and rural environment, northern Poland, by real-time polymerase chain reaction.* Exp Appl Acarol., **2015**, 66(1):63-81.

Vannier E, Krause P J. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases.* Hindawi Publishing Corporation, **2009**.

Vannini C, Ferrantini F, Schleifer K H, Ludwig W, Verni F, Petroni G. “*Candidatus Anadelfobacter veles*” and “*Candidatus Cyrtobacter comes*,” *Two New Rickettsiales Species Hosted by the Protist Ciliate Euplotes harpa (Ciliophora, Spirotrichea).* Applied and Environmental Microbiology, **2010**, 4047–4054.

Videira A. *Engenharia Genética: Princípios e Aplicações.* Lidel, **2011**, 2<sup>nd</sup> Edition, 15–32.

Walker D H. *Medical Microbiology – Rickettsiae.* University of Texas Medical Branch at Galveston, **1996**, 4<sup>th</sup> Edition, Chapter 38.

Waner T, Harrus S. *Canine Monocytic Ehrlichiosis – From Pathology to Clinical Manifestations.* Israel Journal of Veterinary Medicine, **2013**, 68(1):12–18.

Wen B, Rikihisa Y, Mott J M, Greene R, Kim H Y, Zhi N, Couto G C, Unver A, Bartsch R. *Comparison of Nested PCR with Immunofluorescent-Antibody Assay for Detection of Ehrlichia canis Infection in Dogs Treated with Doxycycline.* Journal of Clinical Microbiology, **1997**, 35(7):1852–1855.

Yu X J, Walker D H. *The Prokaryotes – The Order Rickettsiales.* **2006**, 3<sup>rd</sup> Edition, 5:493–528.

Zajac A M, Conboy G A. *Veterinary Clinical Parasitology.* John Wiley & Sons Inc, **2012**, 5<sup>th</sup> Edition, 202–205.



## Anexos

Anexo 1 – Resumo das entrevistas aos principais laboratórios veterinários em Portugal, para levantamento das necessidades dos laboratórios de diagnóstico. Entrevistas realizadas via telefone com duração de 1h sobre os tópicos mencionados e algumas perspetivas do mercado actual.



### Mestrado em Biotecnologia

Questionário a laboratórios nacionais para levantamento do número de testes realizados para a detecção de anemia infecciosa

	INNO (Drª Paula Simões)	LMV	INIAV (Drº Jacinto Gomes)	GeneVet	DNA Tech (Drª Marta Melo)	Biopremier
Usam biologia molecular?	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
Porque NAO?	Falta de técnicos e equipamentos	Falta de equipamentos	-	-	-	-
Que técnica utilizam?	Microbiologia, serologia e imunoensaio	-	Imunoensaio	PCR	PCR, serologia e imunoensaio	PCR
No caso de subcontratação, onde?	IDEXX	Biopremier	-	-	-	-
Quantos testes fazem?	650 por ano	5 por ano	12 por ano	400 por ano	200 por ano	10 por ano

