

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

STHÉFANI DA CUNHA

**BOAS PRÁTICAS E GARANTIA DA QUALIDADE EM LABORATÓRIO DE
BIOLOGIA MOLECULAR: REVISÃO DA LITERATURA**

DOIS VIZINHOS

2023

STHÉFANI DA CUNHA

**BOAS PRÁTICAS E GARANTIA DA QUALIDADE EM LABORATÓRIO DE
BIOLOGIA MOLECULAR: REVISÃO DA LITERATURA**

**Good practices and quality assurance in molecular biology laboratory:
literature review**

Trabalho de conclusão de curso de Especialização apresentado como requisito para obtenção do título de Especialização em Biologia Molecular – Habilitação Bioinformática da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Flavia Regina Oliveira de Barros

DOIS VIZINHOS

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

STHÉFANI DA CUNHA

**BOAS PRÁTICAS E GARANTIA DA QUALIDADE EM LABORATÓRIO DE
BIOLOGIA MOLECULAR: REVISÃO DA LITERATURA**

Trabalho de conclusão de curso de Especialização apresentado como requisito para obtenção do título de Especialização em Biologia Molecular – Habilitação Bioinformática da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Flavia Regina Oliveira de Barros

Data de aprovação: 16/02/2023

Flavia Regina Oliveira de Barros
Doutora em reprodução animal
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) *Campus Dois Vizinhos*

Naiana Cristine Gabiatti
Doutora engenharia química ênfase em processos biotecnológicos
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) *Campus Dois Vizinhos*

Nédia de Castilhos Ghisi
Doutora em ciências ambientais
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) *Campus Dois Vizinhos*

DOIS VIZINHOS

2023

RESUMO

Os ensaios por biologia molecular são essenciais para um diagnóstico preciso e muito utilizado no acompanhamento de doenças, sendo uma das principais áreas em um laboratório clínico. Atualmente não existe consenso sobre como realizar e garantir a qualidade em um laboratório de biologia molecular. Assim, o objetivo do presente trabalho foi descrever métodos que visam a garantia da qualidade em laboratórios de biologia molecular já estudados, através de uma revisão da literatura. Como resultados foram apresentadas diversas recomendações, como o fluxo de trabalho ideal para evitar contaminações de ambiente, controles analíticos para melhorar a confiabilidade dos resultados, procedimentos utilizados para padronização e otimização de novos ensaios moleculares. Concluímos que a crescente procura por ensaios nesta área do diagnóstico clínico demanda de mais estudos para as padronizações nos laboratórios de biologia molecular para assim oferecer resultados ainda mais confiáveis e de qualidade.

Palavras-chave: garantia de qualidade; boas práticas em laboratórios.

ABSTRACT

Molecular biology assays are essential for accurate diagnosis and are widely used in disease monitoring, and are one of the key areas in a clinical laboratory. Currently there is no consensus on how to perform and ensure quality in a molecular biology laboratory. Thus, the objective of the present work was to describe methods for quality assurance in molecular biology laboratories that have been studied, through a systematic review of the literature. As results were presented several recommendations, such as the ideal workflow to avoid environmental contamination, analytical controls to improve the reliability of results, procedures used for standardization and optimization of new molecular assays. We conclude that the increasing demand for assays in this area of clinical diagnosis demands more studies for standardization in molecular biology laboratories to provide even more reliable and quality results.

Keywords: quality assurance; good practices in laboratories.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferença de sensibilidade analítica.....	19
---	-----------

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Fluxo de trabalho laboratório de biologia molecular.....	17
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Objetivos.....	13
1.1.1	Objetivo geral.....	13
1.1.2	Objetivos específicos.....	14
2.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
2.2	Fluxo de trabalho.....	16
2.3	Validação e verificação de métodos.....	18
2.4	Controle de qualidade.....	19
2.4.1	Controle de qualidade analítico.....	19
2.4.2	Controle de qualidade de ácidos nucleicos	20
2.5	Ensaio de proficiência.....	20
2.6	Normas regulamentadoras	22
3	CONCLUSÃO	23
	REFERÊNCIAS.....	24

1 INTRODUÇÃO

Os ensaios por biologia molecular são essenciais para um diagnóstico preciso e muito utilizado no acompanhamento de doenças, sendo uma das principais áreas em um laboratório clínico (ELLISON *et al.*, 2006). O desenvolvimento de metodologia moleculares revolucionou a patologia clínica com objetivos de investigações de anomalias genéticas para fins de diagnóstico, prognóstico ou terapêutico (TEMBUYSER; DEQUEKER, 2015).

A importância destes ensaios para o diagnóstico se dá pela sensibilidade analítica que melhora a especificidade, tornando uma tecnologia ideal e adequada para os laboratórios clínicos (JENSON; GEYER, 1993). Apesar da importância dos ensaios desta área o processo de implantação e validação de equipamentos e métodos analíticos são de alta complexidade se tornando desafiadores para o profissional responsável (A BUSTIN *et al.*, 2009 LIANG *et al.*, 2008).

Vários riscos podem comprometer a qualidade de um ensaio, desde a coleta de amostras até a análise do teste pelo laboratório, a comunicação dos resultados, portanto a garantia da qualidade deve ser avaliada para cada nível do procedimento (TEMBUYSER; DEQUEKER, 2015). Atualmente não existe consenso sobre como realizar e garantir a qualidade em um laboratório de biologia molecular, com relação a validação e verificação de métodos, controles analíticos e boas práticas, o que impede a capacidade de padronização para manter a confiabilidade e integridade dos resultados.

Antes de oferecer qualquer teste de biologia molecular, o laboratório deve estar atento aos requisitos necessários para demonstrar e garantir a qualidade laboratorial.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Apontar métodos que visam a garantia da qualidade em laboratórios de biologia molecular já descritos através de uma revisão de literatura.

1.1.2 Objetivos específicos

Apresentar o fluxo de trabalho e as boas práticas indicadas para um laboratório de biologia molecular.

Demonstrar parâmetros para validação e verificação de métodos já descritos.

Descrever os controles analíticos essenciais da rotina de ensaios moleculares.

Expor os ensaios de proficiência e credenciamentos/acreditações disponíveis no mercado para métodos moleculares.

Descrever as diretrizes de legislações sobre as formas de promover a qualidade em um laboratório de biologia molecular.

1.2 Metodologia

Esta pesquisa se trata de uma revisão de literatura. A busca foi realizada na Base Web of Science (WoS) / Coleção (Clarivate Analytics) através das palavras-chaves: garantia da qualidade; boas práticas, além dos artigos também foram inseridos nesta revisão livros, documentos regulatórios e legislações sobre o tema.

A seleção de artigos foi realizada através de leitura dos resumos de todos os registros encontrados na pesquisa, sendo excluídos os que não estiveram relacionados ao tema, assim como os registros que não tinham o texto completo disponível.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos dezesseis artigos durante a busca, os quais foram publicados entre 1992 e 2021.

2.1 Boas práticas

A boa prática laboratorial não é algo exclusivo do laboratório de biologia molecular e, em geral, as precauções tomadas no laboratório de diagnóstico são relevantes para esta aplicação. No entanto, precauções específicas devem ser acrescentadas, destacando-se principalmente as medidas para evitar contaminações, por se tratar de ensaios muito sensíveis (SHEILS; FINN; O'LEARY, 2003).

Os jalecos devem ser mantidos separados para as diferentes áreas do laboratório (extração, preparo de amostras, manipulação pós-PCR e etc.). As soluções e reagentes devem ser manuseados sempre com luvas. Os reagentes devem, preferencialmente, ser manipulados em ambiente separadamente do preparo de amostras (SHEILS; FINN; O'LEARY, 2003).

As cabines de segurança biológicas e de fluxo laminar, utilizadas durante os procedimentos, bem como as micropipetas, devem ser descontaminadas com ultravioleta após cada uso. Como regra geral, a inclusão de qualquer reagente que minimize o número de etapas de manuseio do operador deve ser incorporada, pensando nisso, muitos fornecedores de insumos de biotecnologia oferecem *master mixes* universais que simplesmente requerem a adição de primers específicos do ensaio (e sondas quando relevante), o que limita o potencial erro do operador, melhora o rendimento da amostra e aumenta a reprodutibilidade de ensaios (SHEILS; FINN; O'LEARY, 2003).

É indicado que nas dependências de um laboratório de biologia molecular se utilize luvas sem pó. O estudo de Lomas, 1992 demonstrou que o pó das luvas de látex inibe de forma não específica cada uma das principais etapas do processo de detecção de PCR, causando resultados falso-negativos (MATIAS, 2021).

Todos os plásticos descartáveis e não descartáveis utilizados durante as técnicas de biologia molecular precisam ter conformidade com alguns critérios (MATIAS, 2021). O uso de tubos de polipropileno estéreis descartáveis é recomendado durante todos os procedimentos. Estes tubos precisam ser livres de

RNases e não requerem pré-tratamento para inativá-las. Se utilizar plásticos não descartáveis os mesmos devem ser cuidadosamente lavados com NaOH 0,1 M e EDTA 1 mM, seguido de água livre de RNases. Há também soluções prontas no mercado com a finalidade de inativar as RNases (MATIAS, 2021).

O DEPC é uma substância capaz de inativar RNases por uma modificação covalente, ele reage com aminas primárias e não pode ser usado diretamente para tratar tampões Tris, já que é altamente instável na presença de Tris e se decompõe em etanol. DEPC 0,1% é um forte, mas não absoluto, inibidor de RNases. É comumente utilizado a uma concentração de 0,1% para inativar RNases em vidros e plásticos e ou criar soluções livres de RNases e água (MATIAS, 2021).

Para armazenamento de RNA ou DNA purificado é utilizado equipamentos a -20°C ou -80°C , sendo que para conservação de RNA por períodos superiores a seis meses é mais indicado a -80°C (MATIAS, 2021).

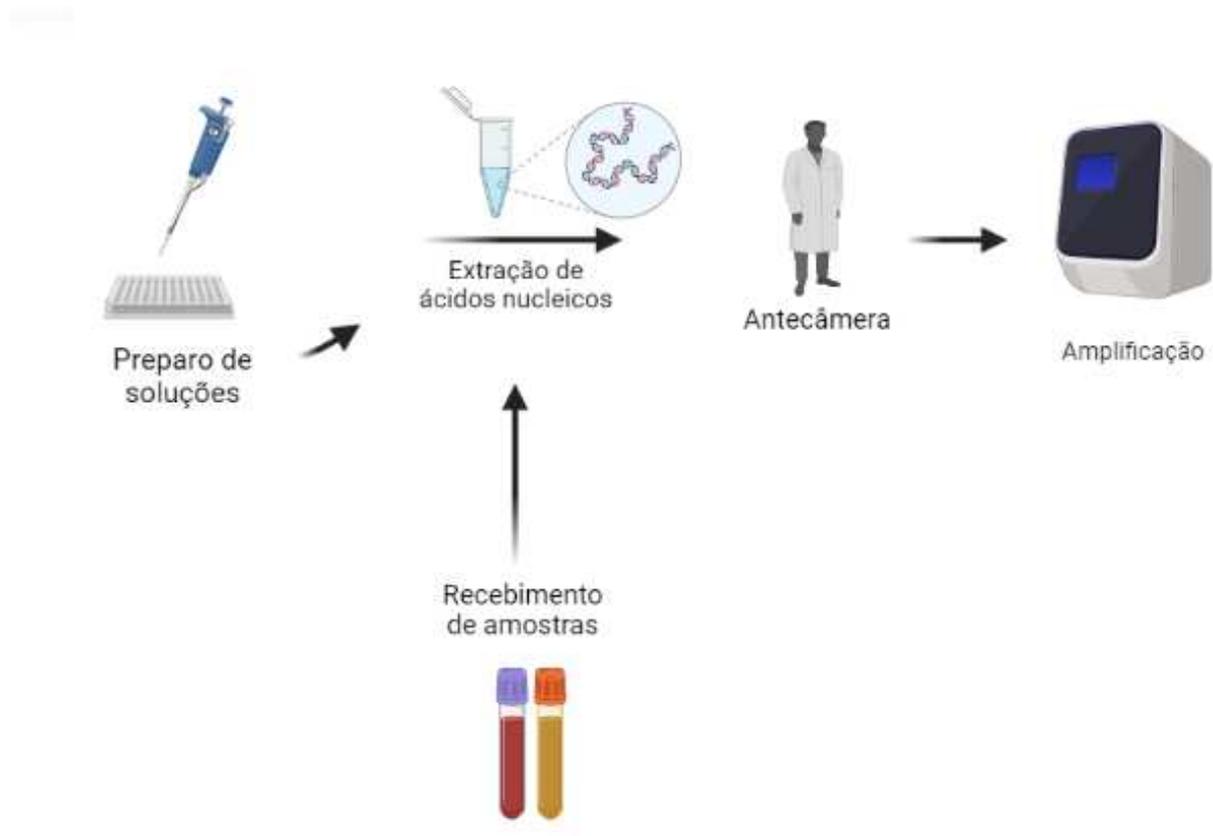
2.2 Fluxo de trabalho

A principal fonte de contaminação em laboratórios que utilizam métodos de ampliações, como a PCR, é o produto dessas ampliações. Isso acontece a partir de microaerossóis gerados durante a pipetagem e manipulação de amostras, e por este motivo o fluxo do laboratório deve ser unidirecional (MATIAS, 2021).

Este fluxo de trabalho deve ser seguido por todo o pessoal do laboratório e também se aplica a materiais, insumos e equipamentos, sendo sempre da área “limpa” (sem a presença de amostras e material amplificado) para a área “suja” (áreas de preparo de amostras e de amplificação).

A figura 1 representa um exemplo de esquema de um fluxo de trabalho de um laboratório de biologia molecular. O preparo de soluções (mix da PCR, soluções de extração, etc) é um ambiente totalmente independente dos demais setores. Além disso podemos observar uma antecâmara, este ambiente serve para que a equipe técnica troque a paramentação (jaleco) antes e após o acesso a sala de amplificação, sendo essa uma exigência descrita na RDC 50 de 21 de fevereiro de 2002, que dispõe sobre o regulamento técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde.

Figura 1 - Fluxo de trabalho laboratório biologia molecular



Fonte: Autorial própria (2023)

Cuidados como uso de luvas e higienização dos ambientes de manipulação devem ser observados na etapa de manuseio e preparação das amostras a serem analisadas, estas são a primeira fonte de variabilidade experimental. Especialmente para ensaios cuja o alvo é o RNA, o mesmo deve ser mantido congelado até o processamento (A BUSTIN *et al.*, 2009).

A etapa de extração de ácidos nucleicos é a segunda fase mais crítica para o processo. A eficiência da extração depende de que a amostra seja devidamente homogeneizada, depende do tipo de amostra, do estado da amostra e da complexidade genética, portanto métodos para avaliação da concentração de ácido nucleico e analisar a sua qualidade são indispensáveis (A BUSTIN *et al.*, 2009).

2.3 Validação e verificação de métodos

Uma série de etapas de otimização deve ser usada sempre que um novo conjunto de primers/sondas são recebidos no laboratório. Essas etapas são necessárias para validar a robustez do ensaio, para demonstrar que a amplificação não é o resultado de anelamentos inespecíficos, assim comprovando que quando um resultado é detectado, ele é oriundo de um alvo específico (A BUSTIN, *et al.* 2009).

Estas etapas segundo A Bustin *et al.* (2009), são utilizados para constatar os seguintes itens necessários para um ensaio de qualidade:

1. A sensibilidade refere-se ao número mínimo de cópias em uma amostra que pode ser medida com precisão com um ensaio, é expressa como o limite de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*), que é a concentração que pode ser detectada com razoável certeza.
2. A especificidade analítica refere-se ao ensaio que detecta a sequência alvo apropriada em vez de outros alvos não específicos também presentes em uma amostra.
3. A precisão refere-se à diferença entre as concentrações medidas experimentalmente e as reais, apresentadas como estimativas do número de cópias.
4. Repetibilidade refere-se à precisão e robustez do ensaio com as mesmas amostras repetidamente analisadas no mesmo ensaio.
5. Reprodutibilidade refere-se à variação nos resultados entre ensaios ou entre diferentes laboratórios.

Existem vários estudos que demonstram a sensibilidade superior de testes moleculares se comparados com ensaios imunológicos. O quadro 1 cita alguns trabalhos, demonstrando esta diferença para algumas doenças de importância clínica.

Quadro 1 - Diferença de sensibilidade analítica.

Patologia (alvo)	Método molecular	Método imunológico	Referência
<i>Helicobacter pylori</i>	PCR > 95%	ELISA 92,4%	WANG, 2015
<i>Influenza A</i>	RT-LAMP 100%	ELISA 90,7%	VEMULA <i>et al.</i> , 2016
<i>Trypanosoma cruzi</i>	PCR 69,2%	ELISA 79,5%	FERRER <i>et al.</i> , 2013
SARS-CoV-2	PCR-LAMP 81% - 100%	ELISA 65-98%	XU <i>et al.</i> , 2020
<i>Chlamydia trachomatis</i>	PCR 90%	ELISA 62-72%	SEADI <i>et al.</i> , 2002

Fonte: Autoria própria (2023)

2.4 Controle de qualidade

2.4.1 Controle de qualidade analítico

Inibidores de PCR compreendem todas as substâncias que têm um efeito negativo na PCR. Os inibidores de PCR podem ter origem na amostra ou podem ser introduzidos durante o processamento da amostra ou extração de ácido nucleico. A principal consequência de uma inibição parcial ou total da PCR é uma diminuição da sensibilidade ou resultados falso-negativos, respectivamente (SCHRADER *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de controles padronizados para avaliação de resultados de PCR e para comparação de eficiência de diferentes protocolos de PCR é indispensável (SCHRADER *et al.*, 2012).

A reação de PCR deve incluir controles como amostras positivas e negativas conhecidas. A amplificação de um gene de referência/endógeno também deve ser usada para validar a integridade do molde de ácido nucléico extraído e evitar erros que surgem devido à estimativa imprecisa de concentração total de material genético e qualidade na amostra. Deve-se ter cautela na escolha destes genes, já que em alguns casos a expressão pode ser variável. Indicações relativas à estabilidade de expressão desses genes podem ser encontradas a partir de bases de dados publicados (HOFFMANN *et al.*, 2005).

Em casos de testes quantitativos, como de expressão gênica, padrões com quantidades do alvo conhecidas devem ser incluídos em cada batelada para geração de gráfico e posterior interpretação de resultado (HOFFMANN *et al.*, 2005).

A eletroforese pode ser controlada pela inclusão de calibradores/escadas de tamanho molecular, que dão uma visão confirmação do tamanho do amplicon detectado (HOFFMANN *et al.*, 2005).

Outro controle importante que deve ser incluído periodicamente é o de um controle ambiental este é realizado deixando microtubos com água abertos em vários locais ao longo do laboratório e incluindo alíquotas da água em corridas de rotina para monitorar contaminantes no ar (SCHRADER *et al.*, 2012).

Também é aconselhável incluir amostras de extrações simuladas (ou seja, extrações realizadas em uma amostra de solução salina tamponada com água/fosfato em paralelo com extrações de rotina). Este controle monitora os reagentes usados no processo de extração e dá uma indicação antecipada de qualquer problema potencial com reagentes (SCHRADER *et al.*, 2012).

2.4.2 Controle de qualidade de ácidos nucleicos

Existem vários procedimentos de quantificação de uso comum, no entanto, incluindo espectrofotometria (NanoDrop; Thermo Scientific), análise microfluídica (Bioanalyzer da Agilent Technologies, Experion da Bio-Rad Laboratories), eletroforese em gel capilar (QIAxcel da Qiagen) ou detecção de corante fluorescente (Ambion /Applied Biosystems' RiboGreen) (A BUSTIN *et al.*, 2009).

Os métodos produzem resultados diferentes. O método mais indicado para quantificar o RNA são os que utilizam corantes fluorescentes de ligação ao RNA (por exemplo, RiboGreen), que são os melhores para detectar baixas concentrações alvo (A BUSTIN *et al.*, 2009).

2.5 Ensaio de proficiência

A avaliação externa da qualidade através do teste de proficiência é um importante indicador de garantia de qualidade de métodos analíticos muito utilizada pelos laboratórios de diagnóstico. É uma ferramenta importante para monitorar

resultados e alcançar melhorias dentro do sistema de gestão da qualidade. (AHMAD-NEJAD *et al.*, 2021).

Os ensaios de proficiência servem como uma medida do desempenho do laboratório. Basicamente, amostras idênticas são testadas com vários métodos e enviada aos inscritos. A comparação dos resultados permite fazer afirmações sobre a precisão de medição e sobre a qualidade dos laboratórios participantes (AHMAD-NEJAD *et al.*, 2021).

Atualmente, existem muitos provedores de testes de proficiência mundiais oferecendo parâmetros do campo de diagnóstico molecular. Os parâmetros medidos vêm das áreas de genética humana, diagnóstico de doenças infecciosas ou marcadores tumorais moleculares, entre outros. Partes do provedor são credenciadas (AHMAD-NEJAD *et al.*, 2021).

Além da detecção de parâmetros específicos de diagnóstico molecular, testes de proficiência metodológica também são oferecidos (por exemplo, para isolamento de DNA ou sequenciamento de DNA usando tecnologia Sanger). A disponibilidade deste tipo de testes de proficiência é importante, especialmente porque podem substituir quando parâmetros específicos não estiverem disponíveis (AHMAD-NEJAD *et al.*, 2021).

O mercado de provedores consegue oferecer rodadas mesmo para os métodos de detecção mais recentes, como de doenças infecciosas como Zika Virus, SARS-CoV-2 (AHMAD-NEJAD *et al.*, 2021).

Embora o escopo e a quantidade de programas de garantia de qualidade externos em diagnóstico molecular sejam muito grandes, o espectro de novas técnicas de diagnóstico e parâmetros baseados nelas é muito variado, tais como PCR multiplex, PCR digital (dPCR) e sequenciamento de nova geração que já chegou no diagnóstico clínico (AHMAD-NEJAD *et al.*, 2021).

Quando métodos de proficiência para doenças recentes não estiverem disponíveis métodos alternativos são recomendados como a realização de estudos bilaterais, quando um laboratório analisa uma amostra e envia a mesma para um laboratório parceiro e após compara-se os resultados (AHMAD-NEJAD *et al.*, 2021).

2.6 Normas regulatórias

Na medicina laboratorial a padronização é garantida pelas chamadas normas ISO, em que a ISO 15189 e a ISO 17025 são particularmente importantes para laboratórios de diagnóstico. Além disso, a ISO 15189 oferece recomendações de uma estrutura para todas áreas de procedimentos até a liberação dos resultados.

Estes documentos contemplam requisitos que cobrem as áreas de pré-análise, análise e pós-análise. A ISO 15189 inclui, entre outras coisas, Procedimentos Operacionais Padrão, processo de validação, capacitação de pessoal, controle de qualidade interno e externo e configuração do laboratório (AHMAD-NEJAD *et al.*, 2021).

3. CONCLUSÃO

Nos últimos anos, a gama disponível e a demanda por ensaios de diagnóstico molecular aumentaram de forma alarmante. As expectativas são altas em relação ao potencial dos testes moleculares que fornecem informações significativas.

À medida que aumenta o número de laboratórios que estabelecem ensaios moleculares para pesquisa ou uso clínico, também há necessidade de padronização de exames e procedimentos laboratoriais. Mais estudos para as padronizações nesta área são necessários para os laboratórios de biologia molecular oferecerem resultados ainda mais confiáveis e de qualidade.

REFERÊNCIAS

A BUSTIN, Stephen *et al.* The MIQE Guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time pcr experiments. **Clinical Chemistry**, [S.L.], v. 55, n. 4, p. 611-622, 1 abr. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.

AHMAD-NEJAD, Parviz *et al.* Current and future challenges in quality assurance in molecular diagnostics. **Clinica Chimica Acta**, [S.L.], v. 519, p. 239-246, ago. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2021.05.004>.

ELLISON, Stephen Lr *et al.* Routes to improving the reliability of low level DNA analysis using real-time PCR. **Bmc Biotechnology**, [S.L.], v. 6, n. 1, 6 jul. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-6-33>.

EMBUYSER, Lien; DEQUEKER, Elisabeth M. C.. Endorsing good quality assurance practices in molecular pathology: risks and recommendations for diagnostic laboratories and external quality assessment providers. **Virchows Archiv**, [S.L.], v. 468, n. 1, p. 31-41, 26 ago. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-015-1839-z>.

ENSON, A.Bennett; GEYER, Stanley. Overview of requirements for quality control and assurance in molecular diagnostics transferred to the clinical laboratory and the role of the FDA and USDA in licensing test kits that make this possible. **Clinical Immunology Newsletter**, [S.L.], v. 13, n. 11, p. 137-138, nov. 1993. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0197-1859\(93\)90030-n](http://dx.doi.org/10.1016/0197-1859(93)90030-n).

FERRER, Elizabeth *et al.* Comparación entre técnicas inmunológicas y moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, [S.L.], v. 31, n. 5, p. 277-282, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2012.09.007>.

HOFFMANN, B. *et al.* Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. **Journal Of Virological Methods**, [S.L.], v. 130, n. 1-2, p. 36-44, dez. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.05.030>.

LIANG, Shu-Ling *et al.* Application of Traditional Clinical Pathology Quality Control Techniques to Molecular Pathology. **The Journal Of Molecular Diagnostics**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 142-146, mar. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.2353/jmoldx.2008.070123>. (LIANG *et al.*, 2008).

MATIAS, Fernanda. **Práticas e protocolos básicos de biologia molecular**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2021.

OMAS, Jg; SUNZERI, Fj; BUSCH, Mp. False-negative results by polymerase chain reaction due to contamination by glove powder. **Transfusion**, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 83-85, jan. 1992. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1537-2995.1992.32192116439.x>.

RDC 50 de 21 de fevereiro de 2002. **Ministério da saúde**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

SCHRADER, C. *et al.* PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. **Journal Of Applied Microbiology**, Berlin, v. 10, n. 8, p. 1014-1026, jun. 2012.

SEADI, Claudete Farina *et al.* Diagnóstico laboratorial da infecção pela Chlamydia trachomatis: vantagens e desvantagens das técnicas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [S.L.], v. 38, n. 2, p. 125-133, 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1676-24442002000200009>.

SHEILS, O.M; FINN, S; O'LEARY, J.J. Quality-control issues for PCR-based assays in the molecular laboratory. **Current Diagnostic Pathology**, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 165-172, jun. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0968-6053\(02\)00096-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0968-6053(02)00096-0). (SHEILS; FINN; O'LEARY, 2003)

VEMULA, Sai *et al.* Current Approaches for Diagnosis of Influenza Virus Infections in Humans. **Viruses**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 96, 12 abr. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v8040096>.

XU, Meng *et al.* COVID-19 diagnostic testing: technology perspective. **Clinical And Translational Medicine**, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 1-15, ago. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ctm2.158>.

WANG, Yao-Kuang. Diagnosis of Helicobacter pylori infection: current options and developments. **World Journal Of Gastroenterology**, [S.L.], v. 21, n. 40, p. 11221, 2015. Baishideng Publishing Group Inc.. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v21.i40.11221>.