



**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA
ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE DA UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

**ESTUDO DOS INDICADORES DE GESTÃO LABORATORIAL
ASSOCIADOS AOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ARN, AUTOMATIZADOS E
MANUAIS, NA DETEÇÃO DE SARS-COV-2 EM EXSUDADOS NASOFARÍNGEOS**

ANA SOFIA GOMES GONÇALVES

DOUTORA INÊS RODRIGUES - ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE, UNIVERSIDADE DO ALGARVE

DOUTORA BIBIANA FERREIRA - ALGARVE BIOMEDICAL CENTER E FACULDADE DE MEDICINA E CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Mestrado em Gestão e Avaliação de Tecnologias em Saúde

Lisboa, 2022

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA
ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE DA UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

**ESTUDO DOS INDICADORES DE GESTÃO LABORATORIAL
ASSOCIADOS AOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ARN, AUTOMATIZADOS E
MANUAIS, NA DETEÇÃO DE SARS-COV-2 EM EXSUDADOS NASOFARÍNGEOS**

ANA SOFIA GOMES GONÇALVES

DOUTORA INÊS RODRIGUES - ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE, UNIVERSIDADE DO
ALGARVE

DOUTORA BIBIANA FERREIRA - ALGARVE BIOMEDICAL CENTER E FACULDADE DE
MEDICINA E CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Mestrado em Gestão e Avaliação de Tecnologias em Saúde

Lisboa, 2022

A Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, do Instituto Politécnico de Lisboa e a Escola Superior de Saúde da Universidade do Algarve, têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação de mestrado, através de exemplares impressos ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e que tal não viole nenhuma restrição imposta por artigos publicados que nela tenham sido incluídos.

Copyright© 2022 – Ana Sofia Gomes Gonçalves

Agradecimentos

O presente projeto contou com o apoio de múltiplas pessoas e instituições, às quais estou profundamente grata. Quero agradecer:

Aos conselhos da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa e ao Centro Académico de Investigação e Formação Biomédica do Algarve (ABC), por terem apoiado a realização deste projeto.

Aos professores do Mestrado em Gestão e Avaliação de Tecnologias em Saúde, por toda a partilha de conhecimento e apoio.

A todos os meus colegas do ABC, pela participação neste estudo, por atenderem às minhas necessidades e facilitarem o horário de trabalho e por todo companheirismo que existe diariamente.

A todos os meus amigos e familiares, principalmente aos meus pais que estiveram sempre ao meu lado, que me ensinaram a lutar pelos meus sonhos e a nunca desistir. Ao Tomás Ponte e Ana Mendinhos, por me apoiarem sempre mesmo nos momentos mais difíceis e por todas as horas passadas em conjunto na biblioteca.

Por último, mas mais importante às minhas orientadoras. À Doutora Inês Rodrigues, por toda a orientação, acompanhamento, disponibilidade e principalmente motivação e à Doutora Bibiana Ferreira pelas sugestões, disponibilidade e conhecimento.

Resumo

Os coronavírus são um grupo de vírus que infetam os humanos e podem causar doenças agudas ou crónicas. Em Dezembro de 2019, foi identificado um novo coronavírus, o SARS-CoV-2, responsável pela doença designada por COVID-19, este vírus demonstrou ser altamente transmissível e em Março de 2020, foi considerado pela Organização Mundial de Saúde uma pandemia mundial. O diagnóstico laboratorial é fundamental na deteção de SARS-CoV-2, permitindo a compreensão da transmissão do vírus, a orientação e monitorização das medidas de controlo de saúde pública e auxiliar na gestão clínica dos pacientes.

O diagnóstico laboratorial para o SARS-CoV-2, pode ser feito a partir de técnicas imunológicas (testes de anticorpos virais e antigénios virais) ou de técnicas moleculares [Testes de Amplificação de Ácidos Nucleicos (TAAN)]. O método de referência para a deteção do SARS-CoV-2 são as técnicas moleculares, çãoa Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-PCR), que compreende um passo prévio de extração do genoma viral das amostras biológicas. A extração do genoma viral pode ser feita de múltiplas formas, sendo estas organizadas em métodos manuais e automáticos. Este estudo focou-se no estudo de indicadores de gestão laboratorial associados aos métodos de extração do RNA viral de amostras biológicas, para a deteção de SARS-CoV-2 por RT-PCR.

Para tal, foram utilizados dados provenientes do laboratório de diagnóstico para COVID-19 do Centro Académico de Investigação e Formação Biomédica do Algarve (ABC), referentes a um tipo de método de extração manual e outro automático. As variáveis estudadas neste projeto foram: tempo de realização de cada um dos métodos de extração em estudo, os custos associados, a gestão de stock e logística e a complexidade na execução dos dois protocolos.

Em suma, o método de extração automático revelou ser o método mais vantajoso para a gestão laboratorial, porque é o mais rápido, tem menos custos associados e o material para a execução deste método ocupa menos espaço de armazenamento. A principal desvantagem do método de extração automático foram os custos associados ao kit, principalmente se for utilizado na extração de um número reduzido de amostras.

Conclui-se que o método de extração automático é o que melhor favorece o fluxo de trabalho laboratorial, quando é necessário a extração de muitas amostras, favorecendo a organização de equipas, a preparação de material e é o que demonstrou ser menos complexo na execução da técnica, por parte dos operadores.

Palavras-Chave: SARS-CoV-2; COVID-19; Diagnóstico Molecular; Métodos de Extração; Gestão;

Abstract

The coronaviruses are a group of viruses that infect humans and can cause acute or chronic illness. In December 2019, a new coronavirus was identified, SARS-CoV-2, which causes the disease called COVID-19, this virus has been shown to be highly transmissible and in March 2020, it was considered a global pandemic by the World Health Organization. Laboratory diagnosis is critical for the detection of SARS-CoV-2, allowing the understanding of virus transmission, the guidance and monitoring of public health control measures and management of patients.

Laboratory diagnosis for SARS-CoV-2, can be performed using immunological techniques (viral antibody and viral antigen tests) or molecular techniques (Nucleic Acid Amplification Tests). The reference method for SARS-CoV-2 detection are molecular techniques, such as Reverse Transcription followed by Real-Time Polymerase Chain Reaction (rRT-PCR), which comprises a previous step of viral genome extraction. Viral genome extraction can be done in multiple ways, which are organized into manual and automated methods. This study focused on the study of laboratory management indicators associated with viral RNA extraction methods from biological samples for the detection of SARS-CoV-2 by RT-PCR.

This study include data from the diagnostic laboratory for COVID-19 of the Algarve Biomedical Center (ABC), referring to one type of manual and another automatic extraction method. The variables were: the time to perform each of the extraction methods under study, the associated costs, the stock management and logistics, and the complexity in performing the two protocols.

In summary, the automatic extraction method proved to be the most advantageous method for the laboratory management, because it's the fastest, has lower associated costs and the material for the execution of this method occupies less storage space. The main disadvantage of the automatic extraction method was the costs associated with the kit, especially if it is used for extracting a small number of samples.

We conclude that the automatic extraction method is the one that best serves the laboratory workflow, when the extraction of many samples is necessary, favoring the organization of teams, preparation of material and is also considered the least complex by the operators.

Keywords: SARS-CoV-2; COVID-19; Molecular Diagnosis; Extraction Methods; Management;

Índice

Agradecimentos	<i>vii</i>
Resumo	<i>ix</i>
Abstract	<i>xi</i>
Índice	<i>xiii</i>
Índice de Tabelas.....	<i>xv</i>
Índice de Figuras.....	<i>xvi</i>
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos	<i>xviii</i>
1. Introdução	1
2. Enquadramento Teórico.....	4
2.1 Coronavírus	4
2.1.1. Estrutura Biológica do SARS-CoV-2.....	5
2.1.2. Mecanismo de Infecção do SARS-CoV-2 em Humanos.....	6
2.2. Diagnóstico Laboratorial de COVID-19/SARS-CoV-2	8
2.2.1 Diagnóstico Imunológico.....	9
2.2.2 Diagnóstico Molecular	10
2.3. Gestão e Avaliação de Tecnologias na Saúde	13
2.3.1 Avaliação Económica em Tecnologias da Saúde.....	14
2.3.2 Avaliação de custo com os Resíduos Laboratoriais	15
2.3.3 Avaliação do espaço.....	17
2.3.4 Avaliação da complexidade dos métodos de extração.....	17
3. Metodologia.....	18
3.1. Desenho e Local do Estudo	18
3.2. Variáveis	18
3.3. Ética ..	20
4. Resultados.....	21
4.1 Tempo.....	21

4.2. Custos dos Consumíveis e Instrumentação.....	26
4.3. Custos com Resíduos.....	30
4.4. Avaliação dos espaços ocupados	32
4.5. Opinião dos Técnicos de Saúde sobre os dois métodos de extração em estudo através de entrevista estruturada	33
4.5. Limitações.....	36
5. Discussão dos resultados	37
6. Conclusão e considerações finais	45
7. Referências Bibliográficas.....	47
8. Anexos	53
9. Apêndices	56

Índice de Tabelas

Tabela 4.1. Tempos recolhidos para o método de extração automático, em minutos.....	23
Tabela 4.2. Tempos seleccionados do método de extração automática (20 ensaios seleccionados com 94 amostras) em minutos.....	24
Tabela 4.3. Tempos recolhidos para o método de extração manual, em minutos.....	24
Tabela 4.4. Tempos para o método de extração automático, obtidos através de cálculos teóricos para 94 amostras extraídas (em minutos)	25
Tabela 4.5. Valores de Significância da variável tempo (T1, T2 e T3)	26
Tabela 4.6. Custos médios dos consumíveis em euros	28
Tabela 4.7. Custos com resíduos.....	31
Tabela 9.1. Tabela utilizada na recolha de dados da variável “tempo”.....	56
Tabela 9.2. Custos médios da instrumentação em euros.....	57

Índice de Figuras

Figura 2.1. Representação esquemática da estrutura genómica do SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2	6
Figura 2.2. Representação esquemática da partícula viral do SARS-CoV-2.....	6
Figura 2.3. Patogénese da Covid-19.....	8
Figura 2.4. Representação molecular do princípio da técnica de RT-PCR.....	12
Figura 4.1: Representação da variável tempo do método manual e automático.....	25
Figura 4.2: Comparação da média dos custos dos consumíveis entre os métodos de extração manual e automático.	27
Figura 4.3: Comparação da média dos custos da instrumentação entre os métodos de extração manual e automático.	29
Figura 4.4: Comparação da média dos custos dos consumíveis e da instrumentação entre os métodos de extração manual e automático.....	30
Figura 4.5: Comparação da média dos custos dos resíduos entre os métodos de extração manual e automático.....	31
Figura 4.6: Comparação da média do espaço ocupado dos kits e consumíveis entre os métodos de extração manual e automático.....	33
Figura 9.1: Comparação da média dos custos dos consumíveis entre os métodos de extração.....	57

Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

ABC	Centro Académico de Investigação e Formação Biomédica do Algarve
Ac	Anticorpo
ACE2	Angiotensina – 2
Ag	Antigénio
ARN	Ácido Ribonucleico
ATS	Avaliação de Tecnologias em Saúde
CLIA	Imunoensaios de Quimiluminescência
CoV	Coronavírus
DNAc	DNA complementar
E	Envelope
ELISA	Ensaios de Imunoabsorção Enzimática
EPIS	Equipamentos de Proteção Individual
LFI	Imunoensaios de Fluxo Lateral
M	Membrana
MERS-CoV	Síndrome Respiratória do Médio Oriente – Coronavírus
N	Nuclocapsídeo
<i>n</i>	Número de elementos que uma amostra concretamente representa
OMS	Organização Mundial de Saúde
QALY	Quality Adjusted Life Years
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase
S	Spike
SARS-CoV	Síndrome Respiratória Aguda Grave – Coronavírus
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica
TAAN	Teste de amplificação de ácidos nucleicos
VOC's	Variantes de preocupação
VOI's	Variantes de interesse
Medidas	
cm³	Centímetros cúbicos
kb	Quilobases
nm	Nanómetros
°C	Graus Centígrados
µl	Microlitros

1. Introdução

O mundo tem testemunhado numerosas epidemias e pandemias, que têm afetado milhares de milhões de vidas ao longo dos tempos. Apesar dos avanços na medicina, na tecnologia e na investigação, continuamos a ser confrontados com novos agentes patogénicos que constituem uma real ameaça para a vida humana, para a segurança económica global e para os sistemas de saúde (1).

Em Dezembro de 2019 a Organização Mundial de Saúde (OMS) foi alertada pela primeira vez da existência de um grupo de pessoas com pneumonia de etiologia desconhecida na cidade de Wuhan, na China. O *International Committee on Taxonomy of Viruses*, denominou o novo vírus como SARS-CoV-2 e a doença que o mesmo provoca de COVID-19 (2). Sendo altamente transmissível, esta nova doença espalhou-se rapidamente por todo o mundo e a 11 de Março de 2020 a OMS declarou, a COVID-19 como pandemia (3). Globalmente até dia 5 Abril de 2022, já foram confirmados 490 853 129 casos de COVID-19 e 6 155 344 mortes (4).

O COVID-19 tem demonstrado ser um grande desafio em diferentes âmbitos, como no âmbito social, económico e de saúde pública, sendo que um dos principais desafios é realizar um diagnóstico correto e atempado, porque a COVID-19 é semelhante a outras doenças respiratórias, pelo que o papel dos laboratórios tem sido fundamental. Assim, os laboratórios de diagnóstico tiveram que se adaptar e reorganizar rapidamente as suas estruturas de modo a conseguir dar apoio à população. (5). Os testes de diagnóstico molecular são uma ferramenta fundamental na deteção de SARS-CoV-2, permitem a compreensão da transmissão do vírus, a orientação e monitorização das medidas de controlo de saúde pública e auxiliam na gestão clínica dos pacientes. (6).

Face a esta situação, em resposta à população nacional, o ABC começou a realizar testes para o diagnóstico de COVID-19, desde o início da pandemia até à atualidade.

Neste trabalho de investigação foram analisados dados do laboratório do ABC, que utiliza como método de referência para o diagnóstico de COVID-19, o teste de RT-PCR em amostras biológicas. Antes da realização do RT-PCR, é fundamental a colheita da amostra, a inativação do vírus e a extração do RNA viral, sendo que os métodos de extração são o foco deste trabalho. Para a realização da extração do RNA viral nas amostras biológicas podem ser utilizados diferentes kits com métodos diferentes. No laboratório em estudo já foram utilizados diferentes kits de extração, automáticos e

manuais, mas atualmente são apenas utilizados dois kits, um manual e outro automático. O principal objetivo deste estudo foi estudar diferentes indicadores de gestão laboratorial associados aos métodos de extração de *RNA*, automatizados e manuais no laboratório ABC.

Para estudar os distintos indicadores, foram consideradas diferentes variáveis no estudo, como: o tempo de realização de cada um dos métodos de extração em estudo; custos associados a cada um dos métodos em estudo em relação a: consumíveis, instrumentação, kits e resíduos; utilização de espaços na gestão de stock e logística associada a cada um dos métodos; complexidade na execução dos dois protocolos.

A realização deste trabalho de investigação esteve subjacente à questão: Qual o método de extração de *RNA* que melhor se adequa ao fluxo de trabalho laboratorial, e quais são as suas vantagens e desvantagens?

Este estudo encontra-se organizada em 8 capítulos: Introdução; Enquadramento Teórico onde se encontra a revisão de literatura sobre o Coronavírus (estrutura biológica do vírus, o mecanismo de infeção e o diagnóstico laboratorial) e sobre gestão e avaliação de tecnologias na saúde; Metodologia no qual estão descritos todos os procedimentos realizados na recolha e tratamento de dados deste trabalho; Resultados; Discussão de Resultados; Conclusão e considerações finais; Referências bibliográficas; Anexos.

2. Enquadramento Teórico

Neste capítulo, foi feita uma revisão geral dos conhecimentos atuais sobre principais tópicos da tese. Inicialmente é feita a caracterização do Coronavírus (a taxonomia, a estrutura biológica do vírus, o mecanismo de infeção e o diagnóstico laboratorial), de seguida é abordado o tema da Gestão e Avaliação de Tecnologias na Saúde e da Avaliação Económica em Tecnologias da Saúde, focando o tema da tese.

2.1 Coronavírus

Os coronavírus são um grupo de vírus que infetam diversas espécies de animais, incluindo os humanos e podem causar doenças agudas ou crónicas (7). Segundo o *International Committee on Taxonomy of Viruses*, os coronavírus pertencem à ordem *Nidovirales*, à família *Coronaviridae* e à subfamília *Coronavirinae*, esta subfamília é constituída por quatro géneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*. Os géneros *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus*, infetam apenas mamíferos, enquanto os *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus* infetam principalmente aves. (8) Os *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus* geralmente causam doenças respiratórias nos humanos e doenças gastrointestinais nos outros mamíferos. Os dois vírus mais patogénicos conhecidos são o SARS-CoV e o MERS-CoV, que causam Síndrome Respiratória Aguda Grave, existem outros quatro coronavírus que podem infetar o humano (HCoV- NL63, HCoV-229E, HCoV- OC43 and HKU1) (8). Estes quatro vírus são frequentemente conhecidos como HCoVs, causam geralmente doença ligeira do trato respiratório superior e são responsáveis por cerca de 15 a 30% dos casos comuns de constipação em adultos (9).

O mundo tem testemunhado numerosas epidemias e pandemias, que têm afetado milhares de milhões de vidas ao longo dos tempos. Apesar dos avanços na medicina, na tecnologia e na investigação, continuamos a ser confrontados com novos agentes patogénicos que constituem uma real ameaça para a vida humana, para a segurança económica global e para os sistemas de saúde (1).

Em 2002-2003 o SARS-CoV (Síndrome Respiratória Aguda Grave – Coronavírus) originou uma epidemia que atingiu cerca de 30 países e infetou 79 000 pessoas até 2003, com uma mortalidade de 9,5% (10). Outra situação semelhante ocorreu com o MERS-CoV (Síndrome Respiratória do Médio Oriente – Coronavírus) que emergiu em 2012 na Arábia Saudita. Até 2019 atingiu cerca 27 países, mais de 2450

peças e mais 800 mortes (11). Pensa-se que a transmissão deste vírus para os humanos ocorreu de forma direta ou indireta pelo contacto próximo com os camelos, que são uma espécie hospedeira deste vírus, depois de um humano infetado pode transmitir o vírus para outros humanos (11).

Em Dezembro de 2019, a Organização Mundial de Saúde (OMS) foi alertada pela primeira vez da existência de um grupo de pessoas com pneumonia de etiologia desconhecida na cidade de Wuhan, na China. O *International Committee on Taxonomy of Viruses*, denominou o novo vírus como SARS-CoV-2 e a doença que o mesmo provoca de COVID-19 (2). Sendo altamente transmissível, esta nova doença espalhou-se rapidamente por todo o mundo. Ultrapassou o SARS e o MERS, tanto em termos do número de pessoas infetadas como na amplitude espacial das áreas epidémicas (12).

A 11 de Março de 2020 a OMS declarou, a COVID-19 como pandemia, pois em menos de três meses já tinha causado mais de 118 mil casos de infeção, em mais de 114 países e 4291 mortes (3). Globalmente, até dia 19 Abril de 2022, já foram confirmados 503 131 834 casos de COVID-19 e 6 200 571 mortes (4). O surto contínuo de COVID-19 tem representado uma ameaça assombrosa para a saúde pública mundial (12–16). E tem colocado grandes desafios ao longo do tempo, desde o isolamento da sequência genética do vírus, prevenção da infeção até ao desenvolvimento de vacinas(10).

2.1.1. Estrutura Biológica do SARS-CoV-2

Para o diagnóstico de SARS-CoV-2 é importante conseguir detetar elementos da estrutura genómica viral, através de métodos moleculares. De um modo geral a estrutura genómica dos *Betacoronavirus* é bastante semelhante, todos eles possuem uma ordem característica dos genes (5' ORF1ab, spike (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N) -3'). As proteínas acessórias são a principal diferença entre os *Betacoronavirus*, estas proteínas diferem em número, sequência e função (1,7,17,18). Na figura 2.1 está representada a estrutura genómica de diferentes *Betacoronavirus*.

O SARS-CoV 2 é um vírus com envelope, apresenta uma forma esférica com um diâmetro que mede entre 65 e 125 nm e a sua superfície é constituída por diferentes proteínas que se organizam em forma de coroa (3). No seu interior contém uma cadeia única de ácido ribonucleico (*RNA*), de sentido positivo, que mede entre 26kb e 32kb de comprimento (19). Estruturalmente, o SARS-CoV 2 é constituído por quatro proteínas estruturais principais, a Spike (S), a proteína do Envelope (E), a proteína de Membrana

(M) e a proteína do Nucleocapsídeo (N), para além destas também é constituído por outras proteínas acessórias, como a ORF 3a, ORF 6, ORF 7a, ORF 7b, ORF 8 e ORF 10 (3). Como está representado na figura 2.1 e 2.2.

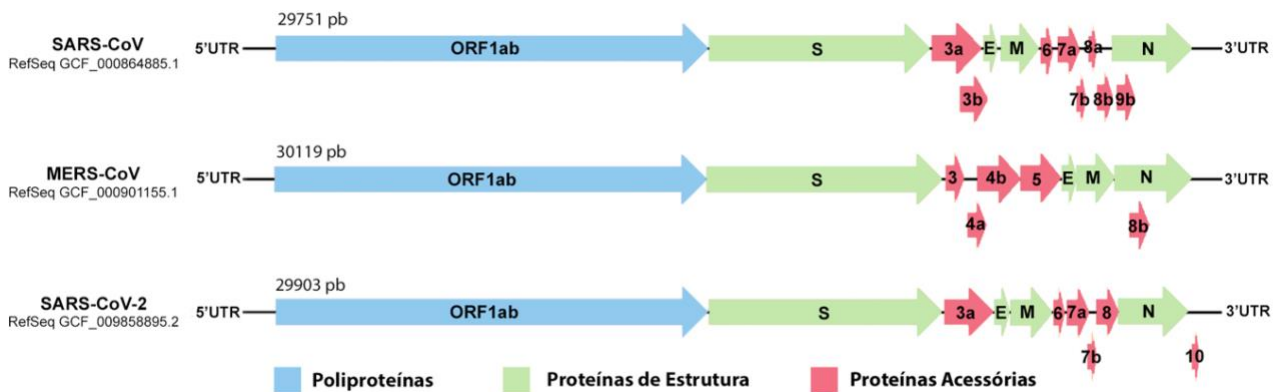


Figura 2.1. Representação esquemática da estrutura genómica do SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2. Os três vírus apresentam conservado o gene ORF1ab, representado a azul. A verde estão representados os genes que codificam para as proteínas de estrutura, que são comuns a todos os CoV's. As proteínas acessórias, representadas a rosa, são o que difere entre os diferentes tipo de CoV. Adaptado de Yan Y et al. 2020 (20)

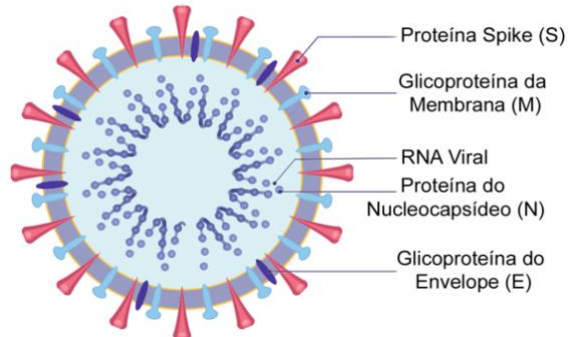


Figura 2.2. Representação esquemática da partícula viral do SARS-CoV-2. Identificação das diferentes proteínas: S – Proteína Spike; M – Glicoproteína da Membrana; RNA Viral; N – Proteína do Nucleocapsídeo; E – Glicoproteína do Envelope; Adaptado de Chams et al. 2020. (1)

2.1.2. Mecanismo de Infecção do SARS-CoV-2 em Humanos

A transmissão de humano para humano pode ocorrer através do contacto direto com pessoas infetadas com SARS-CoV-2, por via aérea, através de aerossóis, ou através de procedimentos médicos. Uma pessoa infetada com o vírus liberta partículas

virais através do trato respiratório, da saliva, da urina e das fezes, tudo isto representam fontes de propagação do vírus. A transmissão também pode ocorrer de forma indireta, isto é, através do contacto com objetos e superfícies contaminados com partículas virias (21).

A infeção por SARS-CoV-2 entre diferentes espécies e de humano para humano está dependente da ligação entre a proteína Spike do vírus e o recetor ACE2 (Angiotensina – 2), presente nas células do hospedeiro. A alta expressão de ACE2 foi identificada nas células do pulmão (nos pneumócitos tipo II), no esófago, no íleo, no cólon, nos rins, no miocárdio, na bexiga e na mucosa oral (22). Depois da ligação, entre a proteína Spike e o recetor ACE2, ocorre a fusão entre o envelope viral e a membrana da célula do hospedeiro, permitindo a entrada do *RNA* viral na célula do hospedeiro para poder realizar a replicação viral (3). Como está representado na figura 2.3.

O SARS-CoV-2 causa uma forma grave de pneumonia que se caracteriza por lesões alveolares difusas e que têm o potencial de progredir para a falência respiratória, provocando por vezes, a morte do hospedeiro (23). Apesar da descrição, a maioria das pessoas infetadas apresentam sintomas leves, as pessoas que apresentam maior risco de desenvolver a forma mais grave da infeção são pessoas idosas ou com doenças subjacentes, uma vez que, apresentam na sua generalidade um sistema imunitário menos efetivo (24,25).

Os sintomas mais observados em pacientes com COVID-19 são febre, tosse, fadiga, mialgia, ligeira dispneia, dor de garganta, dor de cabeça, conjuntivite e perda de olfato e/ou paladar. No entanto, existem infeções por outros vírus que provocam sintomas muito similares, o que dificulta o diagnóstico de COVID-19, principalmente na época da gripe. Para além dos sintomas já referidos também existem casos que referem o envolvimento gastrointestinal como diarreia, náuseas e vómitos (21,26).

Num estudo realizado em Portugal foram recolhidas informações de janeiro a maio de 2020, onde foram registados 3912 casos positivos de funcionários nos hospitais portugueses. Segundo o estudo 186 (6,5%) dos casos positivos não teve qualquer sintoma e 731 (28,2%) não apresentou febre, tosse ou falta de ar, os sintomas mais frequentemente mencionados/registados foram: tosse (60,2%); mialgia (49,8%); dor de cabeça (46,8%); febre (42,0%); fadiga e fraqueza (32,9%); odinofagia (31,3%); rinorreia (30,4%); diarreia (12,9%); falta de ar (10,5%); dor no peito (10,3%) (27).

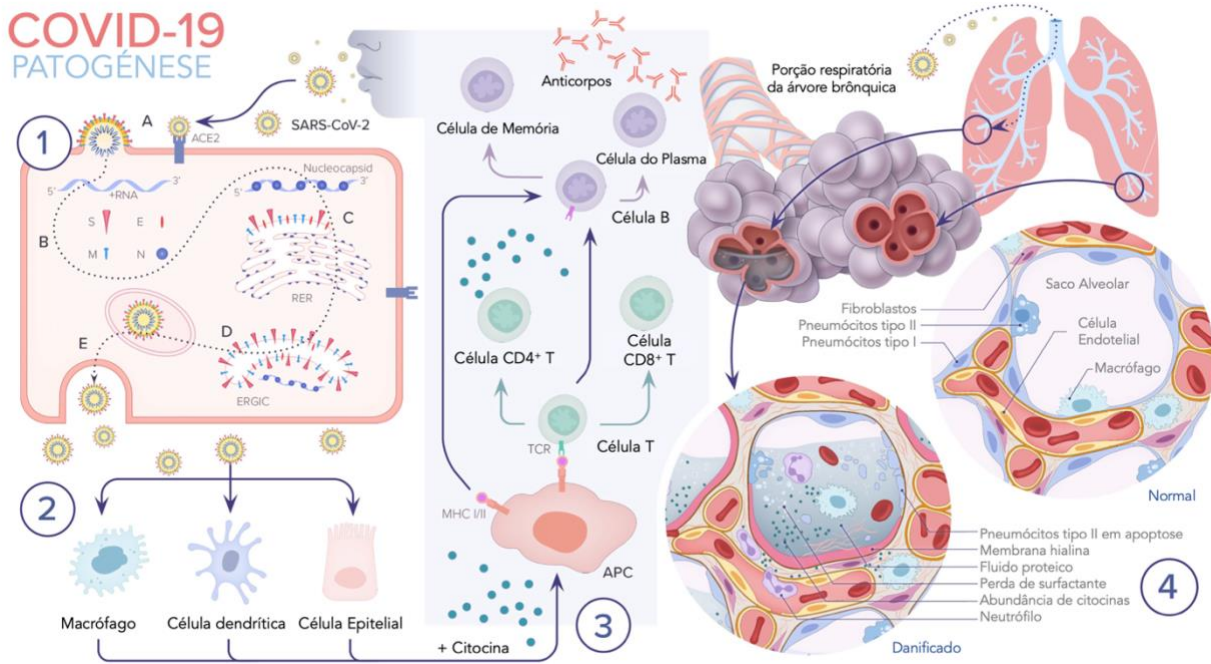


Figura 2.3. Patogênese da Covid-19. **1A.** O vírus SARS-CoV-2 entra na célula epitelial por endocitose ou pela fusão das membranas através da ligação ao recetor ACE2, de seguida liberta RNA viral para o citoplasma da célula. **1B.** O RNA viral utiliza a maquinaria da célula para se replicar e para produzir as suas proteínas virais. **1C.** As proteínas virais S, E, e M organizam-se no retículo endoplasmático rugoso (RER). **1D.** As estruturas virais e o nucleocapsídeo são organizadas no complexo de Golgi. **1E.** A nova partícula viral (virião) é incorporada numa vesícula para ser transportada para o exterior da célula por exocitose. **2.** Estes viriões vão infectar outras células do hospedeiro e induzem fatores inflamatórios que levam à ativação de macrófagos e de células dendríticas. **3.** Apresentação do antígeno (Ag) do SARS-CoV-2 através dos complexos histocompatíveis (MHC I e II), isto vai estimular a resposta imunitária celular e humoral, resultando na produção de citocinas e anticorpos (Ac). **4.** Nos casos mais graves de COVID-19, o vírus atinge o trato respiratório inferior, infectando os pneumócitos tipo II, provocando a apoptose dos mesmos e a perda de líquido surfactante. O efeito dos macrófagos e neutrófilos induz o aumento de citocinas, o que leva a fugas capilares, causando conseqüentemente o edema alveolar e a formação de membrana hialina. Todas estas alterações patológicas resultam em danos e colapsos alveolares, afetando as trocas gasosas. Adaptado de Chams (1)

2.2. Diagnóstico Laboratorial de COVID-19/SARS-CoV-2

O COVID-19 tem demonstrado ser um grande desafio em diferentes âmbitos, como no âmbito social, económico e de saúde pública, sendo que um dos principais desafios é realizar um diagnóstico correto e atempado, visto que a COVID-19 é semelhante a outras doenças respiratórias, pelo que o papel dos laboratórios tem sido fundamental. Assim, os laboratórios de diagnóstico tiveram que se adaptar e reorganizar rapidamente as suas estruturas de modo a conseguir dar apoio à população. Os laboratórios que fazem o diagnóstico para COVID-19 têm que ser capazes de detetar, avaliar, notificar e relatar os resultados às instituições de Saúde Pública Nacionais. Em Portugal os resultados do diagnóstico de COVID-19 devem ser reportados na plataforma do Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica (SINAVE), até o máximo de 24 horas (5).

Os testes de diagnóstico são uma ferramenta fundamental na detecção de SARS-CoV-2, na compreensão da transmissão do vírus, na orientação e monitorização das medidas de controlo de saúde pública e na gestão clínica dos pacientes. Com o passar do tempo surgem cada vez mais novas variantes do vírus, estas variantes surgem devido a mutações no *RNA* viral, estas podem levar a alterações fenotípicas do vírus, podendo interferir no diagnóstico laboratorial. Estes tipos de variantes são designados como variantes de interesse (VOI's – *Variants of interest*) ou variantes de preocupação (VOC's – *Variants of Concern*) (6).

Estão atualmente disponíveis diferentes técnicas de diagnóstico para o SARS-CoV-2, como: (6)

- Técnicas de diagnóstico imunológico (Testes de anticorpos virais e antígenos virais)
- Técnicas de diagnóstico molecular (Teste de amplificação de ácidos nucleicos (TAAN))

2.2.1 Diagnóstico Imunológico

Desde o início da pandemia, os laboratórios têm usado os TAAN, como a Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR), para detetar a presença de SARS-CoV-2 em amostras biológicas para o diagnóstico da COVID-19. Com o evoluir da pandemia têm surgido outros testes que permitem de forma mais rápida e económica fazer a detecção de SARS-CoV-2 em amostras biológicas, como os testes de detecção de anticorpos e antígenos (28).

Teste de Detecção de Anticorpos

Os testes de detecção de anticorpos, também conhecidos como testes serológicos permitem detetar anticorpos anti-SARS-CoV-2 IgG e IgM, no sangue, soro ou plasma de pacientes que já estiveram em contacto com o vírus SARS-CoV-2, quer seja, por terem estado infetados ou devido à vacina (29). Estes testes podem ser realizados por Imunoensaios de Fluxo Lateral (LFI), Ensaios de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e Imunoensaios de Quimiluminescência (CLIA) (4). Os testes que detetam anticorpos não são recomendados para o diagnóstico de COVID-19, pois os anticorpos podem levar até duas semanas a serem produzidos no organismo do hospedeiro, porém estes testes desempenham um papel importante na detecção de infeções passadas, dando também informações sobre a imunidade da população ao SARS-CoV-2 (29).

Testes de Detecção de Antígenos

Os testes de deteção de antígenos, também conhecidos como testes rápidos de antígenos, são frequentemente utilizados para diagnosticar alguns patógenos respiratórios (29). Estes tipos de testes são de rápida execução, simples de realizar, estão acessíveis a qualquer cidadão e são bastante económicos. Estes testes de diagnóstico rápido, foram concebidos para detetar a presença de proteínas virais (antígenos) do SARS-CoV-2 em amostras do trato respiratório. A maioria destes testes são imunoenaios de fluxo lateral, que permitem obter o resultado entre 5 e 30 minutos após a colheita nasofaríngea ou orofaríngea (30).

Estes testes oferecem a oportunidade de aumentar a disponibilidade de testes e a velocidade de testagem em cenários apropriados, como testes em massa e rastreios à população. Os testes de antígeno para o SARS-CoV-2 são menos sensíveis que os TAAN, uma vez que, apenas têm demonstrado bons resultados em indivíduos com maior carga viral (26).

2.2.2 Diagnóstico Molecular

O método de referência para o diagnóstico de COVID-19 é o teste de RT-PCR em amostras biológicas uma vez que são os testes mais sensíveis e específicos, do que os testes imunológicos (24).

As amostras utilizadas para a realização desta técnica são exsudados da nasofaringe e/ou exsudados da orofaringe colhidos com zaragatoa que posteriormente é colocada num tubo contendo 2 a 3 ml de meio de transporte para vírus. Após a colheita as amostras devem ser transportadas entre 2°C e 8°C, e podem ser processadas nestas condições até 5 dias após a colheita, caso a amostra não possa ser processada nesse período deve ser conservada a -70°C (31).

A primeira etapa necessária para a realização de qualquer metodologia molecular para a deteção de SARS-CoV-2 é a extração e purificação do *RNA* viral. A extração do *RNA* é um passo crítico para a deteção segura do vírus e é o elemento-chave para o sucesso do diagnóstico molecular, porque o *RNA* é uma molécula instável e de fácil degradação (32).

A técnica ideal de extração seria aquela que disponibilizasse grande quantidade de *RNA* puro e intacto, de modo rápido e reprodutível, com pouco custo e capaz de permitir extração de grande número de amostras simultaneamente (33).

Existem distintas técnicas que podem ser aplicadas na extração do *RNA* viral, no entanto, todas elas têm etapas transversais, começando pela lise das membranas

lipídicas do invólucro viral, seguindo a purificação do *RNA* viral, que tem como objetivo a separação do *RNA* de outros componentes presentes na amostra biológica. Depois de purificado, o *RNA* é precipitado ou isolado, e a última etapa é a eluição do *RNA* em água ou tampão (33).

O passo de extração de *RNA* viral pode, portanto, ser realizado de diferentes formas, não interferindo com os procedimentos posteriores à sua extração. Neste estudo são avaliados dois protocolos (ANEXO 1 e 2) de extração de *RNA*: a extração manual, com o kit *CoV RNA* marca *A&A Biotechnology*; e a extração automatizada com o kit *MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation*, utilizando o equipamento *KingFisher Flex System* de *ThermoFisher*.

Ambos os protocolos utilizam o método baseado na adsorção do *RNA*, que usa a propriedade do ácido nucleico de se ligar a superfícies, como esferas magnéticas, sílica, materiais de látex de poliestireno, matriz de celulose ou fibras de vidro, na presença de determinados sais ou agentes caotrópicos (33). O kit manual *CoV RNA* utiliza as minicolunas de sílica e o kit *MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation* utiliza esferas magnéticas. Estes protocolos foram avaliados na vertente da gestão laboratorial de modo a compreender quais as vantagens e desvantagens da utilização de cada técnica. Assim que a etapa da extração é finalizada, o produto obtido é colocado em gelo para se manter estável e posteriormente é realizada a técnica de RT-PCR.

A RT-PCR, é uma técnica laboratorial enzimática, que utiliza a enzima transcriptase reversa para converter o *RNA* viral previamente extraído e purificado em *DNA* complementar (*DNAc*), subseqüentemente o *DNAc* é amplificado pela enzima *DNA* polimerase, em vários ciclos de temperatura diferentes, por PCR. A PCR combina a amplificação e a deteção de pequenos segmentos do genoma viral através da utilização de *primers* (pequenas sequências de *DNA* de cadeia simples complementares ao *DNA* que se pretende detetar e amplificar) e envolve três principais etapas: a desnaturação (entre 94-95°C), a hibridação (depende da temperatura dos *primers*) e a extensão (normalmente a 72°C) (32,34). Na figura 2.4 estão representadas as diferentes etapas desta técnica.

A técnica RT-PCR é quantitativa, uma vez que o número de cópias de *RNA* geradas num ciclo de PCR, aumenta exponencialmente e é proporcional à quantidade de material inicial, ou seja, carga viral presente na amostra biológica, sendo o material amplificado quantificado a cada ciclo através de uma sonda marcada com fluorescência. No entanto o resultado é expresso na forma qualitativa, como positivo ou negativo (32).

O positivo significa que foi detetado *RNA* viral na amostra e o negativo significa que não foi detetado *RNA* viral na amostra.

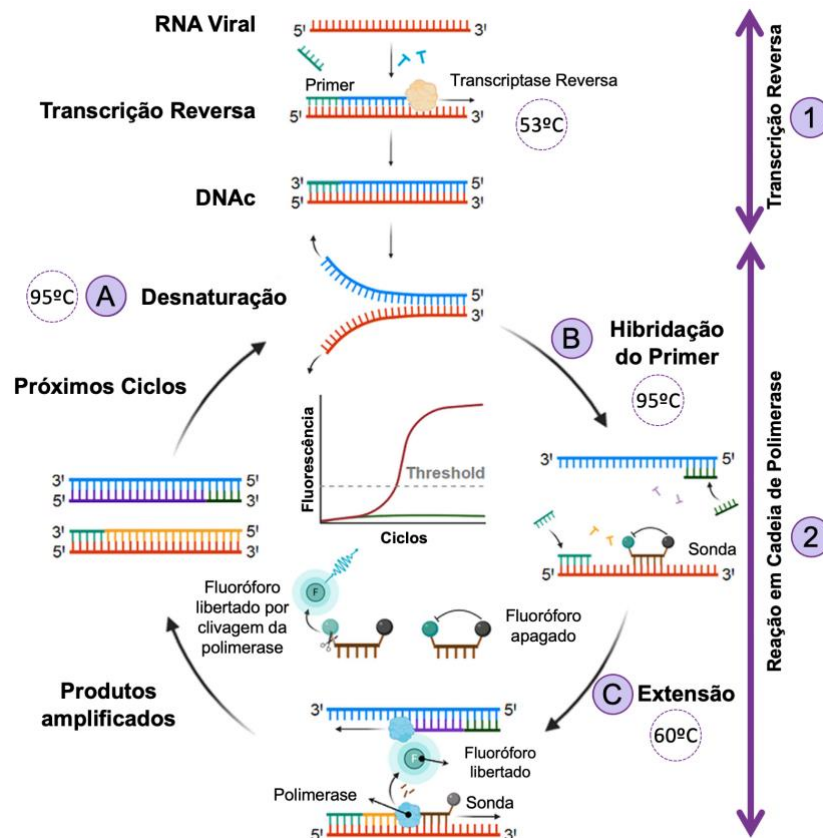


Figura 2.4. Representação molecular do princípio da técnica de RT-PCR.

1: Transcrição Reversa - O *RNA* viral é convertido em *DNAc* pela enzima transcriptase reversa a uma temperatura de 53°C; 2: Reação em Cadeia de Polimerase, que se baseia em três passos: (A) A desnaturação do *DNAc* com temperaturas elevadas (95°C); (B) Hibridação dos *primers* e da *probe* (necessária para quantificar o sinal de amplificação) na cadeia desnaturada de *DNAc* a uma temperatura de 95°C; (C) Extensão ou síntese de cópias de *RNA* pela enzima DNA polimerase a uma temperatura de 60°C. Os produtos da amplificação seguem o mesmo ciclo de modo a gerar um maior número de cópias de *RNA*. A *TaqMan* probe é utilizada para quantificar as cópias de *RNA* geradas, produzindo um sinal de fluorescência durante os ciclos de amplificação. Adaptado de Afzal A. 2020. (32)

Existem muitos kits de detecção de *RNA* viral comercialmente disponíveis. O kit de RT-PCR utilizado no laboratório de referência para este estudo é o *TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR* da marca *Thermo Fisher Scientific*. Este kit é constituído por três pares de *primers* correspondentes a três regiões genómicas do SARS-CoV-2,

a ORF1ab, a S e a N. Neste kit são utilizados três controlos, o negativo, o positivo (que amplifica para ORF1ab, S e N) e o MS2. O MS2 é considerado um *RNA Phage Control*, para verificar a eficácia da preparação das amostras e a ausência de inibidores na reação PCR (35,36). O termociclador utilizado no laboratório, de referência para este estudo para a realização da RT-PCR é o *QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System*, este equipamento inclui um software que faz de forma automática a análise e interpretação dos resultados, contribuindo para a redução do risco de erros de interpretação pelo operador (37).

2.3. Gestão e Avaliação de Tecnologias na Saúde

A palavra gestão refere-se ao ato de gerir e administrar, por exemplo, uma empresa ou instituição, e pode ser considerada um conjunto de medidas que visa a utilização racional de recursos em função de um determinado objetivo (38). A gestão contribui para a concretização dos objetivos organizacionais de forma eficaz e eficiente através do planeamento, organização e controlo dos recursos organizacionais (39,40).

Na gestão de um laboratório de diagnóstico, tal como noutras instituições é necessário fazer escolhas, tomar decisões, selecionar um serviço em detrimento de outro, comprar um determinado equipamento de entre os vários que existem no mercado, etc (41).

Frequentemente no sector da Saúde, existem decisões que são tomadas sem recurso a uma fundamentação estruturada, com base na aplicabilidade e gestão das tecnologias existentes. Assim, podem ser tomadas decisões tendo por base palpites, intuição ou outros motivos para os quais não existe uma fundamentação sólida. Num mundo com tantas alternativas disponíveis no mercado é importante a existência de um conjunto de procedimentos sistematizados, organizados e bem sustentados que permitam a utilização dos recursos de forma racional, efetiva e eficiente (41).

A avaliação de tecnologias em saúde (ATS) é um processo multidisciplinar que utiliza métodos específicos para avaliar uma tecnologia de saúde, em diferentes fases do seu ciclo de vida. Uma tecnologia de saúde é tudo o que é desenvolvido para prevenir, diagnosticar ou tratar uma condição médica específica; promover a saúde, promover a reabilitação ou até mesmo organizar a prestação de cuidados de saúde, sejam eles de prevenção, monitorização ou terapêutica. Uma tecnologia de saúde pode ser um teste, um dispositivo, um medicamento, uma vacina, um procedimento e um programa ou sistema (42,43).

O papel fundamental da ATS é o de proporcionar às partes interessadas informação acessível, baseada na melhor evidência científica disponível, para que possam orientar e fundamentar processos de decisão, de modo a promover um sistema de saúde equitativo, eficiente e de alta qualidade (41).

A evidência científica compreende, normalmente, segurança, eficácia, efetividade, custo e relações custo/efetividade. Contudo, a ATS preocupa-se também com implicações legais, éticas e organizacionais da implementação de uma dada tecnologia, bem como com consequências macroeconómicas associadas como, por exemplo, orçamentos, gestão de custos de oportunidade, regulação, transferência de tecnologia, de entre outros.(44)

De forma a compreender qual o método de extração de *RNA* que melhor se adequa ao fluxo de trabalho laboratorial e tendo em consideração os conceitos e ferramentas de gestão e ATS anteriormente referidos foram estudadas diferentes variáveis. Na vertente da gestão foram estudadas as variáveis: tempo de realização dos protocolos dos dois métodos de extração em estudo; custos associados a cada um dos dois métodos em estudo em relação a: consumíveis, kits, instrumentação e resíduos; utilização de espaços na gestão de stock e logística associada a cada um dos métodos; complexidade na execução dos dois protocolos.

Através da realização deste projeto, pretende-se identificar e analisar as diferentes etapas e respetivos indicadores, do processo de gestão associado aos diferentes métodos de extração de *RNA*, utilizados na deteção de SARS-CoV-2, em contexto clínico. Pretendeu-se também compreender o impacto que os diferentes métodos podem eventualmente ter na gestão da rotina laboratorial, em termos tempo de realização de cada um dos métodos em estudo, complexidade e reprodutibilidade na execução dos dois protocolos, utilização de espaços na gestão de stock e logística associada a cada um dos métodos.

2.3.1 Avaliação Económica em Tecnologias da Saúde

Um dos componentes principais da ATS são os estudos de avaliação económica, estes permitem determinar a alternativa que proporciona o maior benefício pelo menor custo possível, apoiando o processo de tomada de decisão (41).

A avaliação económica, é uma análise comparativa de diferentes alternativas em termos de custos e consequências, pode-se também definir como um conjunto de métodos de investigação que avaliam os custos e os benefícios das tecnologias a fim de comparar diferentes alternativas. Têm diversas aplicações, desde a avaliação de

custos *versus* os benefícios por exemplo, da instalação de novos equipamentos ou de diferentes medicamentos (45,46).

Na avaliação económica existem diferentes tipos de análises, variando na sua metodologia e podem-se classificar como sendo avaliações parciais e avaliações completas. De um modo geral as avaliações completas fazem a comparação de duas ou mais alternativas, avaliando os custos e as consequências das alternativas em estudo, enquanto as avaliações parciais fazem geralmente apenas a avaliação de um parâmetro (custos ou consequências), podendo fazer a avaliação de uma alternativa ou de mais (41).

Os estudos de avaliação económica em saúde podem ser classificados em quatro tipos: análise de custos ou minimização de custos; análise de custo-efetividade; análise de custo-utilidade; análise de custo-benefício (41,45).

Na avaliação económica em saúde as três principais avaliações completas são a análise custo-efetividade, a custo-utilidade e a custo-benefício. Todas elas fazem a medição de custos em termos monetários, mas diferenciam-se através da medição das consequências.(41,45)

A análise de custos ou minimização de custos, foi uma das ferramentas utilizadas neste estudo para atingir os objetivos propostos e parte do pressuposto que as consequências do uso das diferentes alternativas em estudo são iguais e, por isso, só é necessário comparar os seus custos e não as consequências. Por isso, é considerada uma avaliação parcial e não completa (45). Neste estudo foi escolhida a análise de custos para a comparação entre os dois métodos de extração, precisamente porque ambos apresentam o mesmo produto final, o *RNA* viral extraído.

Foram estimados todos os custos necessários para a execução de ambas as técnicas de extração, tendo em consideração o número de amostras extraídas e a forma como cada método afeta os gastos com os consumíveis, a instrumentação e os kits.

2.3.2 Avaliação de custo com os Resíduos Laboratoriais

A análise de custos dos dois métodos em estudo incluiu ainda o estudo dos custos associados aos resíduos produzidos no laboratório.

A gestão e as boas práticas deste tipo de resíduos são fundamentais para prevenir riscos, como a proteção da saúde dos trabalhadores do setor, da população e do ambiente, uma incorreta gestão dos resíduos com risco biológico pode criar um importante problema ambiental e de saúde pública(47).

Os resíduos do laboratório são considerados resíduos hospitalares, pois são resultantes de atividades de diagnóstico onde são utilizadas amostras biológicas de humanos, como está descrito no Decreto-Lei nº 73/2011, de 17 de junho. (48) Os resíduos hospitalares são classificados em quatro grupos diferentes (Grupo I, Grupo II, Grupo III e Grupo IV), como está estabelecido no Despacho nº 242/96, publicado a 13 de agosto, cada um dos grupos tem a sua própria gestão de triagem, separação, acondicionamento, transporte, tratamento e eliminação. (47,48)

O grupo I e II são os resíduos equiparados a urbanos, estes não apresentam exigências especiais no seu tratamento, e estão incluídos todos os resíduos gerados na parte do laboratório onde não são processadas amostras, aqui os resíduos podem ser conservados no saco preto e ser descartado como lixo comum (resíduos urbanos) e pode-se fazer a reciclagem, por exemplo, de embalagens e invólucros comuns (caixas, papel e plástico). (47,49)

O grupo III, são os resíduos hospitalares de risco biológico, estão incluídos todos os resíduos contaminados ou suspeitos de contaminação, no caso do laboratório todos os materiais que tem contacto direto com as amostras biológicas, as próprias amostras biológicas e todos os EPIS (Equipamentos de Proteção Individual), como luvas, fatos, máscaras são tratados como resíduos do grupo III. Segundo a legislação em vigor, estes resíduos segundo a legislação em vigor são suscetíveis de incineração ou de outro pré-tratamento que elimine o risco biológico, permitindo posterior eliminação como resíduos urbanos (47,49). No caso do laboratório este grupo de resíduos é autoclavado e posteriormente é armazenado em sacos brancos dentro dos contentores, que são posteriormente recolhidos pela *Ambimed (Stericycle)*, para posterior tratamento e eliminação.

O grupo IV, são resíduos hospitalares específicos, no caso do laboratório em estudo todas as pontas utilizadas ao longo dos métodos de extração são descartadas para contentores corto-perfurantes, devido ao perigo de rasgarem os sacos, pondo em questão a segurança de todo o pessoal, segundo a legislação este tipo de resíduos são de incineração obrigatória (47,49). Depois de cheios os corto-perfurantes são isolados em sacos devidamente desinfetados e armazenados em contentores maiores para posterior recolha e tratamento pela empresa *Ambimed (Stericycle)*.

Neste estudo foi elaborada uma análise de custos com os diferentes tipos de resíduos associados aos dois métodos de extração. Foram estimados todos os custos inerentes aos resíduos para a execução de ambas as técnicas de extração, tendo em consideração o número de amostras extraídas.

2.3.3 Avaliação do espaço

O stock do laboratório de diagnóstico em estudo, é constituído por reagentes, kits e material, sendo ambos indispensáveis ao funcionamento deste e, por conseguinte, à satisfação dos objetivos do laboratório. A rotura de stock pode ser prejudicial para o funcionamento da organização, no entanto, verifica-se também que o excesso de stocks, de modo a evitar a rotura leva a que a empresa tenha empatado elevado capital, por isso, torna-se fundamental existir um equilíbrio e uma boa gestão de stocks que consiga satisfazer as necessidades inerentes ao bom funcionamento do laboratório(50).

De modo a compreender qual o método que permite fazer uma gestão de stock sem necessitar de tanto espaço, foram estimados os volumes dos kits e consumíveis dos dois métodos de extração em estudo para o mesmo número de reações.

2.3.4 Avaliação da complexidade dos métodos de extração

Neste estudo foi ainda avaliada a opinião dos técnicos de laboratório sobre a utilização dos dois métodos de extração em estudo, através de uma entrevista estruturada.

A entrevista é uma boa ferramenta utilizada na recolha de dados. O tipo de entrevista optada para esta recolha foi a entrevista estruturada. A entrevista estruturada decorre a partir de uma lista de perguntas, cuja ordem e redação é igual para todos os entrevistados (51). No caso da entrevista aplicada neste estudo foi constituída por 19 questões diferentes organizadas em cinco temas relacionados com a complexidade dos protocolos em estudo, com o risco de contaminação, com a preferência dos utilizadores, com a eficiência e com a qualidade.

3. Metodologia

Neste capítulo são descritas as diferentes variáveis do estudo e é descrito como foram recolhidos e analisados todos os dados do estudo.

3.1. Desenho e Local do Estudo

Trata-se de um estudo observacional retrospectivo onde foram utilizados dados recolhidos no laboratório de diagnóstico para COVID-19 do Centro Académico de Investigação e Formação Biomédica do Algarve (ABC), referente aos dois protocolos de extração de RNA viral em estudo: método manual através do *Kit CoV RNA* da marca *A&A Biotechnology* e método de extração automatizada, utilizando o kit *MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation* da marca *ThermoFisher* e o equipamento *KingFisher Flex System* da marca *Thermo Fisher*.

O estudo foi realizado nas instalações da Universidade do Algarve e do laboratório ABC, ambos situados no Campus de Gambelas (Faro).

3.2. Variáveis

As variáveis a incluir neste estudo foram: tempo de realização de cada um dos métodos de extração em estudo; custos associados a cada um dos métodos em estudo em relação a: consumíveis, instrumentação, kits e resíduos; utilização de espaços na gestão de stock e logística associada a cada um dos métodos; complexidade na execução dos dois protocolos.

O tratamento estatístico dos dados foi realizado com a ferramenta informática Microsoft Excel® versão 16.59. No tratamento estatístico dos dados relativos à variável “tempo” de realização de cada um dos métodos de extração em estudo também foi também utilizado o software IBM SPSS V26 e o software GraphPad Prism 9.3.1.

Tempo de realização de cada um dos métodos de extração: Para analisar esta variável, no protocolo do método de extração automático, foram cronometradas no total 42 extrações de placas, o que corresponde a uma amostra de 3277 amostras biológicas obtidas através de 8 operadores diferentes. No caso do protocolo para o método de extração manual, a amostra recolhida foi mais reduzida devido à pouca utilização deste método na rotina laboratorial. Foram cronometrados 6 ensaios, que

correspondem a 54 amostras extraídas por 3 operadores diferentes. De modo a facilitar a comparação dos dados entre os dois métodos de extração estudados, foram feitos cálculos teóricos de modo a obter os tempos de extração manual para 94 amostras.

Custos associados aos consumíveis e Instrumentação: Para a recolha de dados desta variável foram consultadas faturas dos diferentes fornecedores. Foi calculado o preço unitário de cada item em estudo e foi multiplicado pela quantidade consumida para ambos os métodos em estudo (foram incluídos os valores associados ao controlo negativo). Foram posteriormente contabilizados os custos de cada recurso na execução dos diferentes protocolos de extração em estudo: pontas, *Eppendorf's* e luvas, tendo em consideração cada etapa dos protocolos. A instrumentação inclui no método de extração manual centrífugas e suportes para *Eppendorf's*, no caso do método de extração automático inclui uma pipeta multicanal de 200 µl, uma pipeta multicanal eletrónica de 50-1200 µl e o equipamento *KingFisher Flex System* da *ThermoFisher*. Toda a instrumentação de uso comum nas duas técnicas em estudo não foi considerada (pipetas de 1000 µl, de 200 µl e de 10 µl, Vórtex, temporizadores, camaras de biossegurança).

Custos associados aos resíduos: Para a recolha de dados desta variável foram consultadas as faturas da empresa *Ambimed (Stericycle)* que faz a recolha, o tratamento e a eliminação dos resíduos. Na seleção dos dados recolhidos teve-se em consideração os resíduos do grupo III e IV, referente ao número de amostras extraídas em duas etapas temporais diferentes, nomeadamente, durante a realização exclusiva do método de extração manual e durante a realização exclusiva do método de extração automático.

Avaliação dos Espaços: O espaço necessário para armazenar os kits e os consumíveis dos métodos de extração em estudo foi tido em conta como variável. Foi considerado o espaço do material inerente aos dois métodos em estudo para o mesmo número de reações, escolheu-se o valor de 4000 reações (amostras e controlos). Os valores relativos aos espaços do material foram recolhidos no laboratório através de medições e posterior cálculo dos volumes. Os volumes foram calculados tendo em consideração as diferentes formas dos reagentes e consumíveis (Volume do Cilindro = $x \text{ raio}^2 \times \text{altura}$; Volume das caixas = altura x comprimento x largura).

Complexidade na execução dos dois métodos: A complexidade na execução dos dois métodos, foi avaliada através da recolha da opinião dos técnicos de saúde sobre a complexidade, o risco, a preferência pessoal, a eficiência e a qualidade associadas a cada um dos métodos em estudo. Para obter estes dados realizou-se uma entrevista estruturada, com 19 questões, aos 8 técnicos do laboratório em estudo. Estas questões foram colocadas aos técnicos de modo individual para não existir a influencia de grupo. (Apêndice 3)

3.3. Ética

Os dados relativos às amostras biológicas e às questões laboratoriais em estudo, foram anonimizados porque não houve acesso ao nome, morada ou outro tipo de informação que permita a identificação das amostras dos participantes; A privacidade e confidencialidade dos dados foi garantida uma vez que os dados foram tratados em bruto não permitindo através da sua análise a identificação de cada participante envolvido. Os dados foram recolhidos da base de dados do ABC e tratados no computador pessoal da discente proponente, durante o tempo necessário para realizar esta tese de dissertação de mestrado.

4. Resultados

Fez-se a recolha das variáveis em estudo (tempo de realização de cada um dos métodos de extração em estudo; custos associados a cada um dos métodos em estudo em relação a: consumíveis, instrumentação, kits e resíduos; utilização de espaços na gestão de stock e logística associada a cada um dos métodos; complexidade na execução dos dois protocolos) associadas aos dois métodos de extração em análise, o método manual e o método automático (Anexo 1 e 2), estes dados foram recolhidos no laboratório de diagnóstico para a COVID-19, do Centro Académico de Investigação e Formação Biomédica do Algarve (ABC), localizado na Universidade do Algarve, Campus Gambelas.

4.1 Tempo

Para a variável tempo de execução dos protocolos dos métodos de extração em estudo, foi criada uma tabela (Apêndice 1 - Tabela 9.1) para a recolha dos dados. Esta tabela foi colocada no laboratório em estudo e foi pedido aos colaboradores para cronometrarem os diferentes tempos de execução e anotarem na tabela. Os dados recolhidos através do preenchimento desta tabela, comuns aos dois métodos em análise foram: o operador que executou a técnica; o número de amostras extraídas; o tempo de pipetagem das amostras. No caso de executarem o método de extração automático foi pedido que anotassem também o tempo total do procedimento, desde a pipetagem das amostras até a placa ser colocado no equipamento; no caso do método de extração manual o tempo total de extração desde a pipetagem das amostras até à obtenção da eluição com o *RNA* extraído.

No método de extração automática foram cronometrados um total de 41 ensaios, o que correspondeu um total de 3277 amostras biológicas extraídas de 8 operadores diferentes (Tabela 4.1). Dos 41 ensaios, foram selecionados 20 ensaios de 94 amostras, o que corresponde a um total de 1880 amostras extraídas (Tabela 4.2). De seguida foi utilizado o Microsoft Excel® versão 16.59 e o software IBM SPSS V26, para o tratamento estatístico dos dados.

No caso do método manual foram cronometrados 6 ensaios, que correspondem a 54 amostras extraídas por 3 operadores diferentes (Tabela 4.3). De modo a facilitar a comparação dos dados entre os dois métodos de extração estudados, foram feitos

cálculos teóricos de modo a obter os tempos de extração manual para 94 amostras (Tabela 4.4).

Para a análise da variável tempo de execução da extração, para os dois métodos, foram considerados três tempos diferentes: T1, que corresponde ao tempo de pipetagem das amostras; T2, que corresponde ao tempo total de extração, isto é, o tempo desde o início do processamento das amostras até à obtenção do produto final, neste caso eluição do *RNA* viral; T3, que corresponde ao somatório dos tempos intermédios entre as diferentes passos não considerados nos protocolos e portanto não descritos nos mesmos (tempos de pipetagem de reagentes, colocar e tirar as colunas e *Eppendorf's* das centrifugas, abrir e fechar tubos e tempo de vortexar amostras com reagentes entre passos).

Relativamente ao método automático na variável do tempo (T1, T2 e T3) para os 20 ensaios, correspondente a 1880 amostras extraídas, a média obtida foi de 28,3 minutos (+/- 0,9 minutos) para o T1, 68,5 minutos (+/- 1,1 minutos) para o T2 e 2,4 minutos (+/- 0,3 minutos) para o T3. (Tabela 4.2 e Figura 4.1)

No método manual a variável do tempo (T1, T2 e T3) para os 6 ensaios, correspondente a 54 amostras extraídas, apresentou a média de 3,7 minutos (+/- 2,7 minutos) para o T1, 49,7 minutos para o T2 e 24 minutos para o T3 (Tabela 4.3). Tendo em consideração que nos dados analisados para o método automático, cada ensaio incluía a extração a 94 amostras e no caso do método manual variou entre 6 e 15 amostras, converteram-se os valores obtidos de cada ensaio para 94 amostras através da multiplicação de 94 pelo tempo a ser convertido (T1, T2 e T3) e posteriormente fez-se a divisão pelo número de amostras extraídas no ensaio. Depois, foram novamente calculadas as médias de T1, T2 e T3 para o método de extração manual. Para o T1 a média foi de 38,9 minutos, para o T2 a média foi de 576,7 minutos (9 horas e 28 minutos) e para o T3 a média foi de 309,6 minutos (5 horas e 10 minutos). (Tabela 4.4 e Figura 4.1)

Considerando as 94 amostras, verifica-se que em geral, o método manual apresenta maior tempo de execução do que o método automático. (Figura 4.1)

Tabela 4.1. “Tempos” recolhidos para o método de extração automático, em minutos.

Operador	Nº de Amostras	T1	T2	T3
1	94	36	76	2
2	38	10	50	2
3	81	27	68	3
2	94	24	64	2
5	94	30	71	3
4	68	18	57	1
6	68	32	72	2
3	94	29	71	4
4	53	15	55	2
3	94	30	72	4
7	79	23	64	3
2	67	19	59	2
3	94	28	68	2
3	94	30	71	3
7	73	22	70	10
2	94	36	76	2
3	94	34	78	6
2	64	18	60	4
2	65	16	57	3
8	64	23	63	2
4	61	15	54	1
4	94	24	63	1
5	94	28	67	1
7	86	22	62	2
4	86	21	61	2
5	65	19	66	9
3	94	28	69	3
8	40	16	55	1
2	67	18	57	1
5	67	21	67	8
4	92	24	64	2
3	5	2	40	1
5	94	28	66	2
2	94	26	64	1
4	94	25	63	2
8	94	31	71	2
2	34	9	49	2
4	94	30	70	2
5	74	21	63	4
4	94	24	64	2
2	94	21	61	2
2	94	24	64	2
Total/Média	3277	23,26	63,86	2,74

Tabela 4.2. “Tempos” selecionados do método de extração automática (20 ensaios selecionados com 94 amostras) em minutos

Operador	Nº de Amostras	T1	T2	T3
1	94	36	76	2
2	94	24	64	2
5	94	30	71	3
3	94	29	71	4
3	94	30	72	4
3	94	28	68	2
3	94	30	71	3
2	94	36	76	2
3	94	34	78	6
4	94	24	63	1
5	94	28	67	1
3	94	28	69	3
5	94	28	66	2
2	94	26	64	1
4	94	25	63	2
8	94	31	71	2
4	94	30	70	2
4	94	24	64	2
2	94	21	61	2
2	94	24	64	2
Total/Média	1880	28,3 ± 0,9	68,45 ± 1,08	2,4 ± 0,27

Tabela 4.3. “Tempos” recolhidos para o método de extração manual, em minutos

Operador	Nº de Amostras	T1	T2	T3
4	15	5	50	26
3	5	2	48	27
4	8	3	48	26
4	8	3	45	23
4	6	3	40	18
1	12	6	67	42
Total/Média	54	3,67	49,67	24

Tabela 4.4. “Tempos” para o método de extração automático, obtidos através de cálculos teóricos para 94 amostras extraídas (em minutos)

Operador	T1	T2	T3
4	31,33	313,33	162,93
3	37,6	902,4	507,6
4	35,25	564	305,5
4	35,25	528,75	270,25
4	47	626,67	282
1	47	524,83	329
Total/Média	38,91 ± 2,69	576,66 ± 78,12	309,55 ± 45,98

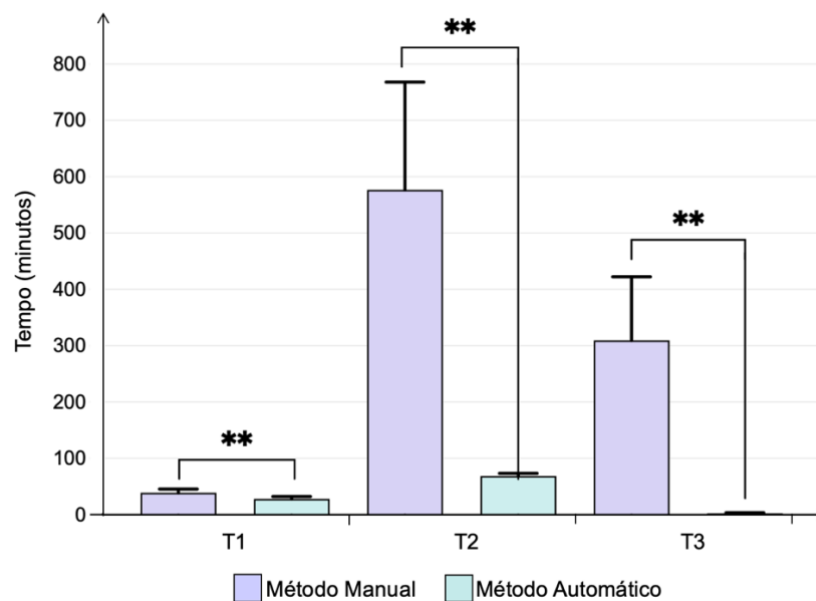


Figura 4.1: Quantificação das médias da variável “tempo” nos métodos de extração manual e automático.

Método Manual: T1: Tempo de pipetagem – 38,9 +/- 2,7 minutos; T2: Tempo total da extração – 576,7 +/- 78,1 minutos; T3: Somatório dos tempos intermédios- 309,6 +/- 46 minutos. Método Automático: T1: Tempo de pipetagem – 28,3 +/- 0,9 minutos; T2: Tempo total da extração – 68,5 +/- 1,1 minutos; T3: Somatório dos tempos intermédios- 2,4 +/- 0,3 minutos. Teste T para: T1, Pvalue = 0,009; T2 Pvalue = 0,001; T3 Pvalue = 0,001.

Depois de calcular as médias relativas à variável “tempo” para ambos os métodos, realizou-se o Teste-T (T-Student) para variáveis independentes utilizando o software SPSS. Com esta análise pretendeu-se comparar as médias e compreender se existe uma diferença significativa entre as médias da variável tempo dos métodos em estudo. Foi considerada a existência de uma diferença significativa entre as médias para $p \leq 0,05$.

Tabela 4.5. Valores de Significância da variável tempo (T1, T2 e T3)

Tempo	P (Sig. Teste – T)
T1	0,009
T2	0,001
T3	0,001

Verifica-se a existência de uma diferença significativa para T1, T2 e T3 entre o método manual e automático (Tabela 4.5).

4.2. Custos dos Consumíveis e Instrumentação

Para a recolha de dados da variável custos foram consultadas faturas dos diferentes fornecedores. Para a apresentação dos resultados, dividiram-se os custos em duas categorias diferentes, os consumíveis e a instrumentação.

A categoria dos consumíveis, inclui todo o material que é utilizado e de seguida é descartado, como o caso das pontas, dos *Eppendorf's* e das luvas, também se incluiu neste grupo os kits dos métodos de extração em estudo. O kit utilizado na extração manual é o kit CoV RNA da marca *A&A Biotechnology* e na extração automática é o kit *MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation* da marca *ThermoFisher*.

Tal como nas análises de custos, depois da informação recolhida foi calculado o preço unitário de cada material em estudo e foi multiplicado pela quantidade consumida do recurso para se obter o custo total, em ambos os protocolos foram incluídos os valores associados ao controlo negativo.

Para a obtenção do valor da quantidade consumida dos diferentes recursos em estudo (consumíveis e instrumentação), foi contabilizado quanto é que se gastava de cada recurso na execução dos diferentes protocolos de extração em estudo. Foram contabilizadas todas as pontas e *Eppendorf's* necessários, para o processamento de uma amostra e de 94 amostras. As luvas foram contabilizadas tendo em consideração cada

etapa dos protocolos em que os operadores trocam de luvas para evitar possíveis contaminações.

Nos dados recolhidos sobre os custos dos consumíveis observou-se que para a extração de uma amostra, para método manual, contando com o controlo negativo, gasta-se 1,04€ em pontas, 3,00€ no kit, 0,08€ em *Eppendorf's* e 1,20€ em luvas, o que corresponde a um total de 5,32€. Para o método de extração automático para uma amostra, contando com o controlo negativo, gasta-se 1,03 € em pontas, 29,63€ no kit, 0,02€ em *Eppendorf's* e 0,96€ em luvas, o que corresponde a um total de 31,64€. (Tabela 4.6 e Apêndice 2- Figura 9.1)

Quando analisamos os mesmos dados dos custos dos consumíveis, mas para uma extração com 94 amostras, observou-se que para o método manual gastou-se 30,94€ em pontas, 142,50 € no kit, 3,80€ em *Eppendorf's* e 7,68€ em luvas, o que corresponde a um total de 184,92€. Para o método de extração automático para 94 amostras, contando com o controlo negativo, gasta-se 26,28€ em pontas, 159,83€ no kit, 0,02€ em *Eppendorf's* e 1,44 € em luvas, o que corresponde a um total de 187,59€. (Figura 4.2 e Tabela 4.6)

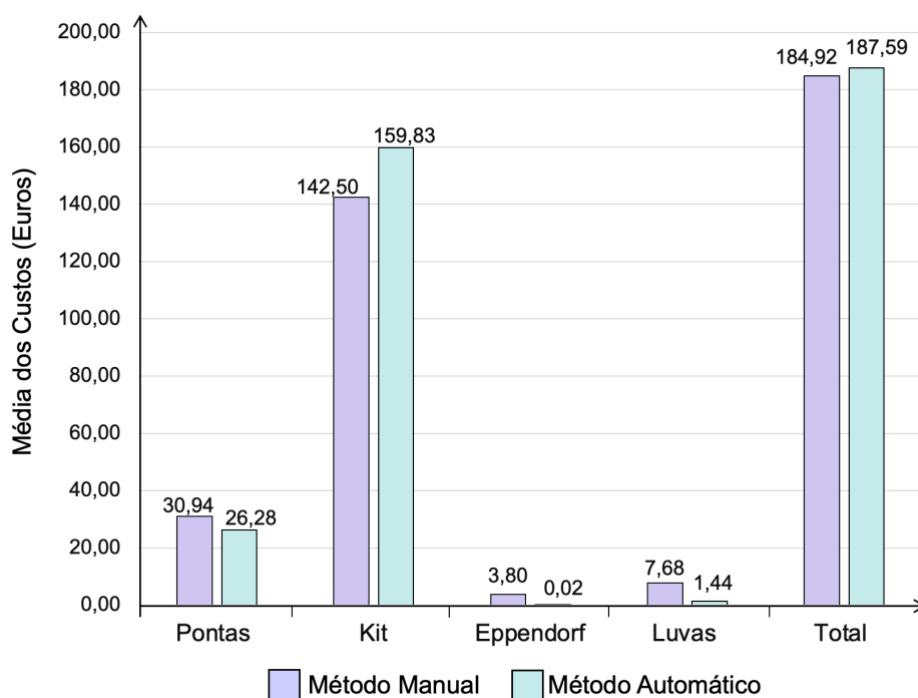


Figura 4.2: Comparação da média dos custos dos consumíveis entre os métodos de extração manual e automático. Os cálculos foram efetuados por 94 amostras extraídas.

Método Manual: Pontas – 30,94€; Kit – 142,50€; *Eppendorf's* – 3,80€; Luvas – 7,68€; Total – 184,92€.

Método Automático: Pontas – 26,28€; Kit – 159,83€; *Eppendorf's* – 0,02€; Luvas – 1,44€; Total -187,59€.

Tabela 4.6. Custos médios dos consumíveis em euros

		Método Manual				Método Automático				
		Para a extração de uma amostra		Para a extração de 94 amostras		Para a extração de uma amostra		Para a extração de 94 amostras		
Consumíveis	Material	Preço unitário (€)	Consumo	Custo Total	Consumo	Custo Total	Consumo	Custo Total	Consumo	Custo Total
	Pontas 1000 µl	0,084	9	0,756	210	17,640	2	0,168	97	8,148
	Pontas 1000 µl Socorex	0,166	0	0,000	0	0,000	3	0,498	24	3,984
	Pontas 200 µl	0,065	2	0,130	95	6,175	1	0,065	13	0,845
	Pontas 20 µl	0,070	0	0,000	0	0,000	0	0	190	13,3
	Pontas 10 µl	0,075	2	0,150	95	7,125	4	0,3	0	0
	Custo Total Pontas	-	-	1,036	-	30,940	-	1,03 €	-	26,28 €
	Eppendorf's	0,020	4	0,080	190	3,800	1	0,02	2	0,04
	Luvax	0,120	10	1,200	64	7,680	8	0,96	12	1,44
	Kit Manual	1,500	2	2,800	95	133,000	0	0	0	0
	Kit Automático (Reagentes)	1,400	0	0,000	0	0,000	2	2,8	95	133
	Kit Automático (Plásticos + Película)	26,820	0	0,000	0	0,000	1	26,83	1	26,83
	Total Kit automático	0,000	0	0,000	0	0,000	-	29,63	-	159,83
	Total	-	-	5,116 €	-	175,420 €	-	31,64 €	-	187,59 €

Na categoria relativa aos custos com a instrumentação, foram incluídos os instrumentos necessários para a execução das técnicas de extração em estudo. No caso do método de extração manual nesta categoria foram incluídas as centrifugas e os suportes para *Eppendorf's*. No método de extração automático foi incluído a pipeta multicanal de 200 µl, a pipeta multicanal eletrónica de 50-1200 µl e o equipamento KingFisher Flex System da ThermoFisher. Toda a instrumentação de uso comum nas duas técnicas em estudo não foi considerada (pipetas de 1000 µl, de 200 µl e de 10 µl, Vórtex, temporizadores, camaras de biossegurança).

Na categoria da instrumentação, nos dados recolhidos observou-se no método automático um custo total de 55 361,00€ (o equipamento KingFisher Flex System da ThermoFisher no valor de 54 496,00€, a pipeta multicanal de 200 µl no valor de 265,00€ e a pipeta multicanal eletrónica de 50-1200 µl no valor de 600,00€), no caso da extração manual observou-se um custo total de 3297,80€ (três centrifugas no valor de 3 225,00€ e 16 suportes de *Eppendorf*, no valor de 72,80€) (Figura 4.3 e Apêndice 2 - Tabela 9.2).

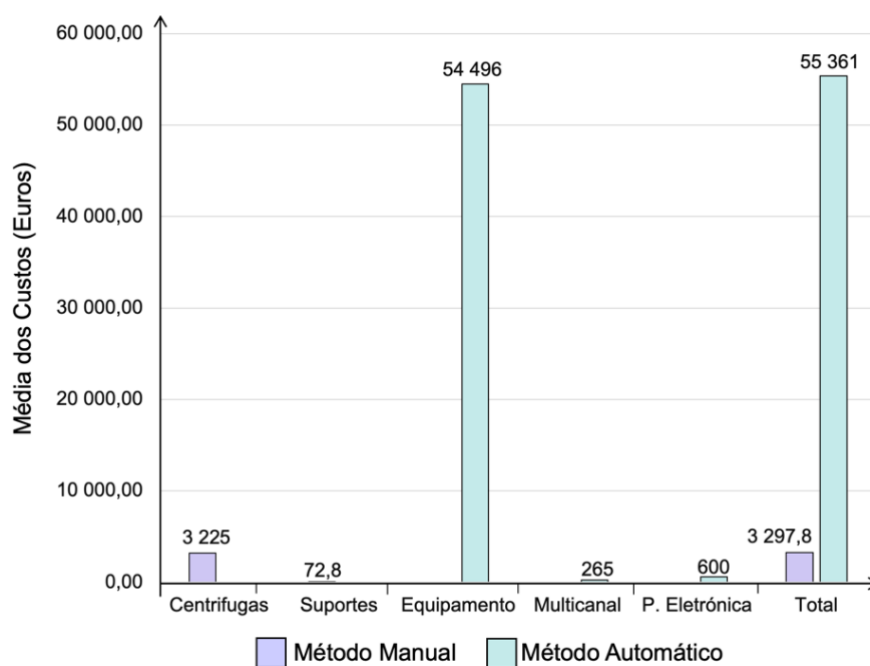


Figura 4.3: Comparação da média dos custos da instrumentação entre os métodos de extração manual e automático. Método Manual: Centrifugas – 3 225,00€; Suportes – 72,80; Total – 3 297,80€. Método Automático: Equipamento – 54 496,00€; Pipeta Multicanal 200 µl – 265,00€; Pipeta Multicanal Eletrónica (50 - 1200 µl) - 600,00€; Total - 55 361€.

Em relação aos custos associados aos consumíveis, verifica-se que o método de extração manual apresenta mais custos associados ao consumo de pontas, *Eppendorf's* e luvas quando comparado com o método automático. No caso dos custos associados especificamente ao Kit, verifica-se que o custo do kit do método automático é superior ao do método de extração manual. Relativamente aos custos associados à instrumentação verifica-se que o método automático tem custos superiores (Figura 4.4)

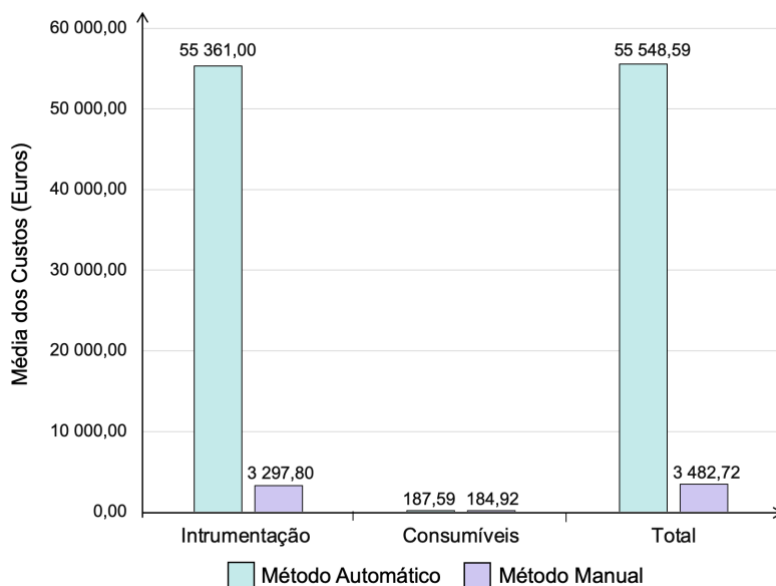


Figura 4.4: Comparação da média dos custos dos consumíveis e da instrumentação entre os métodos de extração manual e automático. Método Automático: Instrumentação – 55 361€; Consumíveis – 187,59€; Total – 55 548,59€. Método Manual: Instrumentação – 3 297,80€; Consumíveis – 184,92€; Total – 3 482,72€.

4.3. Custos com Resíduos

Para a recolha de dados da variável custo com os resíduos foram consultadas faturas da empresa Ambimed que faz a recolha dos resíduos e foi consultado. Na seleção dos dados recolhidos teve-se em consideração os resíduos do grupo III (contentor verde) e IV (contentor preto), referente ao número de amostras extraídas em duas etapas temporais diferentes, nomeadamente, durante a realização exclusiva do método de extração manual e durante a realização exclusiva do método de extração automático.

Tabela 4.7. Custos com resíduos

Resíduos	Custo	Método Manual		Método Automático	
		Número de contentores utilizados (n=3224)	Custo dos contentores (n=3224)	Número de contentores utilizados (n=3176)	Custo dos contentores (n=3176)
Contentores Verdes	14,70€	15	220,50€	13	191,10€
Contentores Pretos	34,16€	4	136,64€	2	68,32€
Corto-perfurantes	14,40€	12	172,80€	6	86,40€

Nos dados recolhidos sobre os resíduos observou-se que para um número de 3224 amostras extraídas pelo método manual gastaram-se 15 contentores verdes o que corresponde a 220,50€, 4 contentores pretos, no valor de 136,64€ e 12 corto-perfurantes, no valor de 172,80€, o que corresponde a um custo total de 529,94€. Em 3176 amostras extraídas pelo método automático verificou-se o consumo de 13 contentores verdes, no valor de 191,10€, 2 contentores pretos, no valor de 68,32€ e 6 corto-perfurantes, no valor de 86,40€, o que corresponde a um custo total de 345,82€.

Estes custos foram calculados tendo em consideração que cada contentor verde custa 14,70€, os contentores pretos 34,16€ e os corto-perfurantes 14,40€. (Tabela 4.7)

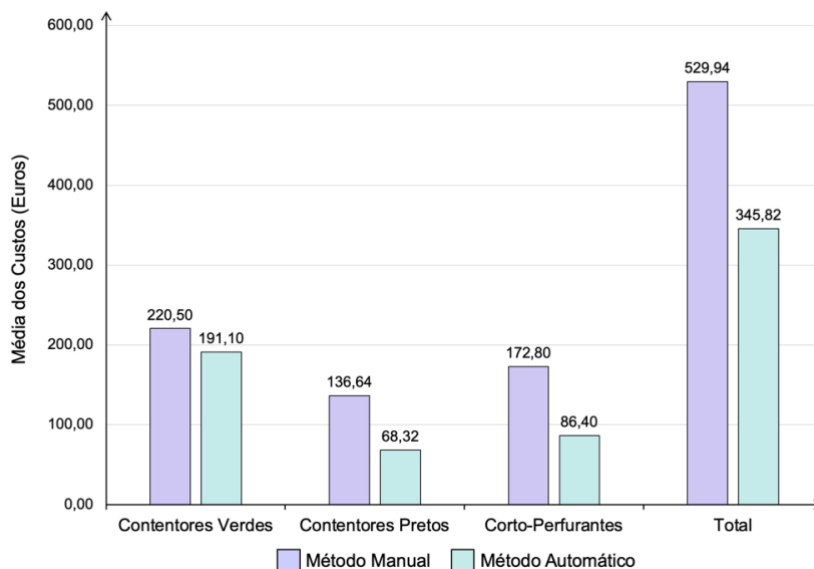


Figura 4.5: Comparação da média dos custos dos resíduos entre os métodos de extração manual e automático. Método Manual: Contentores verdes – 220,50€; Contentores pretos – 136,64€; Corto-perfurantes – 172,80€; Total -529,94€. Método Automático: Contentores verdes – 191,10€; Contentores pretos – 68,32€; Corto-perfurantes – 86,40€; Total – 345,82€.

Em relação aos custos associados aos resíduos, verifica-se que na generalidade o método manual apresenta maiores custos quando comparado com o método automático, principalmente ao nível dos contentores pretos e corto-perfurantes. (Figura 4.5)

4.4. Avaliação dos espaços ocupados

Foi avaliado o espaço necessário para armazenar os kits e os consumíveis dos métodos de extração em estudo, de modo a compreender qual o método que apresenta maior rentabilidade dos espaços ocupados, para o processamento do mesmo número de amostras. O espaço ocupado necessário para os dois métodos foi considerado para o mesmo número de reações (4000 reações, amostras e controlos).

O kit de extração manual, é constituído por uma caixa que inclui, os reagentes, as microcoluna e os tubos coletores. Cada caixa deste kit dá para cerca de 200 reações e tem um volume de 9661 cm³. Para as 4000 reações, são necessárias 20 caixas deste kit, o que corresponde a um espaço utilizado de armazenamento de 193 220 cm³. (Figura 4.6)

O kit da extração automática divide-se em reagentes e nos plásticos. Para 4000 reações, é necessário o armazenamento dos seguintes reagentes: duas garrafas de Binding Solution de 550ml (2671,92 cm³), uma garrafa de 2 litros de Wash Solution (3146 cm³), duas garrafas de 1litro Etanol a 80% (3402 cm³), duas garrafas de Elution Buffer de 100 ml (318,08 cm³), duas garrafas de Binding Beads de 20 ml (84,82 cm³) e duas garrafas de Proteinase K de 10 ml (54 cm³). O que perfaz um total de espaço ocupado por reagentes de 9676,82 cm³. Para 4000 reações, é necessário o armazenamento dos seguintes plásticos: 172 Deepwell 96 Plate, o que corresponde ao armazenamento de 4 caixas com 50 placas cada (122 760 cm³); 43 Tip comb, que corresponde ao armazenamento de 5 caixas com 10 Tip comb cada (19 890 cm³); 43 Tip Comb Plate, o que corresponde ao armazenamento de 1 uma caixa com 48 Tip Comb Plate (13 072 cm³). O que perfaz um total de espaço ocupado por plásticos de 155 722 cm³. No total são necessários 165 398,82 cm³ para armazenar o kit do método automático para 4000 reações. (Figura 4.6)

Para 4000 reações com o método manual, é necessário o armazenamento dos seguintes consumíveis: 28 caixas de luvas (64 313,2 cm³); 17 sacos de *Eppendorf's* (49 572 cm³); 93 caixas com 96 pontas de 1000 µl (126 340,5 cm³); 43 caixas com 96 pontas de 200 µl (35 049,3 cm³); 43 caixas com 96 pontas de 10 µl (35 049,3 cm³). O que perfaz um total de espaço ocupado por consumíveis de 310 324,3 cm³. (Figura 4.6)

Para 4000 reações com o método automático, é necessário o armazenamento dos seguintes consumíveis: 6 caixas de luvas (13 781,4 cm³); 1 saco de *Eppendorf's* (2 916 cm³); 54 caixas com 96 pontas de 1000 µl (73 359 cm³); 6 caixas com 96 pontas de 200 µl (4 890,6 cm³); 85 caixas com 96 pontas de 20 µl (69 283,5 cm³). O que perfaz um total de espaço ocupado por consumíveis de 164 230,5 cm³. (Figura 4.6)

Para a apresentação dos valores na figura 4.6, foi utilizado o fator de divisão 100, para facilitar a observação dos resultados.

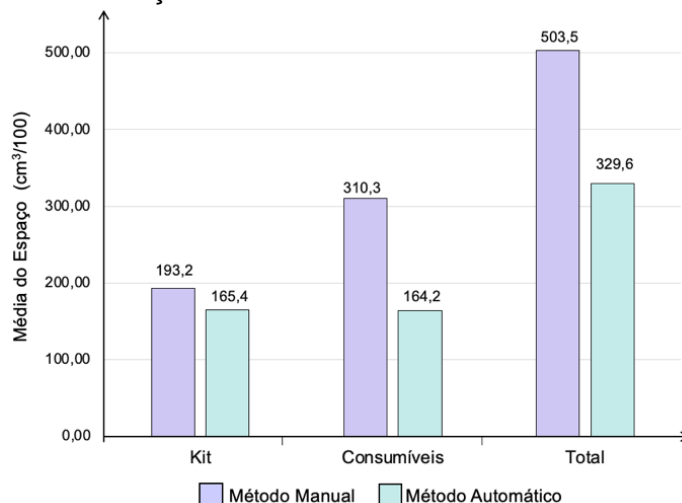


Figura 4.6: Comparação da média do espaço ocupado dos kits e consumíveis entre os métodos de extração manual e automático. Os cálculos foram efetuados por 4000 reações. Método Manual: Kit – 193,2 (193 220 cm³); Consumíveis (pontas, *eppendorf's* e luvas) – 310,3 (310 324,3 cm³); Total – 503,5 (503 544,3 cm³) Método Automático: Kit (reagentes e plásticos) – 165,4 (165 398,8 cm³); Consumíveis (pontas, *eppendorf's* e luvas) – 164,2 (164 230,5 cm³); Total – 329,6 (329 629,3 cm³).

4.5. Opinião dos Técnicos de Saúde sobre os dois métodos de extração em estudo através de entrevista estruturada

De modo a conhecer a opinião dos técnicos de saúde sobre a complexidade, o risco, a preferência pessoal, a eficiência e a qualidade associadas a cada um dos métodos em estudo, realizou-se uma entrevista estruturada aos 8 técnicos do laboratório em estudo.

Esta entrevista foi constituída por 19 questões, organizadas em cinco grupos que abordavam diferentes aspetos sobre os dois métodos de extração em estudo, incluindo perguntas sobre a complexidade na execução dos métodos, os possíveis riscos de contaminação, qual o método de preferência para a execução da extração, qual a opinião sobre a qualidade dos dois métodos e qual a opinião sobre a eficiência em

termos de fluxo de trabalho dos dois métodos em comparação. Estas questões foram colocadas aos técnicos de modo individual para não existir a influencia de grupo.

Complexidade dos Protocolos

Foi questionado aos técnicos sobre qual dos métodos em estudo requer maior motricidade fina (destreza e precisão manual). Verificou-se que 100% dos entrevistados referiram que o método de extração manual requer maior motricidade fina em comparação com o método de extração automática.

No que toca à comparação entre os dois métodos de extração no número de pipetagens, observou-se que 50% dos técnicos acham que o protocolo de extração manual A&A é mais difícil de realizar do que o protocolo de extração automática da Thermo, e os outros 50% dos técnicos demonstrou não ter uma opinião definida sobre esta questão.

Na última questão onde foi abordada diretamente a complexidade dos protocolos, 87,5% dos entrevistados acham que o método de extração manual é mais complexo do que, o método de extração automático e 12,5% demonstrou não ter uma opinião definida sobre esta questão.

Risco de Contaminação

No que diz respeito ao risco de possíveis contaminações foi questionado se o método de extração manual tem maior probabilidade de ocorrência de contaminações entre amostras, em comparação com o método de extração automática. Verificou-se que 100% dos entrevistados concordaram com esta questão e afirmaram que existe maior risco de contaminação no método manual.

Foi a abordada a questão sobre os riscos de segurança para o operador na realização dos protocolos em estudo, onde 62,5% dos técnicos acham que o método de extração manual apresenta maiores riscos de segurança para o operador em comparação com o método de extração automático e 37,5% demonstraram não ter uma opinião perante esta questão.

Preferência da técnica

Foi colocada uma questão sobre a preferência da realização do protocolo manual no caso de ser necessário processar apenas 10 amostras. Observou-se que 62,5% dos entrevistados preferem utilizar o método manual para extrair apenas 10

amostras, 12,5% afirmou preferir o método automático e 25% mostrou não ter opinião sobre utilizar uma técnica ou outra, para um número reduzido de amostras.

Posteriormente, foram colocadas duas questões semelhantes à anterior onde se questionou a preferência da utilização do método manual para a extração de 50 e 94 amostras. Verificou-se que 100% dos técnicos, em ambas as questões, demonstraram preferir o método automático ao manual para extrair 50 ou 94 amostras.

No que diz respeito à motivação dos operadores na execução da técnica, 62,5% dos técnicos sentem-se mais desmotivados quando tem que realizar o protocolo manual em comparação com o protocolo automático, 25% mostraram-se indiferentes perante esta questão e 12,5% não se sentem mais desmotivado no método manual a comparar com o automático.

Foi questionado aos técnicos se achavam que demoram mais tempo a realizar o protocolo do método de extração manual do que no método automatizado e 100% dos entrevistados afirmaram que sim, que sentiam que demoravam mais tempo a processar amostras com o método manual do que com o método automático.

Foram colocadas três questões relacionadas com a dificuldade de realização dos métodos de extração em estudo e sobre a aprendizagem. Observou-se que 75% dos técnicos afirmaram que sentiram mais dificuldade a aprender a técnica de extração manual do que a técnica de extração automática, 12,5% afirmaram que não sentiram maior dificuldade em aprender a técnica manual quando comparado com a aprendizagem da técnica automática; e 12,5% dos entrevistados não demonstraram ter opinião sobre estas questões.

Quando foram questionados sobre sentir mais dificuldade a realizar o protocolo de extração manual do que o método automático, pela primeira vez e nas primeiras 5 a 10 vezes, 87,5% dos entrevistados concordou que sentiram mais dificuldade a realizar o protocolo de extração manual do que o método automático, pela primeira vez e nas primeiras 5 a 10 vezes; e 12,5% não tiveram opinião sobre estas questões.

Foi questionado aos técnicos se em termos ergonómicos (durante a sua realização dos métodos) achavam que o método manual é mais confortável do que o método automatizado e 87,5% dos técnicos acham que o método automatizado é mais ergonómico enquanto 12,5% não ter opinião sobre este assunto.

Qualidade

Foi questionado aos técnicos se sentiam mais confiantes em relação à qualidade dos resultados obtidos pelo método de extração manual quando comparado com o

método automático, 62,5 % dos técnicos demonstrou-se indiferente, referindo que se sentem confiantes em ambos os métodos, 25% sente-se mais confiante com os resultados obtidos no método automatizado e 12,5% mais confiantes com o método manual.

Eficiência

Em relação à avaliação da eficiência, verificou-se que 100% dos entrevistados acham que, no caso de existir um aumento súbito de amostras para serem processadas, o método de extração manual não consegue dar resposta e terá que haver tempo laboral extraordinário, enquanto o método automático consegue dar resposta sem ter que haver tempo laboral extraordinário.

Relativamente à organização de equipas, fluxo de trabalho, preparação de material e comunicação entre as equipas de operadores, 100% dos técnicos acha que a eficiência do fluxo de trabalho relativamente a estes aspetos é mais fácil de obter no método de extração automático do que no método de extração manual.

4.5. Limitações

Devido ao pouco uso do método de extração manual na rotina laboratorial no local em estudo, o número de dados recolhidos para a variável “tempo” foi reduzido (54 amostras), quando comparado com o método de extração automático (3277 amostras, das quais se selecionaram 1880 amostras).

A entrevista estruturada foi aplicada a 8 técnicos do laboratório, se tivesse sido aplicada a mais pessoas, penso que os resultados poderiam ser mais representativos. No entanto é difícil encontrar mais técnicos que pudessem participar na entrevista, visto que, mesmo a nível nacional são poucas as instituições que utilizaram ou utilizam ambos os métodos de extração (manual e o automático). Se o número de entrevistados tivesse sido superior, penso que os resultados poderiam ser mais representativos.

Uma das maiores dificuldades e limitações que senti foi encontrar estudos no mesmo âmbito deste que pudessem fundamentar os resultados obtidos.

5. Discussão dos resultados

Para o estudo dos indicadores de gestão laboratorial associados aos métodos de extração de *RNA*, automatizados e manuais, na detecção de SARS-CoV-2 em exsudados nasofaríngeos, foram analisados dados de 5 variáveis: tempo de realização de cada um dos métodos de extração em estudo; custos associados a cada um dos métodos em estudo em relação a: consumíveis, instrumentação, kits e resíduos; utilização de espaços na gestão de stock e logística associada a cada um dos métodos; complexidade na execução dos dois protocolos.

Para as variáveis tempo e custos associados aos consumíveis, foi escolhido o *n* de 94 amostras, devido ao facto das placas multipoços utilizadas no método de extração automática serem compostas por 94 poços com amostras biológicas em cada corrida de extração completa. Os dados recolhidos relativos ao método de extração manual compreenderam um menor número de amostras sendo posteriormente calculado o valor teórico para 94 amostras, de modo a permitir a comparação entre os dois métodos.

Tempo

Analisando os resultados obtidos na variável tempo de execução dos protocolos dos dois métodos de extração em estudo, verificou-se que o método de extração manual apresentou valores superiores ao método de extração automático nos três tempos estudados (T1 - tempo de pipetagem, T2 - tempo total da extração e o T3 - Somatório dos tempos intermédios). O T1 para 94 amostras, é semelhante em ambos os métodos, a diferença foi de 10,6 minutos a mais no método manual. Esta diferença pode ser justificada pelo facto de que, no método manual, de cada vez que se pipeta uma amostra é necessário abrir o Eppendorf e de seguida fechar, enquanto no método automático é apenas necessário pipetar a amostra diretamente para a placa de multipoços.

No T2 e no T3 para a extração de 94 amostras, verificou-se uma diferença entre o método manual e o método automático de 508,2 min (8 horas e 28 min) e de 307,2 min (5h e 7min), respetivamente. Estas diferenças entre ambos os métodos de extração podem ser justificadas através da observação dos protocolos de ambos os métodos, onde se pode verificar que no método manual são necessários mais passos de pipetagem de diferentes reagentes e centrifugações (21 passos); bem como em cada pipetagem é necessário abrir e fechar as minicolunas, correspondente a cada amostra (Anexo 1 e 2). No caso dos tempos estimados relativos ao método de extração manual deve-se ter em consideração que forem feitos cálculos teóricos, na prática é muito difícil

apenas um operador fazer a extração de 94 amostras, normalmente este método é apenas utilizado quando existe um menor volume de amostras para processar.

Antes de se adquirir o método automático no laboratório, utilizava-se o kit CoV RNA da marca A&A Biotechnology (extração manual). Quando existia um grande volume de amostras era necessário um operador (responsável por pipetar as amostras e os reagentes) e um assistente (que era responsável pela preparação de todo o material necessário à realização do protocolo: identificação *Eppendorf's* e minicolunas e a realização das centrifugações), cada par de técnicos (operador e assistente) extraía apenas 48 amostras de uma só vez, sendo inexecutável a extração de 94 amostras de uma só vez, por cada par.

Para verificar se as diferenças entre os diferentes tempos considerados (T1 - tempo de pipetagem, T2 - tempo total da extração e o T3 - Somatório dos tempos intermédios) eram significativas na rotina laboratorial, aplicou-se o Teste-T, no software IBM SPSS V26 e no software GraphPad Prism 9.3.1. Verificou-se que o método de extração automático é significativamente mais rápido do que o método de extração manual.

É importante ainda referir também que no método manual só podemos começar a extrair um novo set de amostras quando se termina por completo a extração do set de amostras anteriores. No caso do método de extração automático, assim que se finalizam os passos iniciais de um set de amostras, coloca-se a placa multipoços no equipamento e pode-se começar a extrair em seguida um novo set de amostras, poupando-se 23 minutos.

Os resultados obtidos para esta variável foram concordantes com os resultados obtidos por Dundas e colegas em 2008, onde foram comparados dois tipos de métodos de extração automáticos e um tipo de método de extração manual (52).

Custos Consumíveis e Instrumentação

Na variável sobre os custos, na categoria dos consumíveis verificou-se um custo superior no método manual no consumo de pontas, *Eppendorf's* e de luvas em comparação com o método automático, tanto na extração de uma amostra como na extração de 94 amostras. Este consumo superior de pontas no método de extração manual pode ser justificado pelo facto de ser necessário a pipetagem de mais reagentes.

No caso dos *Eppendorf's*, no método de extração manual, por cada amostra extraída são necessários dois *Eppendorf's* (um para pipetar a amostra com o primeiro reagente e um para o último passo: eluição), enquanto no método de extração

automático (para 1 amostra ou 94 amostras), apenas é necessária a utilização de um Eppendorf para fazer a mix de MS2 com Proteinase K (passo 3 do Anexo 2). Pelo que se verifica um valor de 3,78euros de diferença entre os dois métodos, sendo o método automático o mais rentável.

No caso das luvas, no método de extração manual existem mais passos suscetíveis de contaminação quando comparado com o método de extração automático: abertura dos Ependorf's, das minicolunas, retirada das minicolunas da centrífuga e troca dos tubos coletores. Na execução destes passos existe a possibilidade de saltarem gotas potencialmente contaminadas para as luvas e neste caso, o operador deve trocar de luvas. Assim, era de esperar que seja consumido um maior número de luvas no método manual em comparação com o método automático.

Relativamente aos custos dos kits, o método de extração automático apresenta um valor superior tanto para a extração de uma amostra como para 94 amostras. Para uma amostra o kit do método de extração automático é 26,63€ mais caro do que o kit de extração manual, no entanto para 94 amostras extraídas a diferença é de 17,33€.

Esta diferença está relacionada com a constituição do kit de extração automático, pois o kit *MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation* da marca *ThermoFisher*, é constituído por reagentes (1,40€ por reação), por plásticos (26,03€) e pela película adesiva (0,80€) que é utilizada no final para vedar a placa com a eluição. Isto significa que, quer se processe 1 ou 94 amostras os custos associados aos plásticos e à película são os mesmos, pois cada conjunto de plásticos dá para a extração de 1 a 94 amostras.

Na variável custos associados à instrumentação, verificou-se que o método de extração automático tem valores superiores aos custos do método de extração manual. Estes custos são fixos e independentes do número de amostras extraídas, pois quer se faça a extração de 1 ou 1000 amostras os instrumentos existem no laboratório, por isso, ao longo do tempo têm que se considerar que este valor é superado pelo lucro.

Os resultados obtidos para esta variável foram concordantes com os resultados obtidos por Dundas e colegas em 2008, onde foram comparados dois tipos de métodos de extração automáticos e um tipo de método de extração manual (52).

Custos Resíduos

Na variável custos associados aos resíduos gerados em ambos os métodos de extração em estudo, verificou-se uma produção de resíduos superior no método de extração manual quando comparado com o método de extração automático e

consequentemente custos superiores. No caso dos contentores pretos, bem como nos contentores corto-perfurantes, verificou-se o dobro do consumo no caso do método de extração manual, este consumo pode-se justificar pelo consumo superior de pontas, pois as pontas são descartadas para estes contentores bem como os Eppendorf's e os tubos coletores da primeira etapa que contêm "fenol e contaminantes biológicos". O consumo de contentores pretos é dependente do consumo dos contentores corto-perfurante, uma vez que cada contentor preto leva três contentores corto-perfurantes.

No caso dos contentores verdes também se verificou o consumo de mais dois contentores no método de extração manual do que no método de extração automático, este consumo está relacionado com o descarte dos tubos coletores e das minicolunas ao longo das diferentes etapas do protocolo de extração manual, também como foi referido anteriormente para o mesmo número de amostras extraídas em ambos os métodos de extração é necessário mais tempo e perante um maior número de amostras, são necessários mais recursos humanos e isto significa um maior consumo de EPIs (fatos, batas, máscaras e luvas), que por sua vez são descartados para os contentores verdes.

Avaliação dos espaços ocupados

Na variável relacionada com os espaços ocupados pelos kits e os consumíveis (luvas, pontas e *Eppendorf's*) de ambos os métodos de extração em estudo, observou-se que o método manual requer mais espaço para armazenar as caixas dos kits, bem como, os diferentes consumíveis para o mesmo número de amostras extraídas, quando comparado com o método de extração automático. Para o armazenamento de kits e de consumíveis para 4000 reações de extração, observou-se que o método manual requer mais 173 915 cm³. Este resultado está relacionado com o facto de serem necessários maior número de caixas de armazenamento de consumíveis no método manual em relação ao automático.

Opinião dos Técnicos de Saúde sobre os dois métodos de extração em estudo através de entrevista estruturada (anexo/apêndice?)

Complexidade dos Protocolos

No tema relacionado com a complexidade na execução dos protocolos dos métodos de extração em estudo, todos os técnicos foram da opinião de que o método de extração manual requer maior motricidade fina quando comparado com o método de

extração automático. Este resultado pode ser justificado pelo facto de o protocolo do método de extração manual ter maior número de passos e requerer maior número de pipetagens, bem como, a abertura e fecho dos *Eppendorf's* várias vezes, das minicolunas e a troca dos tubos coletores nas diferentes fases.

Quando foi abordada diretamente uma questão sobre a complexidade dos protocolos, 87,5% dos entrevistados foram da opinião de que o método de extração manual é mais complexo, este resultado pode estar relacionado com o facto deste protocolo exigir mais confirmações de identificação (dos tubos iniciais, das minicolunas e dos *Eppendorf's*), bem como, o tempo de execução do protocolo ser mais longo, e o próprio protocolo exigir um maior número de pipetagens de reagentes.

Quando foi discutido o número de pipetagens necessário em ambos os métodos de extração, 50% dos técnicos foram da opinião de que o protocolo manual é mais difícil de realizar e os outros 50% não demonstrou ter uma opinião definida, esta indecisão pode ser justificada pelo uso de pipetas multicanais no protocolo do método de extração automática. Ou seja, não significa que o protocolo do método automático tenha realmente menos pipetagens, mas o facto da utilização das multicanais ajuda imenso na realização do protocolo do método de extração automático, pois em vez de se pipetar poço a poço, pipeta-se oito de uma vez.

Risco de Contaminação

Quando foi discutida com os entrevistados a questão relacionada com risco de contaminações, todos acharam que existe maior risco de contaminação na execução do método de extração manual do que, no método de extração automático. Esta opinião pode ser justificada pelos diferentes passos do protocolo suscetíveis de contaminação entre amostras, como por exemplo, abrir os *Eppendorf's*, as minicolunas, ao retirar-se as minicolunas da centrífuga e ao trocar-se os tubos coletores, existe a possibilidade de saltarem gotas potencialmente contaminadas para as luvas. Se o operador não trocar de luvas e for manipular os outros tubos, estes podem ficar contaminados com material biológico dos tubos anteriores.

Também foi feita uma questão sobre a segurança do operador em relação ao risco e contaminação. Verificou-se que 62,5% dos técnicos referiram que o protocolo do método de extração manual é menos seguro do que o automático e os restantes mostraram não ter uma opinião bem definida, demonstrando sentirem-se seguros em ambos os métodos de extração. Este risco para os operadores pode estar relacionado com alguns procedimentos que foram abordados anteriormente, como o facto dos

Eppendorf's e das minicolunas necessitem de sair da câmara de fluxo laminar para a centrifugação, o que expõe mais os operadores a possíveis contaminações.

Preferência da técnica

Relativamente à preferência do utilizador por uma das técnicas em estudo, foi questionado, qual o método de extração que preferiam utilizar, no caso de ser necessário extrair 10, 50 e 94 amostras. No caso das 10 amostras a maioria dos entrevistados mostrou preferir utilizar o método manual, esta opinião, pode estar associada ao uso dos recursos visto que são só 10 amostras não compensa utilizar os plásticos do método de extração automático considerando que dá para 94 amostras em cada *set*. E com poucas amostras a diferença de tempo do processamento não é tão diferente entre os métodos de extração como quando são extraídas muitas amostras. No caso de ser necessário extrair 50 ou 94 amostras todos os técnicos optaram pelo método automático, por se justificar o uso dos plásticos bem como o tempo necessário no método de extração manual para o processamento deste volume de amostras.

Foi abordado o tema da motivação dos técnicos face à realização dos diferentes métodos em estudo. Verificou-se que a maioria dos técnicos sente-se mais desmotivado quando tem que utilizar o método de extração manual em comparação com o método de extração automático. Esta desmotivação pode estar relacionada com alguns fatores que já foram referidos anteriormente, como a complexidade do protocolo, o risco de contaminação e tempo necessário para a execução do protocolo, claro que esta motivação também varia com o número de amostras para extrair.

Foi questionado na entrevista se os técnicos acham que demoram mais tempo a realizar o protocolo do método de extração manual em comparação com o método de extração automático e todos os técnicos concordaram que sentem que demoram mais tempo a realizar o protocolo do método de extração manual do que o método de extração automático. Tendo em consideração os dados anteriormente analisados podemos afirmar que para além de ser uma sensação dos técnicos é mesmo uma realidade (Figura 4.1). O método de extração manual requer mais tempo do que o método de extração automático. Mesmo quando são poucas amostras os técnicos podem ter esta sensação por não estarem tão motivados e pela complexidade do método.

Foram colocadas três questões na entrevista aos técnicos sobre a dificuldade de aprendizagem e de realização dos dois métodos de extração em estudo. A maioria dos entrevistados referiu sentir mais dificuldade em aprender e a realizar pela primeira vez

e nas primeiras 5 a 10 vezes o protocolo do método de extração manual do que o método de extração automático. Esta dificuldade pode estar relacionada com a complexidade da técnica bem como todos os cuidados necessários para evitar possíveis contaminações ao longo de todo o processo de extração.

Ainda sobre a preferência da técnica, foi questionado aos técnicos a opinião sobre qual dos métodos em termos ergonômicos é mais fácil de realizar, a maioria considera o método de extração automático mais ergonômico, demonstrando de um modo geral a preferência pelo método de extração automático.

Qualidade

Na entrevista foi questionado aos técnicos com qual dos métodos de extração se sentiam mais confiantes em relação à qualidade dos resultados obtidos. A maioria dos entrevistados mostrou-se indiferente, referindo que se sentem confiantes em ambos os métodos de extração. Este resultado demonstra que apesar dos dados anteriores serem mais favoráveis para o método de extração automático, o método de extração manual também é considerado de qualidade pelos profissionais e que estes confiam nos resultados que obtém.

Eficiência

Na entrevista foi abordado o tema da eficiência e foi questionado aos técnicos que perante um aumento súbito de amostras qual dos dois métodos de extração conseguiria dar uma resposta mais rápida e eficiente sem que necessitassem de fazer horas extraordinárias. Perante esta questão todos os técnicos acharam que o método de extração automático conseguiria dar uma melhor resposta face ao método de extração manual. Esta opinião pode ser justificada por alguns dados referidos anteriormente, tal como, o tempo de extração e a complexidade na execução dos protocolos, estes foram concordantes entre si demonstrando que o método de extração manual demora mais tempo e é mais complexo. Assim, perante um aumento subido de amostras o método de extração automático conseguiria dar uma resposta mais eficiente.

Foi ainda feita uma questão relacionada com a organização de equipas, fluxo de trabalho, preparação de material e comunicação entre as equipas, onde todos os técnicos foram da opinião de que todos estes parâmetros são mais fáceis de concretizar com o método de extração automático, demonstrando que este método é considerado pelos profissionais mais eficiente. No caso do método de extração manual para um número elevado de amostras, necessita de mais técnicos, mais tempo de preparação

de material, pois todos os *Eppendorf's* e minicolunas tem que ser organizados em suportes e numerados. Neste método de extração também é fundamental a comunicação entre equipas pois vão ter que partilhar as centrífugas e é importante saber em que fase do protocolo cada equipa está, para não existirem passos sobrepostos. Todos estes pontos são mais complexos no método de extração manual do que no método de extração automático, que revela ser mais simples e rápido, por isso, eficaz.

6. Conclusão e considerações finais

Na gestão de um laboratório de diagnóstico, tal como noutras instituições é necessário fazer escolhas e tomar decisões, neste estudo em específico foi avaliada a gestão associada à escolha de dois tipos de métodos de extração e purificação de RNA viral, para posterior diagnóstico molecular por rRT-PCR de SARS-CoV-2. Num mundo com tantas opções disponíveis no mercado a escolha de um método em detrimento de outro, é fundamental pois influencia todo o funcionamento do laboratório e, por conseguinte, a satisfação dos objetivos do mesmo.

A técnica ideal de extração, neste caso, será aquela que disponibilize grande quantidade de *RNA* puro, de modo rápido, com pouco custo e capaz de permitir a extração de um grande número de amostras simultaneamente. Para se fazer uma escolha fundamentada é essencial avaliar diferentes variáveis associadas a cada método de extração, como as que foram utilizadas neste estudo.

A realização deste projeto permitiu compreender as principais vantagens e desvantagens em termos de gestão laboratorial (tempo, custos, espaço de armazenamento e complexidade) dos dois métodos de extração de *RNA* (método manual e o método automático) utilizados no laboratório de diagnóstico para a COVID-19 do ABC, permitindo concluir que:

1. O método de extração manual é significativamente mais demorado do que o método de extração automático. Nos três “tempos” estudados (T1 – tempo de pipetagem, T2 – tempo total da extração e T3 – somatório dos tempos intermédios)
2. O método de extração manual apresentou custos mais elevados quando comparado com o método de extração automático relativamente ao material consumível (pontas, *Eppendorf's* e luvas).
3. Quando comparados os custos dos kits de ambos os métodos de extração, verificou-se que o kit do método de extração automático tem um valor superior ao kit do método de extração manual.
4. O método de extração manual apresentou custos inferiores quando comparado com o método de extração automático relativamente à instrumentação necessária para execução das técnicas.
5. O método de extração manual necessita de mais espaço de armazenamento quando comprado com o método de extração automático.

6. O método de extração manual, é considerado pelos operadores mais complexo, de um maior risco de contaminação biológica e menos eficiente na organização do fluxo de trabalho, quando comparado com o método de extração automático.

7. Os operadores demonstraram preferir realizar o método de extração automático, considerando-o mais motivador, rápido, fácil de aprender e de executar nas primeiras vezes e mais ergonómico.

8. Em relação à opinião dos operadores acerca da qualidade dos resultados, os operadores sentem-se confiantes em ambos os métodos de extração.

No futuro seria importante realizar estudos semelhantes a este, não necessariamente para o diagnóstico de SARS-CoV-2, mas sim incluído outros microrganismos, pois estas técnicas podem ser utilizadas para a deteção de uma ampla diversidade de microrganismos. Seria relevante o estudo de outros kits, por exemplo, mais dois kits de extração manual e outros dois de extração automática, com o objetivo de compreender se as vantagens que se observaram no método de extração automático deste estudo, são semelhantes no estudo de outros métodos automáticos.

Como perspetivas futuras poderá ser incluída a variável *tempo* de trabalho, que represente os custos com recursos humanos e o tempo consumido por cada um dos tipos de métodos de extração de *RNA*.

Numa vertente mais laboratorial era interessante avaliar ainda a qualidade e a quantidade do *RNA* extraído em ambos os métodos de extração em estudo.

7. Referências Bibliográficas

1. Chams N, Chams S, Badran R, Shams A, Araji A, Raad M, et al. COVID-19: A Multidisciplinary Review. *Frontiers in Public Health* [Internet]. 2020 Jul 29 [cited 2021 Oct 28];8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32850602/>
2. World Health Organization. Diagnostic testing for SARS-CoV-2 [Internet]. 2020. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2>
3. Astuti I, Ysrafil. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2020 Jul 1;14(4):407–12.
4. World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard [Internet]. Available from: <https://covid19.who.int/>
5. SINAVE | Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica – SPMS [Internet]. [cited 2022 Feb 9]. Available from: <https://www.spms.min-saude.pt/2020/07/sinave-2/>
6. Recommendations for national SARS-CoV-2 testing strategies and diagnostic capacities Interim guidance. 2021.
7. Weiss SR, Leibowitz JL. Coronavirus Pathogenesis. [cited 2022 Jan 19]; Available from: <http://talk.ictvonline.org/media/g/verte->
8. Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2021 Nov 15];17(3):181–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30531947/>
9. Liu DX, Liang JQ, Fung TS. Human Coronavirus-229E, -OC43, -NL63, and -HKU1 (Coronaviridae). In: *Encyclopedia of Virology* [Internet]. Elsevier; 2021 [cited 2022 Apr 20]. p. 428–40. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012809633821501X>
10. Umakanthan S, Sahu P, Ranade A v., Bukelo MM, Rao JS, Abrahao-Machado LF, et al. Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Postgrad Med J* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 Nov 25];96(1142):753–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32563999/>
11. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) WHO MERS Global Summary and Assessment of Risk Global summary. 2019.
12. Hui DS, I Azhar E, Madani TA, Ntoumi F, Kock R, Dar O, et al. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health - The latest

- 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2021 Nov 26];91:264–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31953166/>
13. Deng SQ, Peng HJ. Characteristics of and Public Health Responses to the Coronavirus Disease 2019 Outbreak in China. *J Clin Med* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2021 Nov 26];9(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32093211/>
 14. Han Q, Lin Q, Jin S, You L. Coronavirus 2019-nCoV: A brief perspective from the front line. *J Infect* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2021 Nov 26];80(4):373–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32109444/>
 15. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology* [Internet]. 2021 Mar 6 [cited 2021 Oct 28];19(3):141–54. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41579-020-00459-7>
 16. Wu JT, Leung K, Leung GM. Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study. *The Lancet* [Internet]. 2020 Feb 29 [cited 2021 Nov 26];395(10225):689–97. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673620302609>
 17. Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, Nix WA, Campagnoli R, Icenogle JP, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* (1979) [Internet]. 2003 May 30 [cited 2022 Jan 24];300(5624):1394–9. Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1085952>
 18. Redondo N, Zaldívar-López S, Garrido JJ, Montoya M. SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. *Frontiers in Immunology*. 2021 Jul 7;12:2698.
 19. Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. COVID-19 infection: Emergence, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *Journal of Advanced Research* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2021 Oct 22];24:91–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090123220300540>
 20. Yan Y, Chang L, Wang L. Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. *Reviews in Medical Virology* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2021 Nov

- 8];30(3):e2106. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/rmv.2106>
21. Pascarella G, Strumia A, Piliago C, Bruno F, del Buono R, Costa F, et al. COVID-19 diagnosis and management: a comprehensive review. *Journal of Internal Medicine* [Internet]. 2020 Aug 13 [cited 2021 Oct 22];288(2):192–206. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/joim.13091>
 22. Umakanthan S, Sahu P, Ranade A v., Bukelo MM, Rao JS, Abrahao-Machado LF, et al. Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Postgraduate Medical Journal* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 Dec 1];96(1142):753–8. Available from: <https://pmj.bmj.com/content/96/1142/753>
 23. Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2021 Nov 15];17(3):181–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30531947/>
 24. W A, A Q. Effectiveness of COVID-19 diagnosis and management tools: A review. *Radiography (Lond)* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2021 Oct 22];27(2):682–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33008761/>
 25. Peter J. Delves. Visão geral do sistema imunitário - Fundamentos de geraria [Internet]. 2021 [cited 2022 Apr 20]. Available from: <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/imunologia-dist%C3%BArbiol%C3%A9rgicos/biologia-do-sistema-imunit%C3%A1rio/vis%C3%A3o-geral-do-sistema-imunit%C3%A1rio>
 26. W A, A Q. Effectiveness of COVID-19 diagnosis and management tools: A review. *Radiography (Lond)* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2021 Oct 22];27(2):682–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33008761/>
 27. Lucaccioni H, Costa C, Duque MP, Machado RS. Epidemiologia descritiva dos casos COVID-19 em profissionais de saúde, Portugal, 2020. *Revista Portuguesa de Clínica Geral* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2022 Mar 8];37(4):366–72. Available from: <https://www.rpmgf.pt/ojs/index.php/rpmgf/article/view/12979>
 28. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection [Internet]. [cited 2021 Nov 2]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2infection-using-rapid-immunoassays>
 29. Hsieh WY, Lin CH, Lin TC, Lin CH, Chang HF, Tsai CH, et al. Development and Efficacy of Lateral Flow Point-of-Care Testing Devices for Rapid and Mass COVID-19 Diagnosis by the Detections of SARS-CoV-2 Antigen and Anti-SARS-

- CoV-2 Antibodies. *Diagnostics* 2021, Vol 11, Page 1760 [Internet]. 2021 Sep 24 [cited 2021 Nov 20];11(10):1760. Available from: <https://www.mdpi.com/2075-4418/11/10/1760/htm>
30. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection [Internet]. [cited 2021 Nov 2]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2infection-using-rapid-immunoassays>
 31. Direção Geral de Saúde. Orientação nº015/2020 de 23/03/2020 - COVID-19: Diagnóstico Laboratorial [Internet]. Lisboa; 2020 [cited 2022 Feb 7]. Available from: <https://www.spmi.pt/wp-content/uploads/2020/04/DGS-Orientac%CC%A7a%CC%83o-diagno%CC%81stica-laboratorial.pdf>
 32. Afzal A. Molecular diagnostic technologies for COVID-19: Limitations and challenges. *Journal of Advanced Research*. 2020 Nov 1;26:149–59.
 33. Dettogni RS, Louro ID. Desafios da extração do RNA do vírus da dengue. *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol 4*. 2017 Jan 31;937–66.
 34. Artika IM, Wiyatno A, Ma'roef CN. Pathogenic viruses: Molecular detection and characterization. *Infection, Genetics and Evolution* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2022 Feb 6];81:104215. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134820300472>
 35. Thermo Fisher Scientific. TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit [Internet]. 2021 [cited 2022 Feb 14]. Available from: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FGSD%2FFlyers%2Ftaqpath-covid-19-ce-ivd-rt-pcr-flyer.pdf>
 36. Fisher Scientific T. TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit Instructions for Use (Pub. No. MAN0019215 Rev. F.0). [cited 2022 Apr 22]; Available from: www.thermofisher.com/contactus
 37. Thermo Fisher Scientific. QuantStudio™ Design and Analysis Desktop Software - USER GUIDE [Internet]. [cited 2022 Feb 15]. Available from: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0010408_QuantStudioDesign_Analysis_Desktop_Software_UG.pdf
 38. Porto Editora. *Dicionário de Língua Portuguesa*. Porto; 2012. 367 p.
 39. Richard L. Daft. *Management* [Internet]. 12th ed. Cengage Learning, editor. 2016 [cited 2022 Feb 16]. Available from: <https://books.google.pt/books?hl=pt->

- PT&lr=&id=X0F-
BAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Management&ots=gYp95pqurs&sig=DJ4XcXr
iwJ6y2VYUJMEPZKLToos&redir_esc=y#v=onepage&q=Management&f=false
40. Real M. Gestão Empresarial [Internet]. 2012. Available from: www.iesde.com.br
 41. Lourenço Ó, Silva V. Avaliação económica de programas de saúde - Essencial sobre conceitos, metodologia, dificuldades e oportunidades. *Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar* [Internet]. 2008 Nov 1 [cited 2022 Feb 15];24(6):729–52. Available from: <https://www.rpmgf.pt/ojs/index.php/rpmgf/article/view/10572>
 42. About HTAi | Health Technology Assessment International (HTAi) [Internet]. [cited 2022 Feb 15]. Available from: <https://htai.org/about-htai/>
 43. Roberto Miniati, Fabrizio Dori, Mario Medici. Health Technology Management. In: Jayanthakumaran K, editor. *Advanced Technologies* [Internet]. InTech; 2009 [cited 2022 Feb 16]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/advanced-technologies>
 44. Marques FB. Avaliação de tecnologias de saúde: perspectiva geral. *Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar*. 2008;705–7.
 45. Medeiros A de. Avaliação económica dos medicamentos. *Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar* [Internet]. 2002 Nov 1 [cited 2022 Feb 15];18(6):375–80. Available from: <https://www.rpmgf.pt/ojs/index.php/rpmgf/article/view/9895>
 46. Nunes Da Silva E, Galvão TF, Pereira MG, Silva MT. Artículo de revisión / Review Como citar Estudos de avaliação econômica de tecnologias em saúde: roteiro para análise crítica.
 47. Direção Geral da Saúde. RESÍDUOS HOSPITALARES (Documento de Orientação).
 48. Diário da República. Decreto-Lei n.º 73/2011. Portugal: Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território; Jun 17, 2011.
 49. Direção Geral da Saúde. Despacho n.º 242/96, publicado a 13 de agosto. *Diário da República - II Série*. 1996;
 50. Sousa Silva M, José Crespo de Carvalho D. GESTÃO DE STOCKS BASEADA NO CONSUMO REAL DE UM LABORATÓRIO ANÁLISES CLÍNICAS. 2011.
 51. Gil ACarlos. *Métodos e Técnicas de Pesquisa Social*. Atlas; 2008.
 52. Dundas N, Leos NK, Mitui M, Revell P, Rogers BB. Comparison of Automated Nucleic Acid Extraction Methods with Manual Extraction. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2008 Jul 4;10(4):311–6.

53. A&A Biotechnology. CoV RNA Kit for the isolation of viral RNA from swabs.
54. Applied Biosystems™. A48383 Two-Step non-inactivated 2-Wash Instant COVID-19 Protocol for KingFisher Flex.

8. Anexos

Anexo 1 - Protocolo do “Kit CoV RNA - A&A Biotechnology” (Método de Extração Manual) (53)

1. Pipetar 150 µl da amostra para um tubo Eppendorf de 1,5ml.
2. Adicionar 300 µl do reagente R9F.
3. Agitar no Votéx durante 10 segundos.
4. Incubar 10 minutos à temperatura ambiente.
5. Adicionar 250 µl de Isopropanol e homogeneizar no vortéx.
6. Transferir 700 µl da mistura (amostra + R9F + Isopropanol) para uma minicoluna.
7. Centrifugar durante 1min entre 12 000 e 14 000 RPM.
8. Colocar a minicoluna num novo tubo de 2ml.
9. Adicionar 700 µl do reagente A1 (solução de lavagem).
10. Centrifugar durante 1min entre 12 000 e 14 000 RPM.
11. Colocar a minicoluna num novo tubo de 2ml.
12. Adicionar 700 µl do reagente A1 (solução de lavagem).
13. Centrifugar durante 1min entre 12 000 e 14 000 RPM.
14. Remover o líquido obtido na centrifugação do tubo de 2ml e voltar a colocar a minicoluna.
15. Adicionar 300 µl do reagente A1 (solução de lavagem).
16. Centrifugar durante 2 min entre 12 000 e 14 000 RPM.
17. Colocar a minicoluna num tubo *Eppendorf* estéril de 1,5 ml.
18. Adicionar 60 µl de água esterilizada no centro da membrana da minicoluna, evitando tocar na membrana com a ponta da pipeta.
19. Incubar durante 3 min à temperatura ambiente.
20. Centrifugar durante 1min entre 12 000 e 14 000 RPM.
21. Descartar a minicoluna, fechar corretamente o *Eppendorf* com o RNA extraído e colocar a -20°C.

Anexo 2 - Protocolo “MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit” (Método de Extração Automático) (54)

- I. Para cada extração são necessárias 4 placas multipoços (*KingFisher Deepwell 96 Plate*) com reagentes diferentes, um *Tip Comb* e uma *Tip Comb Plate*.
- II. Antes de se pipetar os reagentes para as *KingFisher Deepwell 96 Plate* é necessário preparar o reagente utilizado no *Wash 2*, o etanol a 80%, para a preparação de um litro deste reagente são necessários 800ml de etanol 100% e 200ml de *Ambion™ Nuclease-Free Water*.
- III. No laboratório em estudo, de modo a facilitar a organização do trabalho as placas com os reagentes são devidamente pipetadas, identificadas, seladas e armazenadas no frigorífico a 18°C até 24 horas antes de serem utilizadas para a extração de amostras.

Tabela 8.1. Volume em microlitros dos reagentes e placas correspondentes

Nome da Placa	Reagente	Volume
Sample	<i>Binding Solution</i>	265 µl
Wash 1	<i>Wash Solution</i>	500 µl
Wash 2	Etanol 80%	500 µl
Elution	Elution Buffer	50 µl

Depois das amostras serem organizadas e numeradas com o número interno do laboratório são processadas, seguindo o seguinte protocolo:

1. Pipetar 200 µl das amostras para os poços da placa Sample, previamente preparada, no caso do controlo negativo é pipetado 200 µl de água livre de nuclease;
2. Incubar 15 minutos à temperatura ambiente;
3. Preparar a mistura de 1:1 de *MS2* e *Proteinase K*, pipetar 10 µl da mistura em cada poço da placa Sample (5 µl de *MS2* e 5 µl de *Proteinase K*);
4. Pipetar 10 µl de binding beads para cada poço;

5. Ligar o equipamento *KingFisher Flex System da ThermoFisher*, selecionar o protocolo “MVP_2Wash_200_Flex” e carregar no botão Start.
6. Colocar na primeira posição do equipamento *Tip Comb* encaixado na *Tip Comb Plate*;
7. Carregar no botão Start e colocar a placa *Wash 1*;
8. Carregar no botão Start e colocar a placa *Wash 2*;
9. Carregar no botão Start e colocar a placa *Elution*;
10. Carregar no botão Start e colocar a placa Sample, com o Binding Solution, com as amostras, com a mistura de MS2 e Proteinase , e com binding beads.;
11. Carregar no botão Start e o equipamento começa a realizar o protocolo previamente selecionado, esta etapa demora cerca de 23min;
12. Quando o equipamento termina o protocolo, retira-se a placa Elution do equipamento, essa placa é selada com uma película adesiva e é colocada numa caixa de gelo de modo a conservar o RNA extraído a cerca de 4°C, para se proceder de seguida ao RT-PCR;
13. As restantes placas são retiradas do equipamento e colocadas em saco duplo com papel para posterior autoclavagem e descarte nos contentores de resíduos do grupo II

Apêndice 2 – Dados da Variável Custos

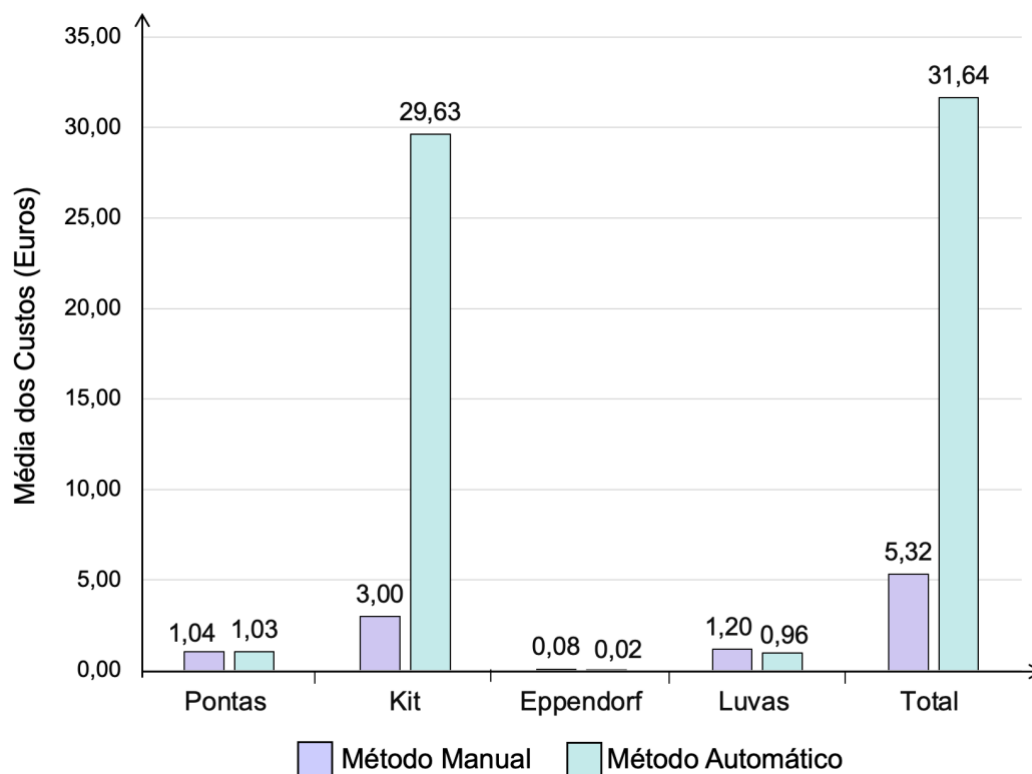


Figura 9.1: Comparação da média dos custos dos consumíveis entre os métodos de extração manual e automático. Os cálculos foram efetuados para 1 amostra extraída.

Método Manual: Pontas – 1,04€; Kit – 3,00€; Eppendorf's – 0,08€; Luvas – 1,20; Total - 5,23€.

Método Automático: Pontas – 1,03€; Kit – 29,63€; Eppendorf's – 0,02€; Luvas – 0,96; Total - 31,64€.

Tabela 9.2. Custos médios da instrumentação em euros

Instrumentação	Preço unitário (€)	Método Manual		Método Automático	
		Nº	Custo Total (€)	Nº	Custo Total (€)
Centrifuga	1 075,00	3	3 225,00	0	0,00
Suporte Eppendorf	4,55	16	72,80	0	0,00
Equipamento KingFisher Flex System	54 496,00	0	0,00	1	54 496,00
Pipeta multicanal de 200 µl	265,00	0	0,00	1	265,00
Pipeta multicanal eletrónica 50-1200 µl	600,00	0	0,00	1	600,00
Total	-	-	3 297,80	-	55 361,00

Apêndice 3 - Entrevista Estruturada

Complexidade dos Protocolos

- a) Na sua opinião, a técnica de extração manual requer bastante destreza manual ao longo de todo o processo (ex. abertura de tubos e colunas), em comparação com a técnica de extração automática.
- b) O número de pipetagens do protocolo de extração manual é difícil de concretizar quando comparado com o protocolo de extração automática.
- c) Na sua opinião, a técnica de extração manual é mais complexa do que, a extração automática

Risco de Contaminação

- a) Acha que na técnica de extração manual existe um maior risco de possíveis contaminações em comparação com a técnica de extração automática?
- b) Na sua opinião a execução do método de extração manual apresenta menos riscos para o operador do que, o método de extração automático.

Preferência da técnica

- a) Para 10 amostras prefiro realizar o método manual em vez do método automatizado.
- b) Para 50 amostras prefiro realizar o método manual em vez do método automatizado.
- c) Para 94 amostras prefiro realizar o método manual em vez do método automatizado.

- d) Quando pensa que tem que extrair amostras através do método manual fica desmotivado em comparação com o método automatizado.
- e) Sente que demora mais tempo no método de extração manual do que no automatizado.
- f) Senti mais dificuldade em aprender a técnica de extração manual do que, a técnica de extração automática.
- g) Senti mais dificuldade em realizar a técnica de extração manual pela primeira vez do que, a técnica de extração automática.
- h) Senti mais dificuldade em realizar a técnica de extração manual nas primeiras 5/10 vezes do que, a técnica de extração automática.
- i) Em termos ergonómicos o método manual é mais confortável de realizar do que, o método automatizado.

Qualidade

- a) Sinto-me mais confiante em relação à qualidade dos resultados que obtenho do método extração manual quando comparado com o método automatizado.

Eficiência

- a) Na sua opinião, perante um aumento súbito do volume de amostras, o método manual conseguirá dar resposta, sem que tenha de haver tempo laboral extraordinário.
- b) Na sua opinião, perante um aumento súbito do volume de amostras, o método automatizado conseguirá dar resposta, sem que tenha de haver tempo laboral extraordinário.
- c) A organização de equipas, o fluxo de trabalho e a preparação de material são mais fáceis de executar no método manual do que no método automático.

- d)** Na sua opinião, o método manual exige uma maior comunicação entre as equipas de operadores, quando comparado com o método automático.