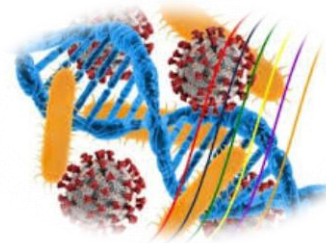


# Boas práticas em diagnóstico molecular de doenças infecciosas

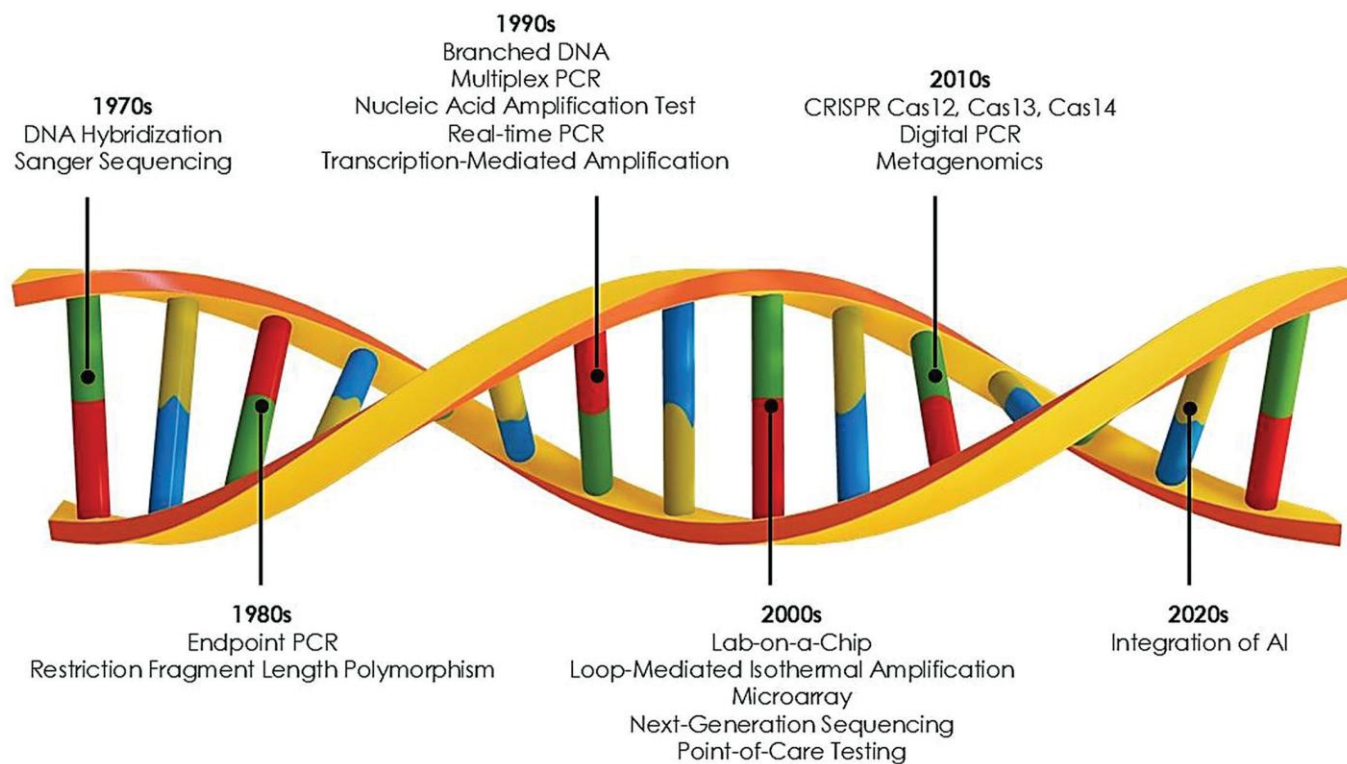
*Prof. Doutora Lurdes Monteiro*



# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: Evolução

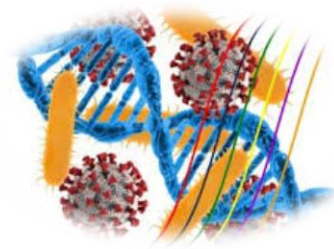


- Desde a descoberta dos ácidos nucleicos



Bacig M. PJP 2025, 10 (2) 18-24

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: Evolução



- Desde a descoberta dos ácidos nucleicos

- Centrifugation vs filtration vs magnetic bead-based
- Single-use vs semi-automated vs automated platforms
- **Polymerase Chain Reaction (PCR)**
  - DNA vs RNA (PCR vs RT-PCR)
  - End point vs quantitative
- **Other NAATs**
  - Loop-mediated isothermal amplification
  - Nicking endonuclease amplification
  - Helicase chain reaction
  - Transcription mediated amplification
  - Recombinase-aided amplification
- **Probe-based**
  - Fluorescence/FRET-based
  - Chromogenesis or chemiluminescence
  - Electrochemical detection
  - Detection by optical properties
- **Direct visualization (electrophoresis)**
  - **Sequencing/NGS**
    - CRISPR
  - **Mass Spectrometry**
- **Amplification byproduct detection**

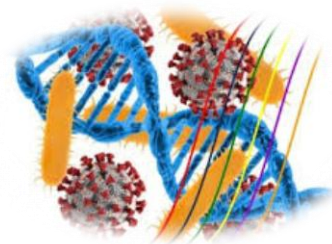


• Real-time PCR

- Integrated, microfluidic point-of-care
- High-throughout, robotic in-lab

Schmitz et al. Jcm, 2022 60(10) 1-17

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: Evolução



## • A Era pós Covid

A pandemia despoletou vários desafios na área do diagnóstico molecular de doenças infecciosas:

1. Tempos de resposta cada vez mais curtos
2. Capacidade de resposta a situações de urgência/emergência
3. Capacidade de avaliar múltiplos agentes na mesma amostra
4. Capacidade de diagnóstico sindrómico

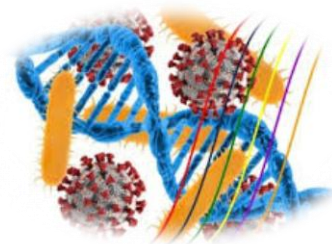


1. Pressão para fazer mais com menos sem sacrificar a qualidade
2. Aumento da complexidade das necessidades clínicas
2. Os clientes/parceiros/utentes exigem mais



**Pensar de forma diferente**

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: métodos moleculares



- Sensibilidade

- Rapidez

- Menos restrições nas condições de transporte das amostras

- Maior acessibilidade ao alvo

- Amplificações não específicas

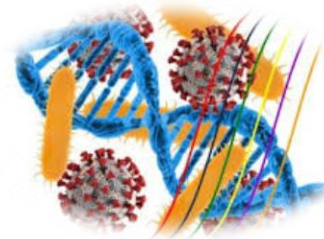
- Inibidores

- Detecção de m.o. viáveis e não viáveis

- Contaminações

- Custos

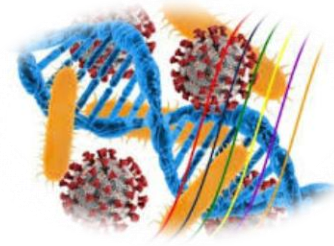
# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: o laboratório



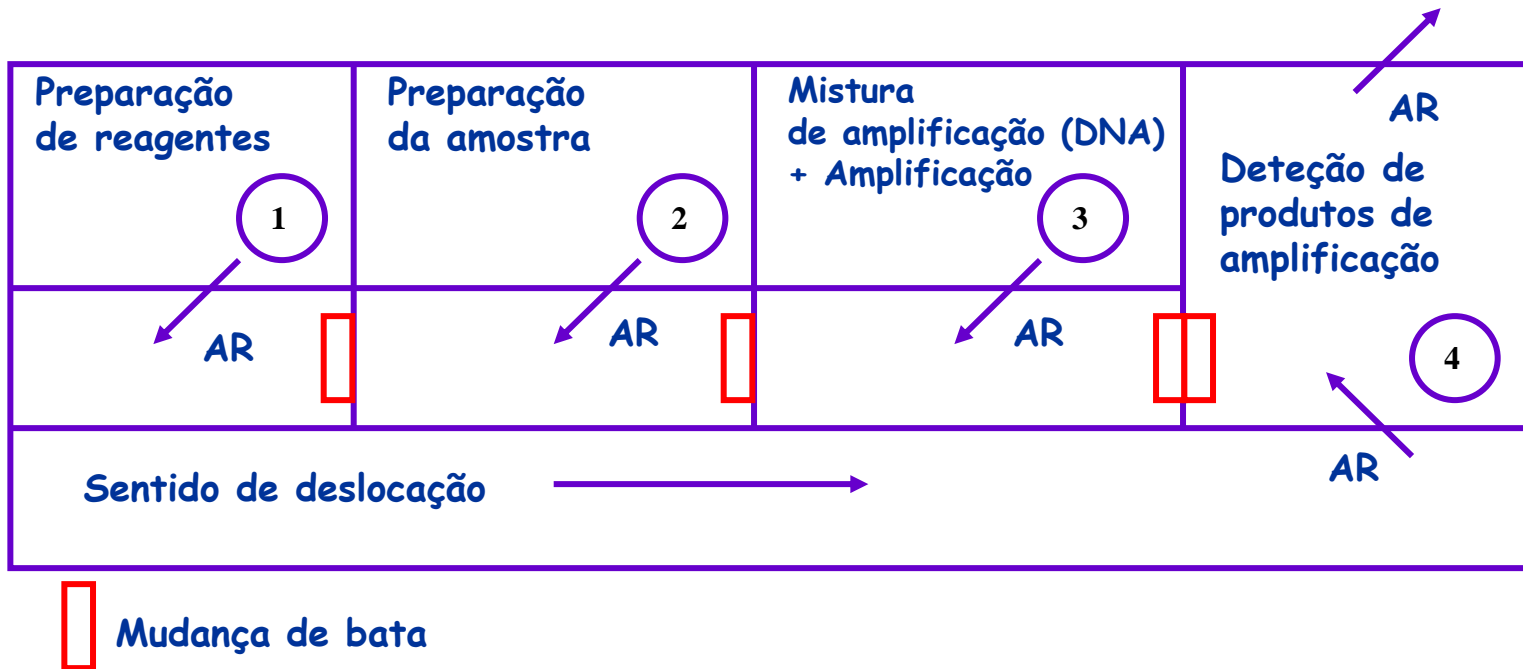
- Portaria nº392/2019

Designação	Função do compartimento (e outras informações)	Área útil (mínima) m <sup>2</sup>	Largura (mínima) m	NSB (*)	Obs.
Sala de microscopia . . . . .	Para exames microscópicos. . . . .	–	–	–	Dispensável no caso de não executar técnicas de fluorescência.
Salas de biologia molecular (b) (e).	Para exames de biologia molecular	–	–	2	Com câmara de fluxo laminar de segurança biológica.
Sala de extração de Ácidos Nucleicos.	Tratamento de amostras biológicas; Processamento/manipulação/pipetagem de amostras de ADN genómico com possibilidade de armazenamento do mesmo.	5	–	2	—
Sala pré-amplificação . . .	Preparações de reações de amplificação enzimática de ADN.	4	–	–	—
Sala ou área restrita para adição de ADN genómico.	Adição de ADN genómico para amplificação enzimática.	3	–	–	—
Sala de amplificação e pós-amplificação enzimática de ADN.	Purificação e análise dos produtos amplificados.	6	–	–	—
Sala de radionuclidos . . .	Preparação/marcação de sondas com radionuclidos. Eletroforese vertical em gel de poliacrilamida hibridação, secagem de	3	–	–	Dispensável no caso de não utilizar técnicas com radioatividade.

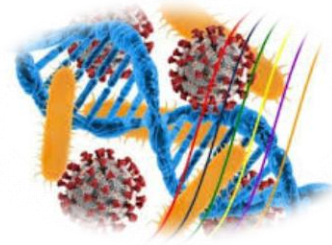
# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: o laboratório



- Separação física das diferentes etapas



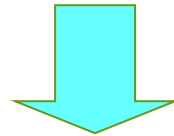
# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: o laboratório



- Controlo dos riscos de contaminação

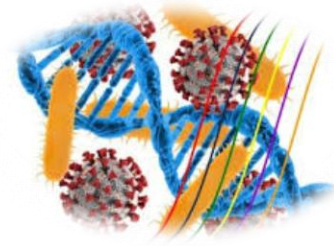
## Via química

- Uso da Uracil-N glicosilase

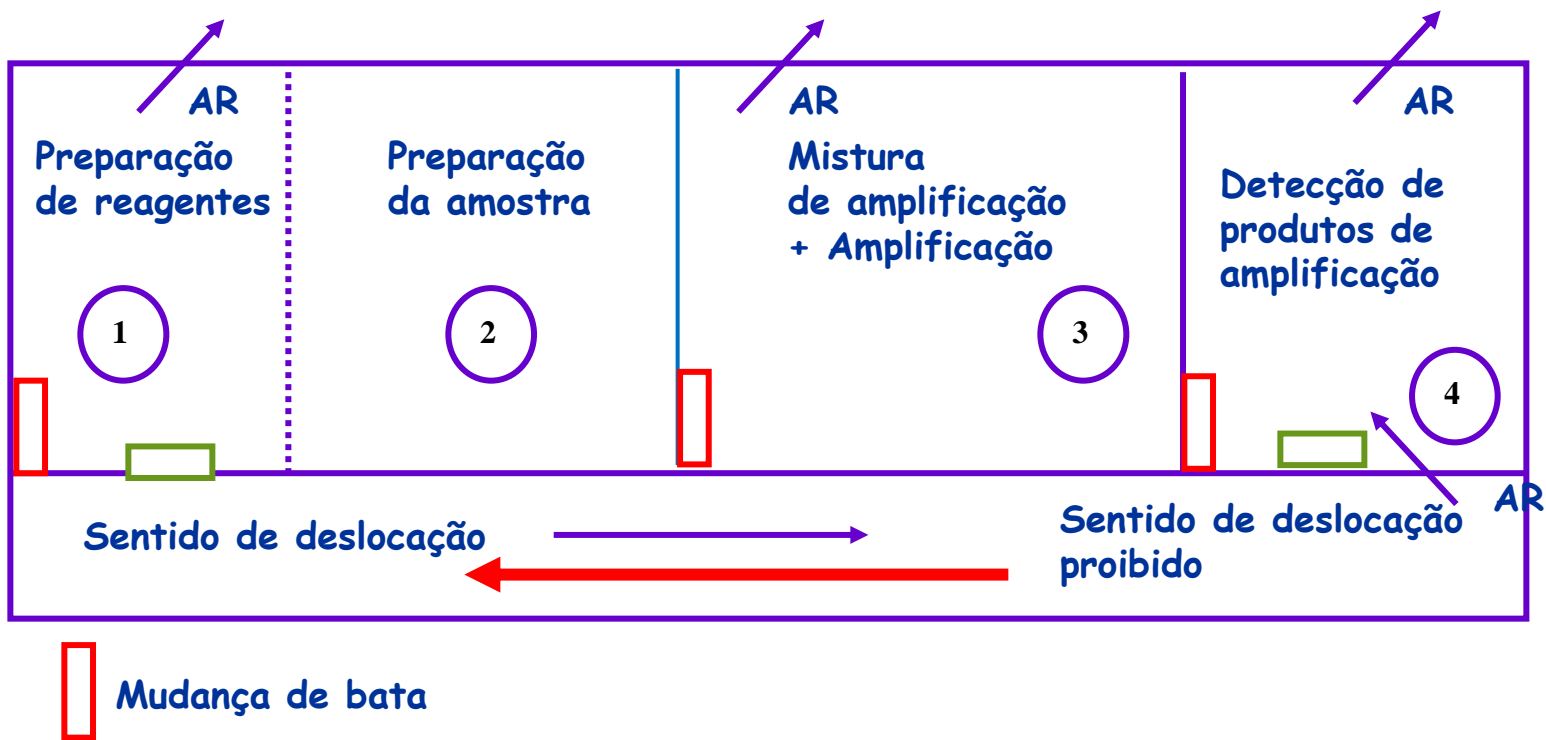


**simplificação da estrutura do laboratório**

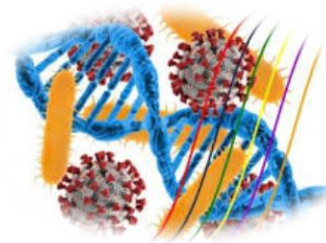
# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: o laboratório



- Laboratório simplificado



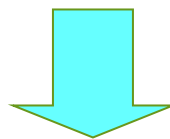
# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: o laboratório



- Sistemas fechados

**PCR em Tempo Real**

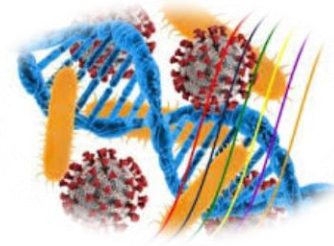
**Sistemas fechados**



**simplificação da estrutura do laboratório**



# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: o laboratório

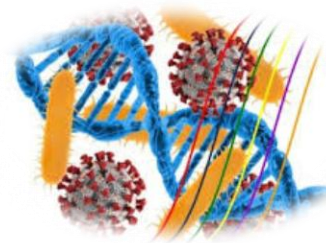


- Área de trabalho (métodos moleculares)

Espaço limitado fechado contendo:

- jogo completo de pipetas
- pontas com filtro
- suportes exclusivos (cor diferente para cada área)
- recipiente para desperdícios
- tubos
- microcentrífuga

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: o laboratório

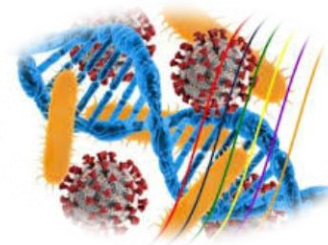


- Área de trabalho (métodos moleculares)

## Regras

- o equipamento é exclusivo e permanente
- o material é exclusivo
- circulação interdita entre áreas de trabalho

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: o laboratório

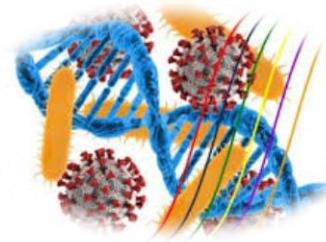


- Área de trabalho (métodos moleculares)

Equipamento base para todas as áreas

- frigorífico
- congelador
- centrífuga de bancada
- vortex

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: o laboratório

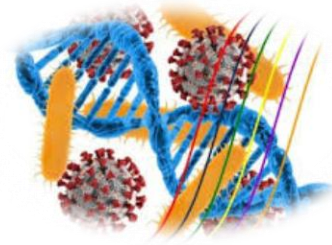


- Área de trabalho (métodos moleculares)

Equipamento específico de cada área

Extração	Preparação mistura reacional	Adição de ADN/ARN	Amplificação	Deteção
Termoblocos	Câmara de fluxo laminar com UV	Câmara com UV	Termocicladores	Balança; micro-ondas
Câmara de segurança biológica classe II				Fontes e tinas de eletroforese
Centrífugas adaptadas ao tipo de amostra				Sistemas de visualização

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: o laboratório

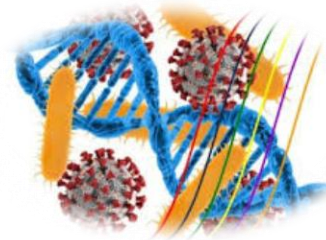


- Área de trabalho (métodos moleculares)

## Consumíveis

- Exclusivos a cada área de trabalho
- RNase/DNase free
- Estéreis

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: o laboratório

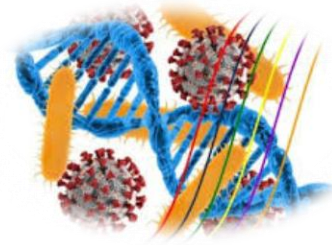


- Manutenção e precauções (métodos moleculares)

## Eliminação do DNA/RNA contaminante

- UV ( áreas/salas)
- lixívia (habitualmente a 5g/L de cloro ativado) + álcool (70%)
- HCl (habitualmente 0,2, mas pode até 1M, eventualmente 2M)
- produtos comercializados (ex: DNAZap)

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: o laboratório

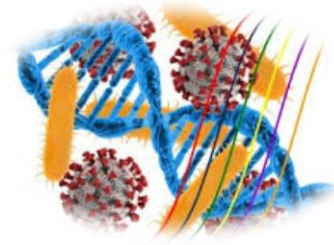


- Manutenção e precauções (métodos moleculares)

## Eliminação dos riscos

- uso sistemático de material estéril de preferência utilizar material descartável
- uso sistemático de luvas
- mudança de bata entre áreas
- cada bancada com o seu recipiente para lixo
- limpeza sistemática das áreas de trabalho
- atenção ao papel das zonas potencialmente contaminadas

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: o laboratório

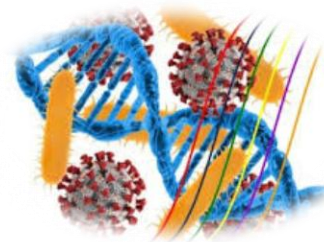


- Manutenção e precauções (métodos moleculares)

## Pessoal exterior ao laboratório

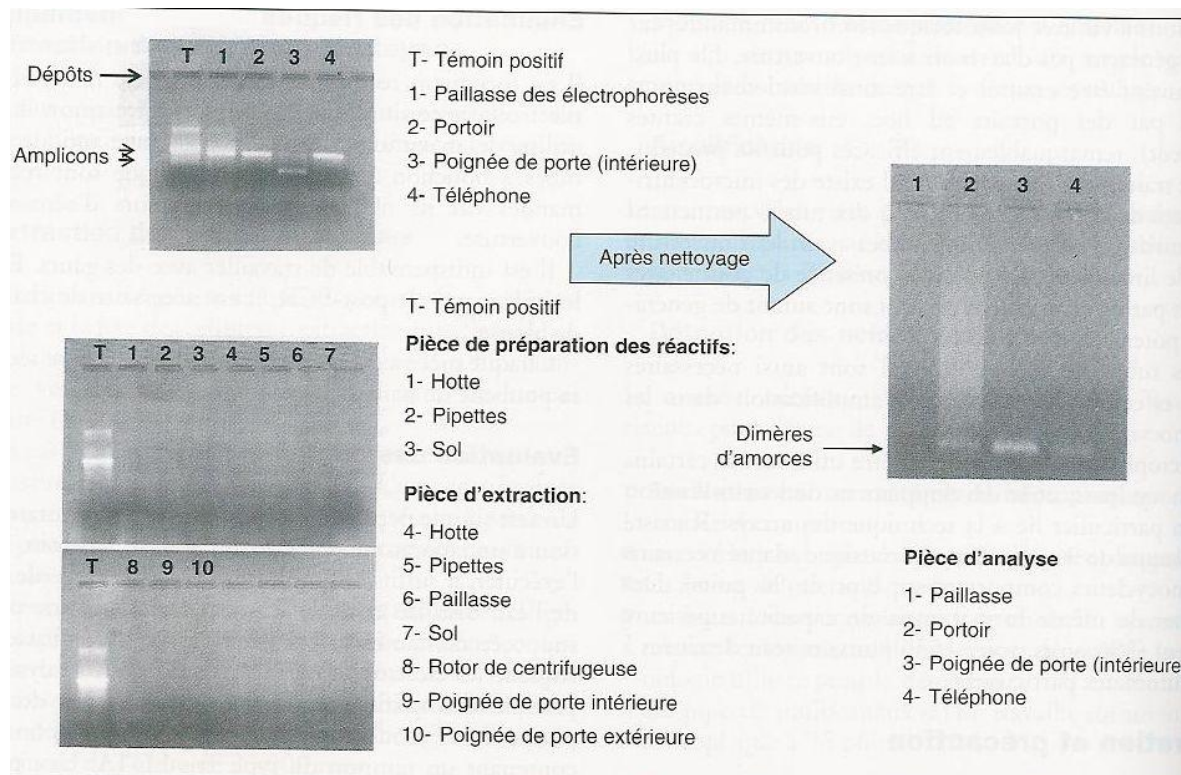
- reparação de um equipamento
- pessoal auxiliar
- limpeza das diferentes áreas em dias diferentes
- atenção aos lixos

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: o laboratório

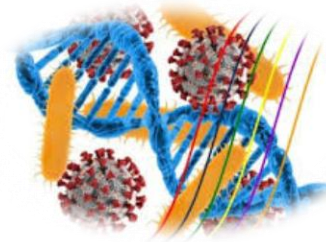


- Manutenção e precauções (métodos moleculares)

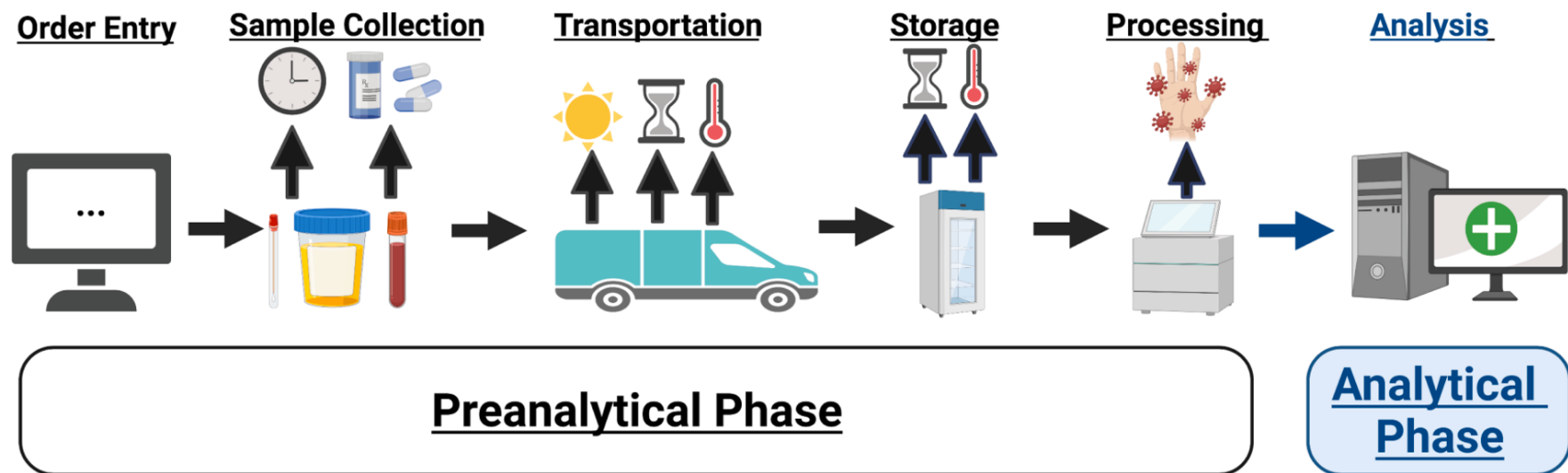
## Avaliação das contaminações (teste de Wipe)



# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: interferências

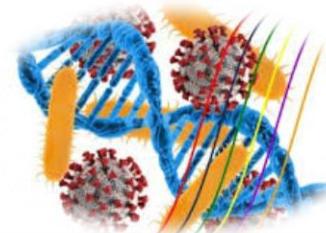


- Variáveis que interferem com os métodos moleculares



Conrad S. et al. Clin. Bioch. 2022, 115 22-32

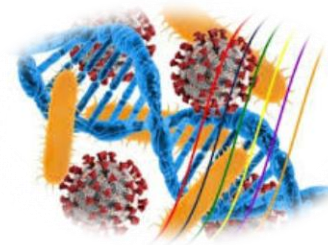
# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: interferências



- Variáveis

Variável	Efeito	Exemplos	Minimização
Recipientes de colheita (tipo, qualidade e aditivos)	Risco de resultados falsamente negativos	Heparina	Estudos de validação
Contaminação da amostra	Risco de resultados falsamente positivos	Ausência de troca de luvas	Fluxos de trabalho & medidas de controlo
Inibidores exógenos e endógenos	Risco de resultados falsamente negativos; constituem um problema em métodos de análise diretos	Endógenos: IgG, hemoglobina, metabolitos do heme, latoferrina, ... Exógenos: proteases, nucleases	Métodos de extração adaptados; colheita da amostra correta
Tempo, temperatura, ciclos de congelação, humidade, exposição à luz	Risco de resultados falsamente negativos	Descongelação das amostras durante o transporte; amostras sujeitas a altas temperaturas; Amostras secas sujeitas a humidade elevada, exposição aos UV	Estudos de validação; garantir as condições necessárias de transporte e armazenamento
Momento da colheita	Risco de resultados falsamente negativos	Testar na fase inicial ou fase final em que a quantidade de material genético é reduzida	Ter em conta: período de incubação, de latência do mo; o desempenho do teste nos períodos críticos; considerar amostra que possua maior quantidade de mo
Tratamento com antimicrobianos	Risco de resultados falsamente negativos	Tratamento a decorrer; tratamento recente	Análise exaustiva do histórico do doente. Combinação de exames
Procedimentos como Diálise	Risco de resultados falsamente negativos	Pesquisa de HCV após diálise	Análise exaustiva do histórico do doente. Combinação de exames

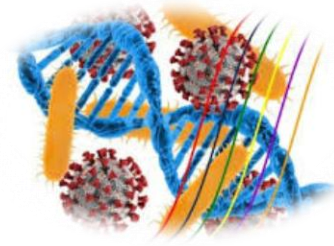
# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: interferências



- Requisição

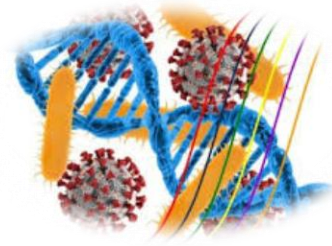
- ✓ Qual o teste
  - ✓ Qual a amostra
  - ✓ Qual o momento da colheita
- ✓ Para obter a resposta à questão clínica em causa.

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: interferências



- O doente
  - ✓ Dados demográficos do doente
  - ✓ Probabilidade/risco de infeção

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: processamento

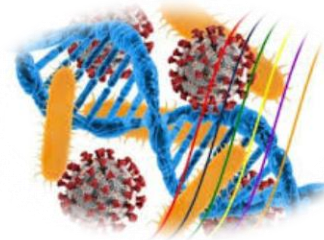


- Amostra

## Preparação da amostra (colheita):

- Recipiente estéril
- Volume/quantidade de amostra (ex: tecidos o ideal entre 1 a 2 g)
- Data e hora da colheita
- Acondicionamento de acordo com a amostra e protocolo (especial atenção para o ARN)
- Sempre que se trata de vírus ARN enviar sempre que possível em meio de transporte adaptado (sem inativadores) ou então congelar

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: processamento

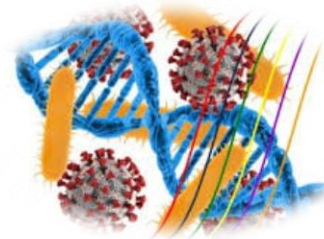


- Amostra
- Preparação da amostra (transporte):

COLLECTION AND TRANSPORT										
DNA						RNA				
Specimen Type	Special Considerations	RT	2-8 °C	-20 °C	-70 °C	Special Considerations	RT	2-8 °C	-20 °C	-70 °C
WB	1, 2					1, 2, 3, 4				
Serum	3			x	x	3, 5			x	x
Plasma	2		x			3, 4, 6		x		
BAL	1, 4					1, 7				
BMA	2, 5					2, 3, 4, 8, 9				
Buccal cells (saliva and mouthwash)		Mouthwash, swabs				2	Saliva			
Buffy coat	6					2, 3	In stabilizing solution until isolation			
CSF	7		x			3, 5, 8				
FNA						1, 3, 8, 10				
Tissue	7, 8, 9		No longer than 24 hours			2, 5 (if snap frozen), 11, 12				
Oral fluid						2, 7		x		
Semen	8		x (until extraction)							
Sputum	10	x (if transported immediately)	If more than 30-minute delay							
Stool	1					1				
Swabs (cervical and urethral)	1		Up to 10 days			1				
Urine	1					1				

MM13 - CLSI

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: processamento



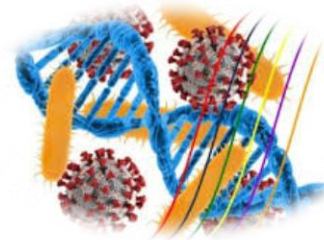
- Amostra  
Preparação da amostra  
(conservação):

**Atenção aos congeladores “frost free” – nunca utilizar**

STORAGE – Do not store samples in a “frost-free” freezer.										
Specimen Type	Special Considerations	DNA				RNA				
		RT	2–8 °C	–20 °C	–70 °C	Special Considerations	RT	2–8 °C	–20 °C	–70 °C
WB		Up to 24 hours	Up to 72 hours			1			x	x
Serum									x	x
Plasma				x				Up to five days	>5 days	>5 days
BAL	1		Up to 72 hours		x			Up to 72 hours		x
BMA	2		Temporarily prior to processing	Several months		2			x	
Buccal cells (saliva and mouthwash)		Mouthwash up to one week								
Buffy coat	3				x					
CSF	2, 4			x (if not processed immediately for virus testing)	x (if not processed immediately for virus testing)	2			x	x
FNA	2		Same as BMA	Same as BMA		2				Two to four weeks
Tissue	2, 5		No more than 24 hours to process	At least two weeks	At least two years (recommended temperature)	3				At least two years (preferred temperature)
Oral fluid		Up to one week								
Semen			x (until extraction)							
Sputum					At least one year					
Stool										
Swabs (cervical and urethral)			Up to 10 days							
Urine			Once processed							

MM13 - CLSI

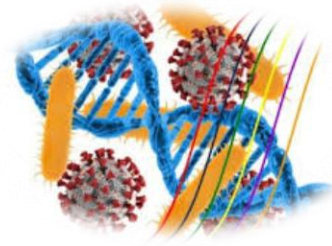
# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: processamento



- Amostra (variáveis interferentes)

Tipo de amostra	Tipo de mo comumente detetados	Considerações pré-analíticas importantes	Orientações
Sangue total	Virus (HIV, HCV, CMV, ...)	Tempo, temperatura, tubo de colheita, aditivos	Conservação: TA, 24h (ADN); 2-8°C, 72h (ADN); 2-8°C, 4h (ARN); Aditivo: EDTA
Plasma	Virus (HIV, CMV, BKV.....)	Tempo, temperatura, tubo de colheita, aditivos	Conservação: 2-8°C, 5 dias; ideal: -20 ou -80°C, a longo prazo; evitar ciclos de descongelação; Aditivo: EDTA
DBS	Virus (HCV, HIV, CMV...)	Tempo, temperatura, humidade, exposição à luz	Se bem seco: 3-12 meses em condições de armazenamento adequadas
Lavado broncoalveolar	Fungos, bacterias, vírus ( <i>M. tuberculosis</i> , <i>P. jirovecii</i> , ....)	Tempo e temperatura	Transporte: refrigerado; Conservação: 4°C, 72h; -20 ou -80°C, a longo prazo;
Exsudado nasofaríngeo	Virus (respiratórios)	Tempo, temperatura, composição do MTV	Conservação: MTV 2-8°C , até 4 dias, dependendo do vírus
LCR	Fungos, bacterias, vírus ( <i>Cryptococcus neoformans</i> ; <i>Neisseria meningitidis</i> ; <i>Herpes simplex vírus</i> ...)	Tempo, transporte, e temperatura de conservação	Transporte: em gelo (ARN), 2-8°C (ADN)
Fezes	Virus, bacterias, parasitas	Tempo, transporte, e temperatura de conservação, meio de estabilização	Transporte: TA se estabilizadas; em gelo

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: processamento

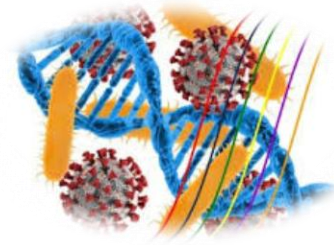


- Amostra

## Preparação da amostra (objectivos):

- Tornar o DNA/RNA acessível e compatível com o método analítico
- Obter a concentração de DNA/RNA necessária para assegurar a sensibilidade do método analítico
- Eliminar os inibidores das enzimas ou outras substâncias interferentes
- Eliminar as nucleases

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: processamento

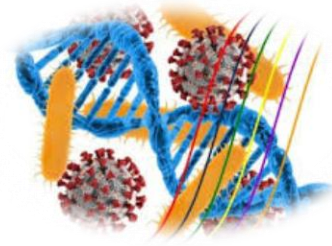


- Amostra

Preparação da amostra (envolve):

- Rutura das membranas celulares
- Lise da célula ou do microrganismo que contém o DNA/RNA
- Desnaturação dos complexos nucleoproteicos para libertar o DNA/RNA
- Inativação das nucleases endógenas
- Eliminação das proteínas e de certas categorias de ácidos nucleicos se necessário
- Purificação do DNA/RNA

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: processamento

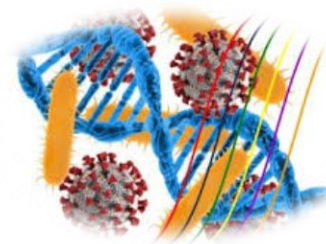


- Amostra

## Preparação da amostra (extração de AND/ARN):

- Natureza da amostra
  - *Mycoplasma* versus *Mycobacterium*
- Natureza do material genético
  - Cadeia simples, cadeia dupla, nuclear, mitocondrial, plasmídeo
- Natureza da fonte da amostra
  - eucariotas, procariotas, vírus .....
- Critérios qualitativos e quantitativos
  - qualidade do extraído, quantidade de ADN/ARN desejada, rendimento, grau de pureza, rapidez de extração

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: processamento

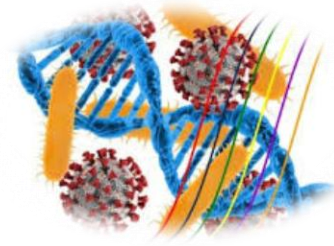


- Amostra

Qualidade da amostra (extração de AND/ARN):

Fonte de ADN/ARN	Quantidade	ADN obtido
Sangue total EDTA	300 $\mu$ L	5-10 $\mu$ g (ARN: 0,3-1,7 $\mu$ g)
Sangue total Heparina	300 $\mu$ L	7 $\mu$ g
Sangue total EDTA após 3 ciclos de congelação/descongelação)	300 $\mu$ L	3 $\mu$ g
Tecido	50 mg	1-10 $\mu$ g
Raíz de cabelo	-	10-200 ng

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: processamento

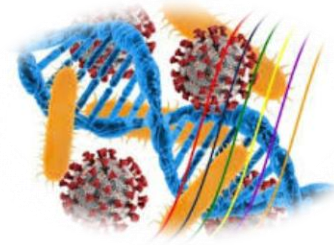


- Amostra

Problemas na extração de ADN/ARN (falsos negativos):

- Ineficácia da extração
- Perda de ADN/ARN
- Não remoção dos inibidores (endógenos e exógenos)
- Ausência de ADN/ARN no fragmento/porção extraída

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: processamento

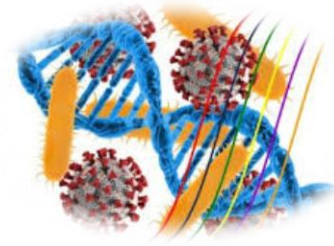


- Amostra

Problemas na extração de AND/ARN (falsos positivos):

- Contaminação cruzada (entre amostras)
- Carry-over (localmente ou a nível dos fabricantes)

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: processamento

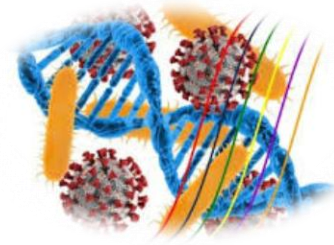


- Amostra

## Problemas na extração de AND/ARN (como minimizar):

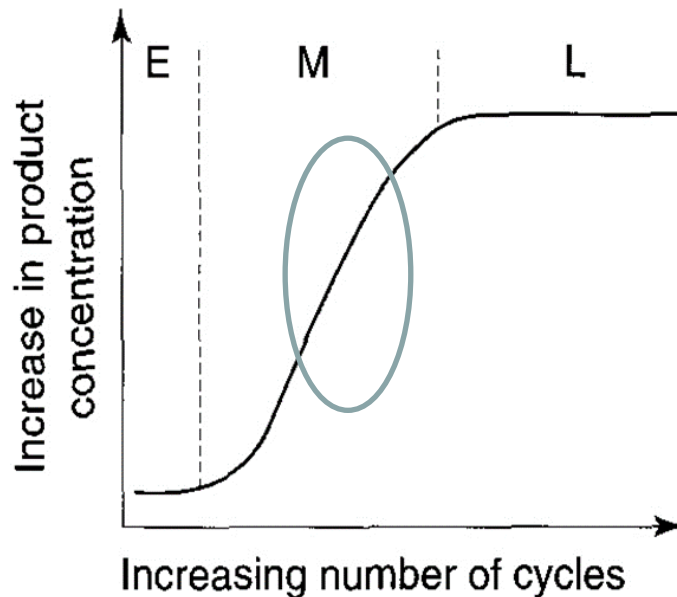
- Boas práticas laboratoriais – marcha em frente
  - Mudança de batas; Mudança frequente de luvas; Desinfecção da área de trabalho
- Áreas distintas para manuseamento de amostras e reagentes
- Controlo positivo de extração (durante extração)
  - Preferência controlo endógeno
- Sensibilidade da extração

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: processamento



- Amplificação

A reação de amplificação:



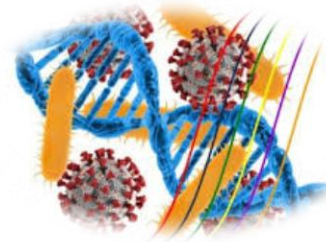
E – fase inicial

M – acumulação exponencial de produto  $2^n$

**$2^{35} \Rightarrow 34$  bilhões de cópias**

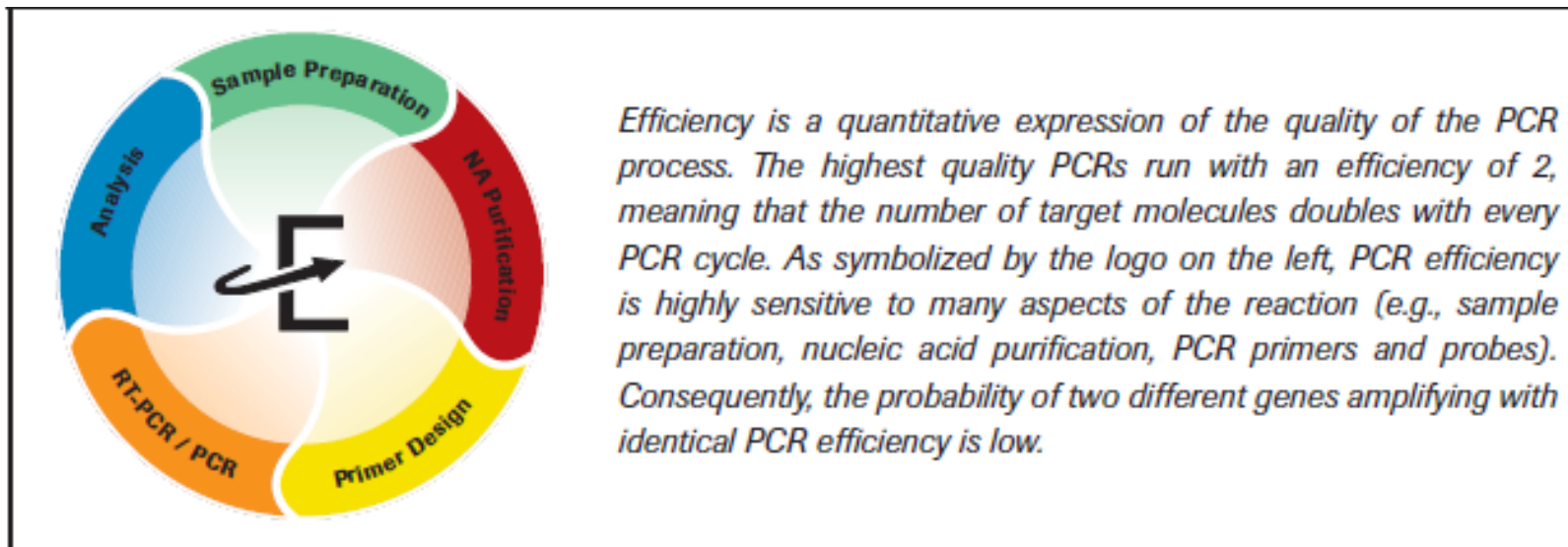
L – fase *plateau*

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: processamento



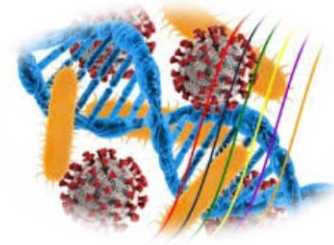
- Amplificação

Eficiência:



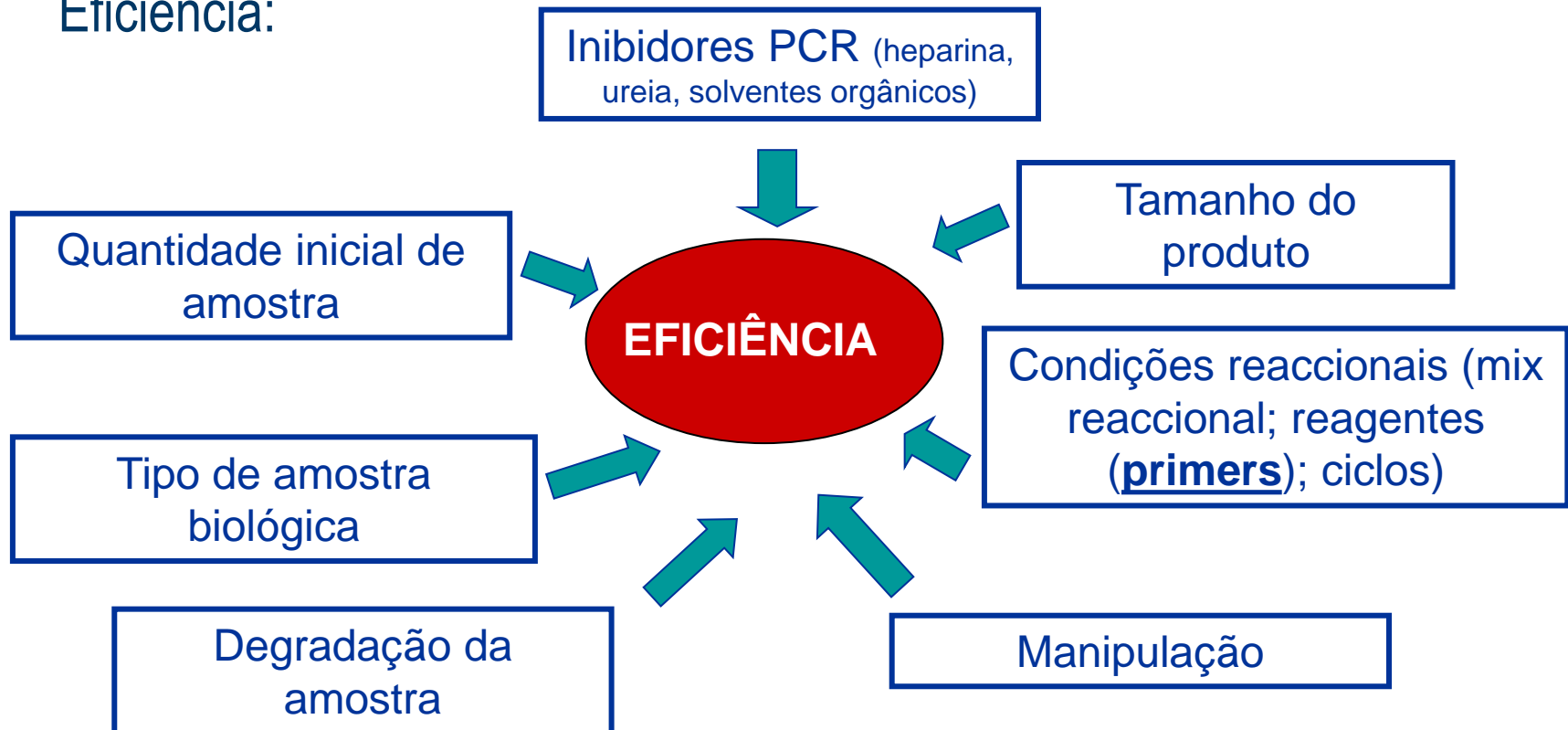
*Efficiency is a quantitative expression of the quality of the PCR process. The highest quality PCRs run with an efficiency of 2, meaning that the number of target molecules doubles with every PCR cycle. As symbolized by the logo on the left, PCR efficiency is highly sensitive to many aspects of the reaction (e.g., sample preparation, nucleic acid purification, PCR primers and probes). Consequently, the probability of two different genes amplifying with identical PCR efficiency is low.*

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: processamento

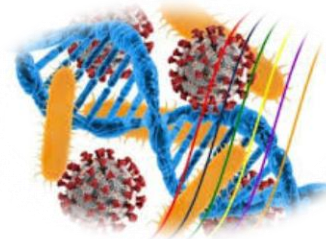


- Amplificação

Eficiência:



# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: processamento

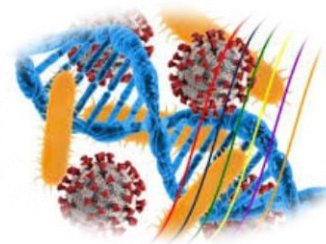


- Amplificação

Eficiência:

CICLO	Quantidade DNA 100% EFICIÊNCIA	Quantidade DNA 90% EFICIÊNCIA	Quantidade DNA 80% EFICIÊNCIA	Quantidade DNA 70% EFICIÊNCIA
0	1	1	1	1
1	2	2	2	2
2	4	4	3	3
3	8	7	6	5
4	16	13	10	8
5	32	25	19	14
6	64	47	34	24
7	128	89	61	41
8	256	170	110	70
9	512	323	198	119
10	1024	613	357	202
11	2048	1165	643	343
12	4096	2213	1157	583
13	8192	4205	2082	990
14	16384	7990	3748	1684
15	32768	15181	6747	2862
16	65536	28844	12144	4866
17	131072	54804	21859	8272
18	262144	104127	39346	14063
19	524288	197842	70824	23907
20	1048576	375900	127482	40642
21	2097152	714209	229468	69092
22	4194304	1356998	413043	117456
23	8388608	2578296	743477	199676
24	16777216	4898763	1338259	339449
25	33554432	9307650	2408866	577063
26	67108864	17684534	4335959	981007
27	134217728	33600615	7804726	1667711
28	268435456	63841168	14048506	2835109
29	536870912	121298220	25287311	4819686
30	1073741824	230466618	45517160	8193466

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: processamento



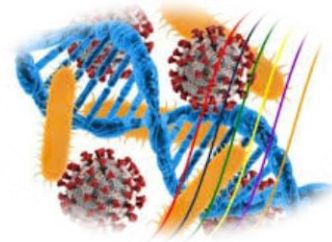
- Amplificação

Pontos críticos:

1. Preparação de reagentes
2. Condições de reação
3. Termocicladores



# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: processamento



- Amplificação (Problemas):

Contaminações → resultados falsos positivos

Principal fonte de contaminação: produtos de amplificação precedentes  
(formação de micro-aerossóis)

Presença de inibidores → resultados falsos negativos

Principais fontes de inibidores:

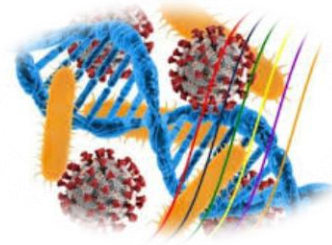
- natureza do material biológico (Ex: polissacáridos complexos nas fezes, porfirina dos glóbulos vermelhos)
- métodos e reagentes utilizados na extracção dos ácidos nucleicos (Ex: heparina como anti-coagulante do sangue, SDS, fenol, clorofórmio)

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: processamento



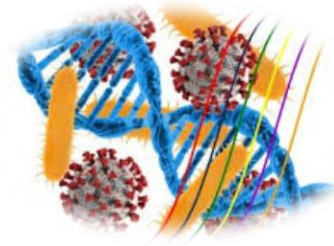
- Amplificação (Soluções práticas):
  - Extração cuidadosa do ADN/ARN;
  - Utilização de um controlo negativo;
  - Utilização de controlos positivos:
    - controlo positivo externo (controlo da reação de amplificação)
    - controlo interno (amplificado pelo mesmo par de iniciadores que ADN/ARN alvo; amplificado na mesma reação; reação de amplificação suplementar)
    - calibrador (detetar limite de sensibilidade)

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: processamento



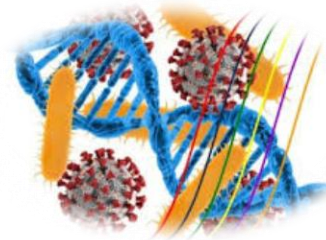
- Amplificação (Soluções práticas):
  - Utilização de sistemas de descontaminação:
    - Uracil N-glicosilase (UNG)
    - Radiação UV
  - Armazenamento dos reagentes de PCR em alíquotas;
  - Utilização de micropipetas exclusivamente para a PCR;
  - Utilização de pontas com filtro e material estéril;
  - Separação física entre as etapas de pré e pós-amplificação.

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: processamento



- Validação:
  - Sensibilidade (analítica/clinica)
  - Limiar de deteção do teste
  - Especificidade (analítica/clinica)
  - Repetibilidade
  - Reprodutibilidade (intra e inter laboratorial)
  - Linearidade do teste (essencial nos métodos quantitativos)

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: processamento



- Validação:

## Resultado de acordo com o “Gold standard”

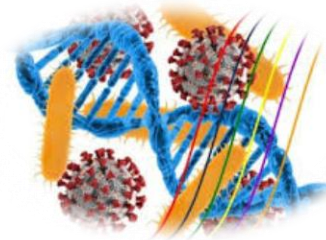
		Tem a condição	Não tem a condição	
Resultado do teste a avaliar	Positivo	a Verdadeiro positivo	b Falso positivo	← Entrada para determinar o <b>VPP</b>
	Negativo	c Falso negativo	d Verdadeiro negativo	← Entrada para determinar o <b>VPN</b>

Entrada para determinar **sensibilidade**

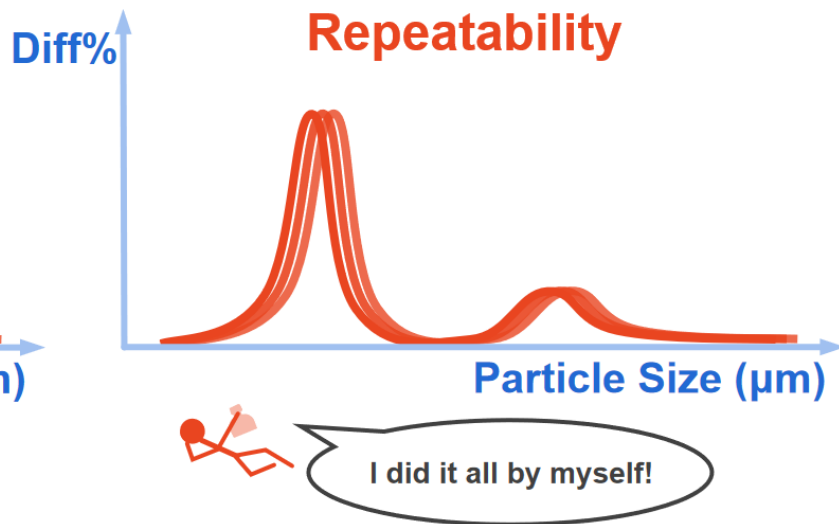
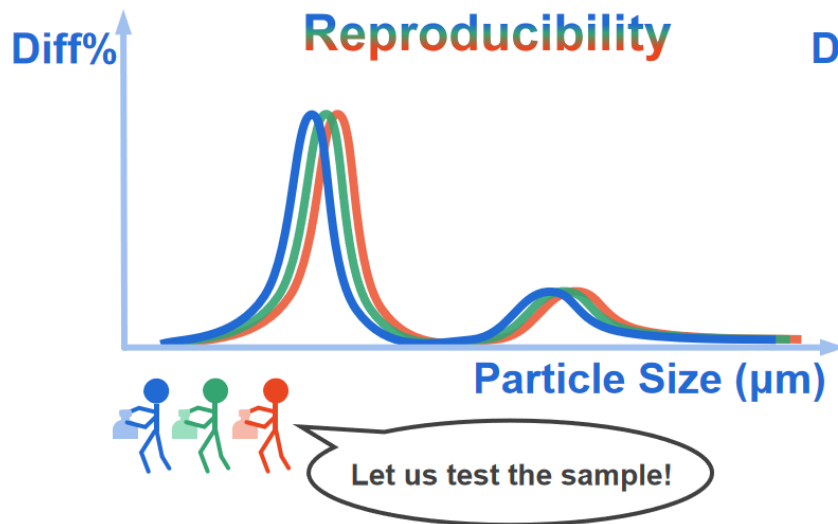
Entrada para determinar **especificidade**

- Sensibilidade= $[a/(a+c)] \times 100$
- Especificidade= $[d/(b+d)] \times 100$
- Valor preditivo positivo(VPP)= $[a/(a+b)] \times 100$
- Valor preditivo negativo(VPN)= $[d/(c+d)] \times 100$

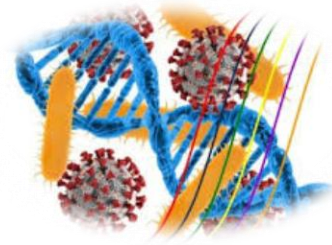
# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: processamento



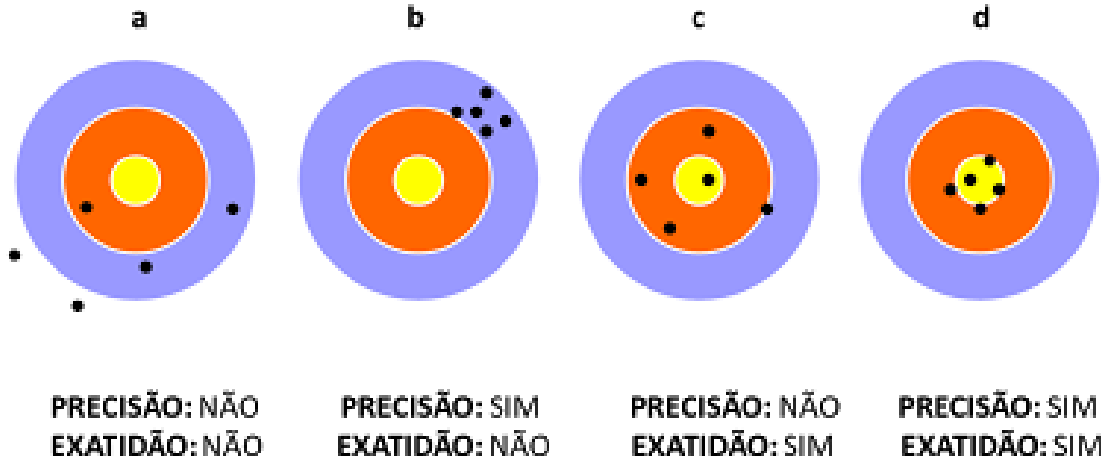
- Validação:



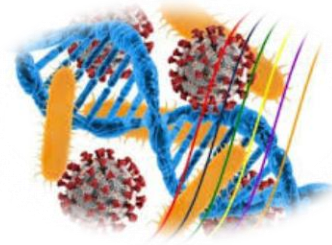
# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: processamento



- Validação:

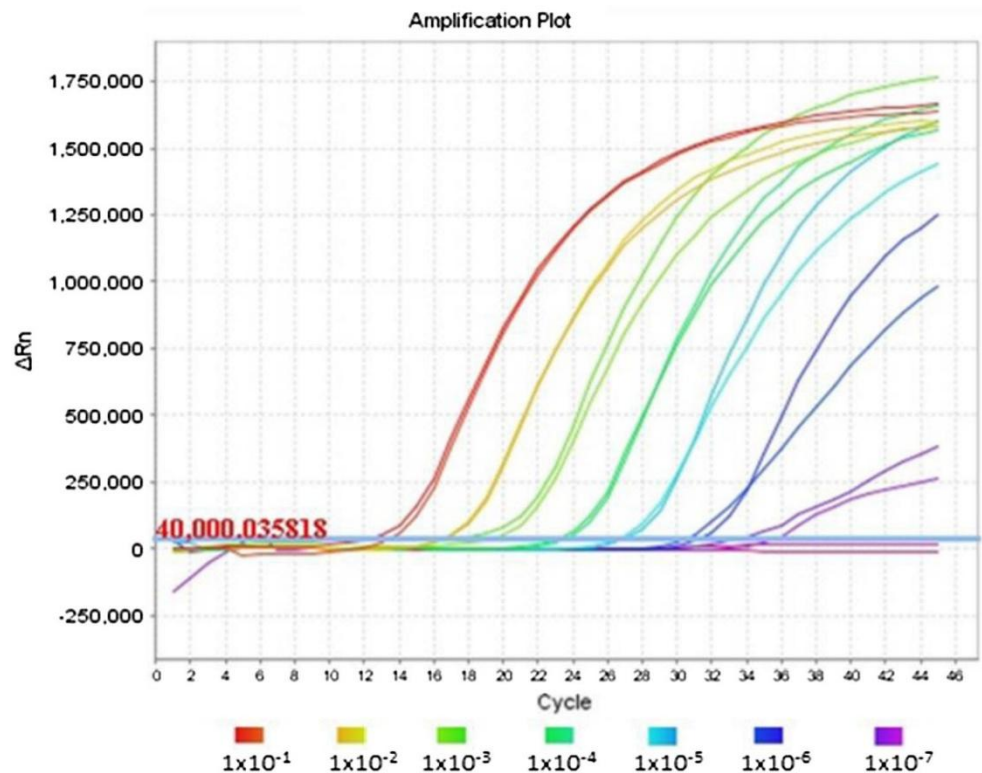


# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: processamento

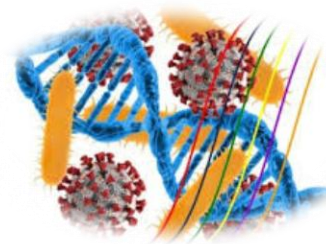


- Validação:

- Limiar de deteção do teste

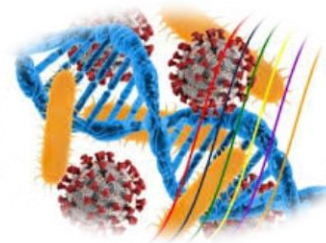


# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: processamento



- Validação:
  - Limite de deteção do teste (100 cópias/mL, 200 cópias/mL.....)
  - Linearidade do teste
  - Abaixo do limite de deteção e/ou sem amplificação
    - » *Não detetável*
- **Definição de cut-off**

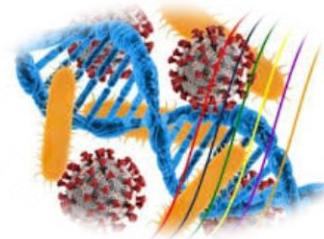
# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: processamento



- Validação:
- Correlação clínica

*Resultados devem ser sempre interpretados no contexto clínico do doente pois os testes moleculares podem detetar ácidos nucleicos mesmo quando o microrganismo já não é infeccioso*

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: Fontes de erro



- **Triagem**

## Material (amostra)

- ✓ Incorretamente identificada
- ✓ Não inscrita
- ✓ Não exportada
- ✓ Análises não sinalizadas
- ✓ Etiquetagem incorreta

## Meio ambiente

- ✓ Falha no LIS/Sistema
- ✓ Falha de energia
- ✓ Falha de rede

## Método

- ✓ Ausência de circuitos definidos
- ✓ Ausência de locais delimitados e adequados
- ✓ Treino inexistente ou insuficiente

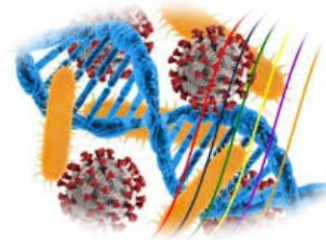
## Humano

- ✓ Execução incorreta
- ✓ Não efetuada
- ✓ Integração incorreta/não efetuada
- ✓ Desconhecimento das prioridades e do tipo de amostra

## Equipamento

- ✓ Equipamento (ex. PC, impressora, etc) não funcional ou com falhas
- ✓ Material de laboratório insuficiente (ex. suporte para tubos)

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: Fontes de erro



## • Extração

### Material (amostra)

- ✓ Presença de inativador
- ✓ Má qualidade/degradação
- ✓ Difícil manipulação
- ✓ Tempo de resposta excedido
- ✓ Volume insuficiente
- ✓ Preservação inadequada

### Meio ambiente

- ✓ Contaminação
- ✓ Zona não específica para extração de ADN/ARN
- ✓ Falha de energia

### Método

- ✓ Ausência de circuitos e locais definidos
- ✓ Ausência de locais delimitados
- ✓ Treino inexistente ou não adequado

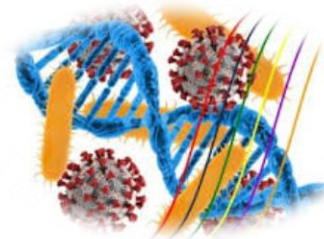
### Humano

- ✓ Troca amostras
- ✓ Reagentes incorretamente preparados
- ✓ Ausência controlo interno
- ✓ Contaminação de amostras e do meio ambiente
- ✓ Procedimento não seguido

### Equipamento

- ✓ Micropipetas contaminadas
- ✓ Micropipetas descalibradas
- ✓ Extrator em mau funcionamento ou contaminado
- ✓ CSB inoperante

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: Fontes de erro



## • Amplificação

### Material (ADN/ARN)

- ✓ Volume insuficiente de eluído
- ✓ Presença de bolhas
- ✓ Presença de inibidores
- ✓ Má qualidade / degradação

### Meio ambiente

- ✓ Falha de energia
- ✓ Contaminação
- ✓ Preparação de reagentes e amplificação no mesmo local

### Método

- ✓ Organização deficiente
- ✓ Kit de amplificação inadequado
- ✓ Treino inexistente ou não adequado

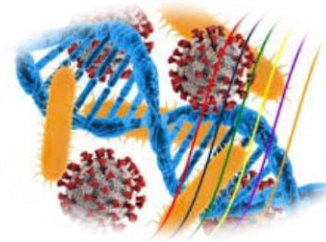
### Humano

- ✓ Contaminação (amostras, equipamento, ambiente)
- ✓ Preparação incorreta dos reagentes
- ✓ Ausência de controlos
- ✓ Ausência de homogeneização
- ✓ Troca de amostras
- ✓ Selecção do programa de RT-PCR
- ✓ Procedimento não seguido

### Equipamento

- ✓ Micropipetas não calibradas
- ✓ Programa de RT-PCR mal programado
- ✓ Termocicladores comprometidos
- ✓ Sistema de refrigeração/congelação comprometido
- ✓ Equipamentos contaminados com ADN/ARN

# Diagnóstico molecular das doenças infecciosas: Fontes de erro



## • Resultados

### Material (ADN/ARN)

- ✓ Amostra com erro em LIS ou manual

### Meio ambiente

- ✓ Falha de energia
- ✓ Falha de rede

### Método

- ✓ Treino inexistente ou inadequado

### Humano

- ✓ Interpretação de curvas e/ou valores Ct
- ✓ Interpretação dos controlos
- ✓ Introdução manual
- ✓ Análise do parâmetro errado
- ✓ Situação de repetição/confirmação não assinalada ou não detetada

### Equipamento

- ✓ Falha de transmissão
- ✓ Transmissão incorreta
- ✓ Falha de LIS
- ✓ Mau funcionamento do PC