



NORMA PALC

Lista de Verificação em Diagnóstico Molecular

Versão 2008 - Português



A. INTRODUÇÃO

Apresentação da Diretoria de Acreditação

Ao longo da minha atuação junto ao Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos desde a sua criação, foi sendo definida e depois cristalizada a filosofia por trás do programa. A principal delas, seu caráter educativo. Um dos princípios que sempre tínhamos seguido era também o de que a norma seria “aberta”, ou seja, não prescritiva. Assim ela sempre diria “o quê fazer”, mas nunca “como fazer”.

Contudo, vimos observando nestes anos o explosivo crescimento do diagnóstico molecular e a conseqüente (e bem vinda) incorporação aos laboratórios clínicos de profissionais oriundos da área de pesquisa. Ao mesmo tempo, dentre os auditores do PALC, tínhamos uma maioria de profissionais não afeitos às técnicas de diagnóstico molecular.

Por tudo isto, vimos a necessidade de criar, ainda que de forma a contrariar uma das filosofias do PALC, a lista de verificação de Diagnóstico Molecular, que agora apresentamos. Esta lista foi baseada em parte nas diretrizes do Laboratory Accreditation Program do College of American Pathologists e na experiência de auditores do PALC e de profissionais de laboratórios clínicos e de pesquisa que atuam na vanguarda do setor no país, aos quais mais uma vez agradeço.

Durante a fase de consulta pública foi questionado o uso dos termos “controle interno” e “controle da reação” nesta lista, em vez dos termos consagrados na área (“controle exógeno” e “controle endógeno”). Contudo, lembramos que um dos objetivos da elaboração desta norma é o de aproximar o pessoal da “Biomol” do PALC, e vice-versa. A nomenclatura padrão (mundial) na área de acreditação é avaliação externa da qualidade, controle interno da qualidade e controle da reação. Este uso será estimulado, mas os termos que são usados na Lista de Verificação em Diagnóstico Molecular ficarão no glossário como sinônimos e nada impede a continuidade de seu uso no dia a dia. Não podíamos, contudo, abandonar a nomenclatura usada e conhecida em toda a comunidade global de laboratórios clínicos acreditados em função desta especificidade. É uma solução “salomônica”, mas espero que atenda à nova comunidade que pretendemos incluir no programa.

Esta lista de verificação será usada na complementação de auditorias a serem realizadas em laboratórios que utilizam técnicas de diagnóstico molecular como uma



NORMA PALC

Lista de Verificação em Diagnóstico Molecular

Versão 2008 - Português



ferramenta para melhorar a comunicação entre auditores e auditados e de forma a propiciar a criação de um referencial de garantia da qualidade aplicável às especificidades do setor. Esta lista será revista periodicamente, sempre que necessário, para acompanhar a velocidade de mudanças que caracteriza o setor de Diagnóstico Molecular. Sejam bem vindos à comunidade PALC.

Luisane M. F. Vieira

Médica Patologista Clínica Diretora
de Acreditação SBPC/ML
Biênio 2006/2007

B. DIRETORIA SBPC/ML – 2006/2007

DIRETORIA EXECUTIVA

Presidente: Wilson Shcolnik (RJ)
Vice – Presidente: Alvaro Rodrigues Martins (SP)
Diretor Administrativo: Leila Carmo Sampaio Rodrigues (RJ)
Diretor Financeiro: Paulo Linhares Pinto (RJ)
Diretor de Comunicação: Octavio Fernandes da Silva Filho (RJ)
Diretor Científico: Carlos Alberto Franco Ballarati (SP)
Diretor de Acreditação: Luisane Maria Falci Vieira (MG)
Vice- Diretor Administrativo: Augusto Paulo Marques Linhares Pinto (RJ)
Vice-Diretor Financeiro: Lucia Helena Cavalheiro Villela (RJ)
Vice - Director Científico: Antonia Maria de Oliveira Machado (SP)
Director de Defesa de Categoria: Paulo Sergio Roffé Azevedo (PA)

PRESIDENTES REGIONAIS

REGIÃO NORTE

Amazonas: Augusto Feliciano de Castilho
Pará: Carlos David Araújo Bichara

REGIÃO NORDESTE

Alagoas: Luiz Eduardo Saraiva Campos
Bahia: João Pinto Cunha
Ceará: Raimundo Tadeu Pires Sobreira
Paraíba: Fabio Antonio da Rocha de Souza
Pernambuco: André da Costa Victor
Piauí: Antonio Alves de Lobão Veras
Rio Grande do Norte: Kaline Maria Nogueira de L. Fonseca



NORMA PALC
Lista de Verificação em
Diagnóstico Molecular
Versão 2008 - Português



José A da Costa Val

D. COMISSÃO DE ELABORAÇÃO DA NORMA

Coordenação

- Luisane Maria Falci Vieira

Equipe do PALC

- Derliane Oliveira

- Ismar Barbosa

Especialistas

- Carlos Alberto Franco Ballarati

- Flavio Alcântara

- Gustavo Barcelos Barra

- Nelson Gaburo Junior

- Octavio Fernandes

- Paula Fernandes Távora



NORMA PALC

Lista de Verificação em

Diagnóstico Molecular

Versão 2008 - Português



E. REQUISITOS DA NORMA

Nº. Ítem	Requisito	Evidência Objetiva
BM.1	O Setor de Biologia Molecular deve ter um Programa de Garantia da Qualidade que contemple todos os sistemas analíticos em todas as respectivas fases analíticas. O programa deve ser capaz de detectar problemas e identificar oportunidades de melhoria.	Verificar o documento que contém o Programa de Garantia da Qualidade, o qual deve contemplar as fases pré-analítica, analítica e pós-analítica. Verificar os registros de não-conformidades, dos planos de ações corretivas e das análises críticas pela Direção.
BM.2	O supervisor técnico do laboratório de biologia molecular e de análises forenses deve ter treinamento, experiência ou especialização na área.	Verificar o currículo do responsável técnico pela biologia molecular.
BM.3	O pessoal que executa as técnicas de biologia molecular deve ter nível superior e deve ter experiência comprovada na execução de técnicas de biologia molecular ou deve atuar sob supervisão direta de um profissional com esta qualificação.	Verificar a atuação do pessoal que executa as técnicas de biologia molecular e analisar os respectivos currículos.
BM.4	Deve haver um treinamento introdutório para os principiantes no setor e deve haver um programa de educação continuada para toda a equipe.	Verificar o plano e os registros de treinamento.
BM.5	A documentação pré-analítica deve incluir, quando aplicável: <ul style="list-style-type: none">• consentimento informado assinado pelo paciente ou responsável;• raça ou etnia;• heredograma.	Verificar os testes para os quais são necessários consentimento informado ou dados de raça ou etnia e heredograma e analisar os respectivos registros.



NORMA PALC

Lista de Verificação em Diagnóstico Molecular

Versão 2008 - Português



BM.6	<p>Para testes de paternidade e de finalidade forense os seguintes dados devem ser obtidos e registrados:</p> <ul style="list-style-type: none">• Local e data da coleta da amostra;• Documentação profissional ou de identificação do coletador da amostra.• Fotografia ou fotocópia do documento de identidade com fotografia de cada indivíduo testado;• Cadastro completo e assinado de cada indivíduo testado (incluindo nome, etnia, parentesco)• Certidão de Nascimento para menores ou Certidão de Nascido Vivo para recém-nascidos.• Sinopse do caso/investigação/fonte da amostra.• Consentimento informado;• História de transfusão nos últimos três meses e de transplante alogênico em qualquer época prévia.• Declaração da existência ou não de parentesco entre a Mãe e Suposto Pai ou possibilidade de parente do Suposto Pai ser o verdadeiro Pai Biológico• Assinatura com declaração que as partes presenciaram a coleta da parte contrária.	Verificar os registros dos cadastros de testes de paternidade e de finalidade forense.
BM.7	<p>Para testes de paternidade e de finalidade forense:</p> <ul style="list-style-type: none">• A acurácia das informações e da identificação das amostras deve ser verificada e aprovada pelo indivíduo testado ou por seu guardião legal;• A qualidade da amostra deve ser avaliada e registrada ao seu recebimento, incluindo evidências de alteração, quantidade e identificação única.• As amostras devem ser mantidas em áreas de segurança com acesso limitado e deve haver uma cadeia de custódia adequadamente documentada.	<p>Verificar o protocolo e os registros de identificação de amostras.</p> <p>Verificar os documentos e os registros relativos ao recebimento das amostras e os critérios de aceitabilidade.</p> <p>Verificar a segurança, a confidencialidade e a cadeia de custódia da guarda de amostras de valor legal.</p>
BM.8	Deve haver procedimentos documentados para a prevenção de perdas, alterações ou contaminações de amostras.	Verificar os procedimentos, documentos e registros de coleta, identificação, transporte, armazenamento e processamento das amostras.



NORMA PALC

Lista de Verificação em

Diagnóstico Molecular

Versão 2008 - Português



BM.9	Deve haver critérios documentados para a rejeição de amostras inaceitáveis ou que possam ter perdido a sua integridade, incluindo: <ul style="list-style-type: none">• amostras mal identificadas;• material inadequado;• recipientes manipulados antes de darem entrada para os testes de biologia molecular. Caso sejam retiradas alíquotas dos materiais, deve haver procedimentos documentados para prevenir possíveis contaminações, incluindo a proibição de retornar uma alíquota para o recipiente original.	Verificar os documentos que estabelecem os critérios de rejeição de amostras e de alíquotagem de materiais. Verificar os registros de rejeição de amostras. Observar as práticas de alíquotagem.
BM.10	Deve haver um procedimento documentado para que o requisitante seja informado prontamente caso a amostra seja inadequada.	Verificar os documentos relativos à rejeição de amostras e os respectivos registros de comunicação ao requisitante.
BM.11	Deve haver um procedimento documentado para a identificação dos tipos de materiais e amostras dos pacientes e suas alíquotas ao longo de todas as fases analíticas, incluindo o recebimento de amostras, a extração de ácidos nucleicos, a quantificação de ácidos nucleicos (quando aplicável), a hibridização, a detecção, e o armazenamento. Cada recipiente de amostra primária e de alíquotas deve possibilitar a identificação única do paciente e a rastreabilidade da coleta, mas o tipo de sistema adotado é de livre escolha do laboratório.	Verificar o sistema de identificação de amostras e de suas alíquotas.



NORMA PALC

Lista de Verificação em

Diagnóstico Molecular

Versão 2008 - Português



BM.12	As amostras de pacientes devem ser ou processadas imediatamente ou conservadas de modo a minimizar a sua degradação até o momento da análise.	Verificar o documento que estabelece as condições de conservação das amostras. Verificar os registros de guarda de amostras, incluindo os registros de temperatura. Avaliar os locais de guarda de amostras, incluindo a organização, a rastreabilidade e a temperatura.
BM.13	<p>Para os métodos próprios (<i>in house</i>), deve haver documentação e registro dos estudos de validação das características de desempenho realizados antes da sua implantação que incluam, quando aplicável:</p> <ul style="list-style-type: none">• sensibilidade diagnóstica (clínica);• sensibilidade analítica;• especificidade diagnóstica (clínica);• especificidade analítica;• precisão;• linearidade (ensaios quantitativos);• faixa reportável de resultados de pacientes;• intervalo de referência;• qualquer outra característica de desempenho aplicável. <p>Para métodos próprios (<i>in house</i>) para testes genéticos os protocolos de validação devem incluir a documentação de:</p> <ul style="list-style-type: none">• acurácia;• sensibilidade analítica;• especificidade analítica;• precisão;• características clínicas de desempenho (revisões da literatura científica em publicações revistas por pares ou sumário dos dados de estudos próprios).	<p>Verificar a lista de exames próprios e os respectivos protocolos de validação, incluindo documentos, dados brutos e conclusões.</p> <p>Verificar se a documentação da validação de testes genéticos inclui as características de desempenho clínicas: sensibilidade e especificidade diagnósticas, valores preditivos positivos e negativos nas diversas populações-alvo; contexto clínico para uso do teste (triagem, diagnóstico, monitoramento), associações de genótipos/fenótipos quando estas variam em relação a determinadas mutações ou polimorfismos; fatores genéticos, ambientais ou outros que modificam as expressões clínicas das alterações genéticas detectada; penetrância da doença.</p>



NORMA PALC

Lista de Verificação em Diagnóstico Molecular

Versão 2008 - Português



BM.14	<p>Para os métodos próprios (<i>in house</i>), os estudos de validação devem incluir, quando aplicável:</p> <ul style="list-style-type: none">• amostras representativas de todos os resultados (genótipos) acessíveis;• um número representativo de cada tipo de amostra que será analisada;• a comparação de resultados obtidos pelo método teste com resultados obtidos por um método comparativo válido ou por meio de validação clínica.	<p>Avaliar a gama de amostras conhecidas usadas para a validação dos testes genéticos. Para os ensaios para doenças genéticas com um número limitado de genótipos possíveis, todos os genótipos devem ser testados. Para os ensaios para doenças genéticas com considerável heterogeneidade alélica, deve ser testada a maior porcentagem possível de genótipos.</p> <p>Verificar se os estudos de validação incluem um número representativo de cada tipo de amostra que será analisada, por exemplo;</p> <ul style="list-style-type: none">• sangue total,• tecido fresco;• tecido congelado;• bloco de parafina;• amostras antenatais ou perinatais. <p>Verificar os estudos de comparação entre métodos. O método comparativo pode ser do próprio laboratório ou de um laboratório de apoio ou de referência. Quando não houver disponibilidade de método comparativo, a sensibilidade e a especificidade devem ser avaliadas em função do diagnóstico clínico do paciente.</p>
BM.15	<p>Para métodos próprios (<i>in house</i>) para análises qualitativas, os valores de referência (resultados normais versus resultados anormais) e os resultados reportáveis (ex: tipo selvagem homocigoto; heterocigoto ou homocigoto mutante) devem ser definidos. Quando os valores de referência dependerem da situação clínica, as diretrizes para a interpretação dos resultados de pacientes devem ser definidas e documentadas.</p>	<p>Para as análises qualitativas (ex: ensaios para mutações germinativas) verificar nos documentos e nos laudos:</p> <ul style="list-style-type: none">• valores de referência;• resultados reportáveis;• diretrizes para interpretação.



NORMA PALC

Lista de Verificação em

Diagnóstico Molecular

Versão 2008 - Português



BM.16	Para métodos próprios (<i>in house</i>) para análises quantitativas, os valores de referência (valores esperados para a população “normal”) e as faixas reportáveis (intervalo de valores que podem ser reportados) devem estar definidas.	Para as análises quantitativas, verificar nos documentos e nos laudos: <ul style="list-style-type: none">• valores de referência;• intervalo analítico (IA);• como abordar amostras acima ou abaixo do IA (por exemplo: $a < x$ ou $> y$; ou “positivo baixo” ou “positivo alto” mais uma explanação de que valores fora da linearidade não podem ser quantificados, ou instruções para concentração ou diluição das amostras). Ex: ensaios para tecido tumoral, quimerismo ou carga patogênica (carga viral).
BM.17	Para os testes comerciais, o laboratório deve verificar as características de desempenho informadas pelos fabricantes.	Verificar os critérios e os registros das verificações de desempenho dos testes comerciais.
BM.18	Caso o laboratório realize modificações nos procedimentos recomendados pelo fabricante, deve haver uma validação das modificações realizadas de forma que comprove que o desempenho obtido seja equivalente ou superior ao desempenho informado pelo fabricante.	Verificar se os procedimentos usados para os testes comerciais correspondem aos preconizados pelo fabricante. Em caso de modificações, verificar os documentos e registros correspondentes a esta validação.
BM.19	O Diretor do Laboratório ou o responsável designado deve analisar criticamente e aprovar todas as validações de todos os métodos antes de serem colocados em uso na rotina.	Verificar as aprovações das validações das rotinas de todos os métodos em relação às datas de início de uso na rotina.
BM.20	Com relação aos reagentes de ácidos nucleicos usados para testes genéticos ou moleculares (como sondas de DNA e primers de PCR), deve haver documentação de todos os dados relevantes com relação a, quando aplicável: - Primers: tamanho, conteúdo de CG, T_m , seqüência, localização genômica, concentração do estoque, temperatura usada para anelamento e para hibridização; - Sondas: seqüência parcial ou total de nucleotídeos, localização genômica, vetor de clonagem, temperatura de hibridização e método de preparação.	Verificar a documentação referente a estes reagentes. Tamanho e seqüência podem não estar disponíveis quando estas informações forem objetos de propriedade industrial.



NORMA PALC

Lista de Verificação em Diagnóstico Molecular

Versão 2008 - Português



BM.21	<p>Com relação aos testes moleculares quantitativos, o laboratório deve:</p> <ul style="list-style-type: none">• ter os métodos para o cálculo dos resultados e unidades descritos de maneira clara, incluindo as fórmulas usadas e exemplos de cálculos;• a faixa de trabalho (a faixa dinâmica) do ensaio deve ser definida e o desempenho deve ser monitorado a cada corrida com o uso de controles internos negativo e positivo (níveis recomendáveis: negativo e positivos baixo e alto).• quando o ensaio gerar uma curva de desnaturação deve haver critérios para sua validação.	Verificar os documentos (POPs) dos testes moleculares quantitativos e os registros respectivos.
BM.22	<p>Para os sistemas analíticos moleculares, tanto qualitativos como quantitativos, deve haver documentação para a interpretação dos resultados que inclua os critérios para a verificação do desempenho de cada ensaio de acordo com as características de cada corrida analítica, antes da liberação dos resultados de pacientes. Deve haver registros das análises críticas efetuadas.</p>	<p>Para os sistemas quantitativos, verificar os documentos e registros quanto a:</p> <ul style="list-style-type: none">• avaliação da sensibilidade e da linearidade do ensaio de acordo com padrões pré-estabelecidos;• avaliação da presença de inibidores da reação do paciente;• avaliação dos dados brutos e da sua coerência com os dados calculados. <p>Para os sistemas qualitativos, verificar os documentos e registros quanto a:</p> <ul style="list-style-type: none">• avaliação do padrão das bandas em relação ao padrão esperado;• temperatura de desnaturação;• ponto de corte (<i>cutoff</i>) numérico para distinção entre resultados positivos e negativos.
BM.23	<p>Para todos os sistemas analíticos que incluam uma ou mais fases de detecção de sinais quantitativos deve haver critérios para a realização e avaliação da(s) calibração(ões), seja(m) ela(s) efetuada(s) pelo fabricante ou pelo laboratório.</p>	Verificar os documentos e registros de calibração dos sistemas analíticos quantitativos em uso.



NORMA PALC

Lista de Verificação em

Diagnóstico Molecular

Versão 2008 - Português



BM.24	Para testes qualitativos, devem ser corridos controles internos negativos e positivos e deve haver uma sistemática de verificação da sensibilidade analítica (detecção de níveis baixos de seqüências alvo).	Verificar o uso de controles negativos e positivos para cada analito em cada corrida. Para alguns sistemas analíticos (ex: grandes painéis de mutação de fibrose cística) este procedimento pode não ser factível. Nestes casos, pode ser usada uma sistemática de rodízio de controles positivos.
BM.25	Para testes qualitativos que usam um valor de ponto de corte (<i>cutoff</i>) para a distinção entre os resultados positivos e negativos (ex: detecção de vírus em zaragatoas), o valor do ponto de corte deve ser avaliado inicialmente e a cada seis meses daí em diante. A verificação do ponto de corte também deve ser feita a cada mudança de lote dos reagentes críticos, após manutenções corretivas com troca de componentes críticos e quando indicado pelo controle da qualidade.	Verificar a avaliação inicial e as avaliações periódicas do ponto de corte. Caso o valor do calibrador ou do verificador de calibração em uso sejam próximos ao valor de corte, o requisito está atendido.
BM.26	Os ácidos nucléicos devem ser extraídos e purificados por meio de métodos reportados na literatura, recomendados pelo fabricante ou validados pelo próprio laboratório (<i>in house</i>). A quantidade e a integridade do DNA de alto peso molecular deve ser avaliada por eletroforese em gel ou método comparável, quando aplicável, ou seja, para procedimento que dependa de grande quantidade de DNA disponível.	Verificar os documentos, os processos e os registros da qualidade e da quantidade dos ácidos nucléicos extraídos. Verificar se o laboratório realiza análises que dependem de grande quantidade de DNA e verificar como esta quantidade é avaliada (ex: testes tipo Southern Blot ou isolamento de DNA para depósitos em bancos de DNA).
BM.27	Para sistemas analíticos que tenham como alvo o RNA humano (ex: pesquisa de transcrição de genes), a integridade do RNA da amostra deve ser avaliada.	Verificar se o laboratório tem uma sistemática que comprove a capacidade de detecção do RNA humano e verificar o procedimento usado para avaliação da qualidade da amostra (ex: espectrofotometria ou utilização de outro gene alvo para a amplificação do RNA).



NORMA PALC

Lista de Verificação em

Diagnóstico Molecular

Versão 2008 - Português



BM.28	Os procedimentos de amplificação de ácidos nucleicos (ex: PCR) devem ser planejados de forma a minimizar carreamento (“ <i>carryover</i> ”) de produtos pré-amplificados e resultados falso-positivos por meio do uso de barreiras físicas e procedimentais para minimização de aerossóis (ex: troca freqüente de luvas, pipetas dedicadas com barreiras ou tipo deslocamento positivo). Deve haver barreiras físicas adequadas entre as amostras pré e pós-amplificação para evitar a contaminação por amplicon. As amostras devem ser ordenadas assim: amostras de pacientes, controles positivos e controles negativos.	Verificar as barreiras físicas e procedimentais usadas para a minimização da contaminação (ex: destruição enzimática de produtos de amplificação, medida em tempo real dos produtos de amplificação).
BM.29	Em todos os procedimentos de amplificação de ácidos nucleicos devem ser corridos controles da reação (controles “endógenos”) capazes de detectar reações falsamente negativas devidas à presença de inibidores, quando aplicável. Para análises quantitativas, a questão da inibição parcial também deve ser avaliada.	Verificar como o laboratório faz a distinção entre resultados verdadeiramente negativos e resultados falsamente negativos. Verificar como são registrados e analisados criticamente os resultados falsamente negativos. Métodos extremamente robustos, após considerações acerca das implicações de resultados falsamente negativos podem ter parâmetros mais frouxos para a realização de controle da reação (“endógeno”).
BM.30	A completude e a especificidade da digestão por endonucleases de restrição devem ser avaliadas (quando aplicável). O tratamento do DNA com endonucleases de restrição deve ser realizado durante período de tempo e condições adequados e controlados.	Avaliar os procedimentos usados para o uso das enzimas. Por exemplo, o teste de novos lotes de enzimas com amostras testadas por lotes anteriores (ex: a cada novo lote de enzimas e a cada nova corrida).
BM.31	Para as análises de doenças genéticas, deve haver informação adequada acerca do gene a ser testado em relação à sua seqüência selvagem, as mutações reportadas e seus polimorfismos. As análises de sequenciamento de DNA devem ser restritas às doenças geneticamente bem caracterizadas na literatura e nos bancos de dados genômicos quanto à região alvo.	Verificar os documentos acerca das análises para doenças genéticas.



NORMA PALC

Lista de Verificação em

Diagnóstico Molecular

Versão 2008 - Português



BM.32	Os ensaios de sequenciamento devem ser otimizados de forma a garantir a presença de sinal detectável em todo o comprimento da região alvo e a pronta detecção de seqüências variantes, especialmente daquelas em estado de heterozigose (ex: sequenciamento bidirecional).	Verificar os ensaios de sequenciamento e avaliar a garantia da qualidade da visualização de todos os alvos.
BM.33	As auto-radiografias e as fotografias de géis devem apresentar boa resolução, fundo (<i>background</i>) fraco, sinal claro, ausência de bolhas e outros artefatos, enfim, uma qualidade que permita a interpretação correta dos resultados.	Avaliar a qualidade das auto-radiografias e as fotografias de géis.



NORMA PALC

Lista de Verificação em

Diagnóstico Molecular

Versão 2008 - Português



BM.34	<p>Com relação à eletroforese em gel:</p> <ul style="list-style-type: none">• a qualidade (integridade) do DNA de alto peso molecular deve ser avaliada quando aplicável;• quantidades padronizadas de ácido nucléico devem ser colocadas nos géis, quando possível;• marcadores de peso molecular conhecido em intervalo compatível com o das bandas esperadas devem ser usados a cada corrida;• marcadores visuais ou de fluorescência devem ser usados para marcar o ponto final;• deve haver critérios objetivos para a interpretação de auto-radiografias ou da eletroforese em gel.	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none">• a qualidade (integridade) do DNA de alto peso molecular;• a padronização das quantidades de ácido nucléico;• o uso de marcadores de peso molecular conhecido cada corrida;• o uso de marcadores visuais ou de fluorescência para marcar o ponto final;• critérios objetivos para a interpretação de auto-radiografias ou da eletroforese em gel.
BM.35	<p>Com relação à eletroforese capilar:</p> <ul style="list-style-type: none">• deve haver critérios para validar e interpretar os dados do sequenciamento preliminar (primário)• deve haver uma documentação adequada e atualizada do bando de dados de alelos conhecidos;• deve ser determinada a seqüência das fitas “sense” e “antisense” em heterozigotos, alelos raros e combinações raras de alelos.• o banco de dados para a determinação de alelos deve constar da documentação e deve ser atualizado quando aplicável.• quando apenas uma fita é seqüenciada nos heterozigotos, o processo de validação do sistema analítico deve apresentar evidências de que apenas uma fita gera resultados acurados. Neste caso recomenda-se haver confirmação periódica das fitas complementares.	<p>Verificar os documentos e os registros relativos à eletroforeses capilar e avaliar a existência de critérios para interpretação e aceitabilidade dos dados do sequenciamento que incluam:</p> <ul style="list-style-type: none">• posicionamento de segmentos não polimórficos;• definição da região de sequenciamento;• critérios de intensidade de picos;• flutuação de linha de base;• razão ruído/sinal;• formato dos picos.



NORMA PALC

Lista de Verificação em Diagnóstico Molecular

Versão 2008 - Português



BM.36	<p>Com relação à PCR em tempo real (<i>Real Time PCR</i>):</p> <ul style="list-style-type: none">• para testes que geram resultados baseados em T_m, devem ser definidos e monitorados intervalos de temperatura adequadamente estreitos ($\leq \pm 2,5^\circ\text{C}$);• para testes quantitativos, os resultados do controle interno devem estar dentro do intervalo especificado a cada corrida;• lotes novos de reagentes fluorescentes contendo oligonucleotídeos devem ser testados antes ou quando postos em uso;• para sistemas analíticos que medem múltiplos fluorocromos, devem ser tomadas precauções para identificar e corrigir sinais espúrios de um canal para o outro;• novas versões de softwares devem ser validadas com o uso de controles conhecidos.	<p>Para os ensaios de PCR em tempo real, verificar:</p> <ul style="list-style-type: none">• a monitoração da temperatura;• a adequação dos controles internos;• a verificação de lotes novos de reagentes;• o desempenho dos sistemas de leitura;• a validação do método e de novas versões do software;• o controle da qualidade e respectivas ações corretivas.
BM.37	<p>Com relação aos ensaios tipo arranjo (<i>Microarray</i>):</p> <ul style="list-style-type: none">• a integridade do ácido nucléico bem como sua marcação (sondas de hibridização), deve ser verificada e monitorada;• a qualidade dos arranjos deve ser verificada de acordo com as especificações do fabricante;• para ensaios quantitativos (expressão gênica, carga patogênica) deve ser usado um controle de nível positivo baixo para uma ou mais sondas e ainda um branco de reação a cada corrida;• as funções do software usado para analisar os dados devem ser verificadas periodicamente.	<p>Avaliar a documentação e os registros relativos a:</p> <ul style="list-style-type: none">• controle (s) utilizado(s) na metodologia (ex: controle da reação (endógeno) positivo, verificação subjetiva do resultado em gel de agarose/eletroforese capilar ou ainda por detecção de sinal fluorescente)• verificação de cada sonda a cada lote (ex: uso de oligonucleotídeos marcados que se hibridizam a todas as sondas; mistura de oligonucleotídeos específicos para cada sonda ou mistura de amostras controle que se hibridizam com cada sonda).• utilização alternada de sondas e um branco a cada corrida;• controle da qualidade realizado segundo o fabricante. <p>Devido à complexidade da metodologia, o auditor deve avaliar junto com o auditado todas as evidências relativas ao adequado desempenho analítico e juntos devem procurar identificar eventuais pontos falhos na sistemática de controle usada.</p>



NORMA PALC

Lista de Verificação em

Diagnóstico Molecular

Versão 2008 - Português



BM.38	Os resultados de testes de DNA (paternidade e indentificação genética por RFLP, STR ou SNP) devem ser interpretados por dupla conferência, de forma independente.	Verificar a política, a documentação e os registros das interpretações em duplicata e independentes dos resultados de testes de DNA.
BM.39	Para a hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH): <ul style="list-style-type: none">• deve haver políticas e procedimentos documentados para a validação das sondas;• deve haver procedimentos documentados para a gradação da escala de resultados e as análises devem ser graduadas da forma preconizada;• deve ser usados e registrados loci controle (internos ou externos) para cada análise.• devem ser retidas imagens digitalizadas ou fotográficas como registros para a documentação de todas as análises (pelo menos uma célula por análise com resultados normais e pelo menos duas células por análise com resultados anormais).	Verificar os documentos e registros relativos à FISH. Quando se espera alvos em cromossomos normais, um controle interno para aquele alvo deve ser usado a cada hidridização. Caso se use uma sonda que não produza um sinal de controle interno (ex: sonda para cromossomo Y em mulheres) uma outra amostra com o alvo de ser corrida em paralelo. A lâmina deve receber uma avaliação cito ou histopatológica para confirmar que a amostra é representativa da lesão.
BM.40	Para a hibridização <i>in situ</i> (ISH) de campo claro: <ul style="list-style-type: none">• as condições de pré-tratamento e as condições de análise devem ser verificadas para cada amostra, com o uso de sondas controle positivas adequadas contra os alvos endógenos;• condições livres de ribonuclease devem ser mantidas para todas as análises para detecção de RNA alvo nos tecidos ou para o uso de sondas de RNA;• para análises realizadas em amostras de citologia ou histologia, o laudo interpretativo deve incluir a correlação com os achados morfológicos.• o laudo deve fornecer uma interpretação adequada dos resultados da ISH.	Verificar os documentos e registros relativos à ISH. O ajuste das condições de ensaio para demonstrar o sinal com um controle positivo endógeno permite a interpretação de um resultado negativo e a eliminação de amostras inadequadas. A RNase é ubíqua o RNA é extremamente suscetível a degradação. Verificar as precauções tomadas para evitar esta interferência. A lâmina deve receber uma avaliação cito ou histopatológica para confirmar que a amostra é representativa da lesão.



NORMA PALC

Lista de Verificação em Diagnóstico Molecular

Versão 2008 - Português



BM.41	Devem ser mantidas estatísticas dos resultados de testes moleculares de maneira que permita o acompanhamento do desempenho analítico, a avaliação de tendências populacionais e a realização de estudos comparativos, quando aplicável.	Por exemplo, verificar as estatísticas de: - % de achados normais e anormais, - frequências de alelos. Verificar os resultados de estudos comparativos.
BM.42	Com relação à fase pós-analítica: <ul style="list-style-type: none">• devem ser gerados resultados preliminares, quando apropriado;• discrepâncias entre os resultados preliminares e os laudos devem ser investigadas e documentadas;• discrepâncias entre os achados da biologia molecular e a clínica ou outros achados de laboratório devem ser investigadas e documentadas, e devem ser tomadas ações corretivas quando indicadas.• deve haver protocolos documentados para a liberação de laudos;• o laudo deve incluir um resumo dos métodos, dos loci ou mutações testados, a interpretação analítica e a interpretação clínica, quando apropriado.	Verificar os passos da fase pós-analítica, a sua documentação e os registros pertinentes. Avaliar a rastreabilidade dos dados que compõem o laudo. Avaliar se os laudos emitidos permitem uma interpretação adequada por parte de um médico não especialista.
BM.43	O laudo definitivo deve ser revisto e assinado pelo diretor do laboratório ou por um responsável designado, qualificado e habilitado quando há um componente subjetivo ou interpretativo no resultado da análise.	Verificar a designação, a qualificação e a habilitação dos responsáveis pela revisão e pela assinatura de laudos.
BM.44	Devido aos riscos de discriminação ou estigmatização do paciente, os laudos e resultados de testes de genética molecular devem ser transmitidos de forma a preservar a confidencialidade.	Verificar se o laboratório tem uma política para a confidencialidade dos resultados, incluindo a entrega apenas para o paciente e em quais casos. Verificar se há uma política para a restrição ao uso de meios de baixa confidencialidade, como fax, intranet e Internet.
BM.45	Para a análise de ligação, o laudo para doenças moleculares hereditárias deve incluir as estimativas de risco de resultados falso negativos e falso positivos devidos a recombinações entre a(s) sonda(s) e os alelos ou mutações da doença.	Verificar os laudos de análise de ligação quanto à explicitação de risco de resultados falsamente positivos ou negativos.



NORMA PALC

Lista de Verificação em

Diagnóstico Molecular

Versão 2008 - Português



BM.46	Para testes genéticos para doenças complexas com múltiplas mutações possíveis, o laudo deve incluir em linguagem clara uma estimativa da chance de detecção da mutação e o risco residual de ser portador de uma ou mais das mutações não testadas, quando aplicável (ex: fibrose cística, câncer de mama e ovário).	Verificar os laudos de testes genéticos de doenças complexas em relação às informações fornecidas para os médicos. É recomendável a liberação de risco residual dos resultados negativos, com base nas frequências conhecidas dos alelos na população.
BM.47	Para as doenças genéticas complexas, o laudo deve incluir uma discussão das limitações dos achados e das implicações clínicas da mutação detectada (ou do resultado negativo) com respeito à herança recessiva ou dominante, o risco de recorrência, a penetrância, a gravidade e outros aspectos da correlação genótipo/fenótipo.	Verificar os laudos das doenças genéticas complexas. A liberação de laudos com resultados apenas “positivos” para uma mutação não é aceitável.
BM.48	O laudo deve incluir recomendações para que o paciente receba aconselhamento genético e esclarecimentos acerca das implicações do resultado do teste, os riscos residuais e as incertezas, e as opções médicas e reprodutivas que o resultado levanta, quando apropriado, uma vez que os resultados de testes genéticos moleculares são complexos e probabilísticos.	Verificar os laudos de doenças genéticas e as possibilidades de aconselhamento genético por profissional capacitado oferecidas pelo laboratório para o médico e para o paciente.
BM.49	Deve ser usada nomenclatura padrão internacional para designar genes e mutações. Para interpretação de novas variantes <i>missense</i> o laboratório deve seguir diretrizes existentes para a avaliação do efeito e do impacto clínico, caso existam, do gene ou da proteína detectados. Em qualquer caso a nomenclatura usada deve ser amplamente aceita e prontamente compreensível para os profissionais da área.	Verificar os critérios de escolha e a nomenclatura usada pelo laboratório para a emissão de resultados e laudos. Para genes e loci humanos deve ser usada a nomenclatura definida pela HUGO Gene Nomenclature Committee (http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/).
BM.50	Para testes de paternidade e identificação forense, a validação, os critérios de exclusão, a interpretação dos resultados e os laudos devem estar de acordo com as normas internacionalmente aceitas.	Verificar a validação e a padronização dos testes forenses de acordo com padrões como os do DNA Advisory Board Standards e as diretrizes SWGDAM.
BM.51	Para testes de paternidade o laudo deve incluir um índice individual de chance de paternidade para cada sistema genético, um índice combinado, a probabilidade de paternidade percentual, a chance de paternidade usada nos cálculos e a população usada para comparação;	Para os testes de paternidade verificar o formato dos laudos, a interpretação dos resultados e os critérios de exclusão.



NORMA PALC

Lista de Verificação em

Diagnóstico Molecular

Versão 2008 - Português



BM.52	<p>O laboratório deve manter registros suficientes e adequados acerca das condições da amostra e de sua análise, tais como:</p> <ul style="list-style-type: none">• quantidade e qualidade do ácido nucléico isolado e quantidade usada na análise;• números de lotes das endonucleases de restrição; sondas ou primers usados;• outras variáveis importantes da análise. <p>Devem ser mantidas cópias de:</p> <ul style="list-style-type: none">• laudos;• dados brutos;• membranas;• auto-radiografias;• fotografias de géis;• lâminas de hibridização <i>in situ</i>. <p>As auto-radiografias, as fotografias em gel e as lâminas de hibridização <i>in situ</i> devem ser identificadas de modo a permitir sua referência cruzada aos registros do caso em referência.</p>	<p>Verificar a completude e a rastreabilidade dos registros pertinentes às amostras e às análises.</p> <p>Verificar a completude e a rastreabilidade dos dados brutos.</p> <p>Verificar a guarda das cópias dos laudos e dos dados brutos de acordo com a legislação vigente.</p> <p>Versões eletrônicas são aceitáveis.</p>
BM.53	<p>Para os espectrofotômetros:</p> <ul style="list-style-type: none">• os filtros devem ser verificados periodicamente quanto à sua boa condição (limpeza, arranhões, etc);• a leitura dos comprimentos de onda deve ser calibrada regularmente de acordo com as instruções do fabricante;• quando forem utilizadas curvas de calibração, elas devem ser repetidas ou verificadas regularmente, quando indicado pelo controle da qualidade e após manutenções.	<p>Verificar os documentos e registros de manutenção e de calibração dos espectrofotômetros.</p>



NORMA PALC

Lista de Verificação em

Diagnóstico Molecular

Versão 2008 - Português



BM.54	<p>Para os equipamentos de detecção de sinais: (contadores de cintilação, luminômetros, densitômetros, etc):</p> <ul style="list-style-type: none">os níveis de contagem de fundo devem ser medidos e registrados a cada dia ou a cada uso;os níveis aceitáveis de contagem de fundo devem estar definidos.	Verificar os registros de monitoração das contagens de fundo.
BM.55	<p>Para os equipamentos processadores de filmes fotográficos:</p> <ul style="list-style-type: none">deve haver manutenção adequada, reagentes incluídos;as câmaras fixas devem estar seguras e niveladas;as fontes de luz UV devem se protegidas por barreiras.	Verificar a manutenção dos equipamentos processadores de filmes fotográficos. Se o equipamento ficar sob a responsabilidade de outro setor, a qualidade das auto-radiografias deve ser monitorada e o pessoal competente deve ser notificado problemas.
BM.56	<p>Para os termocicladores, os poços individuais ou uma amostra significativa deles deve ter a acurácia da temperatura verificada antes de serem postos em uso e em intervalos adequados posteriormente.</p>	Verificar a monitoração da temperatura dos termocicladores. Medida posterior da acurácia da temperatura dos poços (como produtividade da amplificação) pode ser uma opção para funcionalmente atender este critério.
BM.57	<p>Quando aplicável, devem ser tomadas medidas de proteção (EPC ou EPI) para prevenir os riscos causados por líquidos voláteis. Onde aplicável, deve haver uma cabina de biossegurança certificada pelo menos anualmente.</p>	Verificar a necessidade de medidas de segurança química e o uso de cabine de segurança e os registros que indicam seu funcionamento apropriado.
BM.58	<p>Deve haver uma sistemática para prevenir a contaminação das amostras pelo operador, incluindo medidas como, onde aplicável:</p> <ul style="list-style-type: none">utilização de cabines de PCR;fluxo unidirecional;áreas pré e pós-amplificação.	Avaliar a necessidade de prevenção da contaminação de amostras pelo operador e as medidas adotadas, avaliando sua eficácia.
BM.59	<p>Para os sistemas analíticos nos quais a contaminação ambiental por ribonuclease deva ser evitada, devem ser mantidas condições ambientais controladas.</p>	Verificar os procedimentos para a manutenção das condições ambientais livres de RNAase, onde aplicável.



NORMA PALC

Lista de Verificação em

Diagnóstico Molecular

Versão 2008 - Português



BM.60	<p>Caso se manipule produtos radioativos, as normas da CNEN para manipulação e descarte devem ser atendidas.</p> <p>As bancadas e as pias devem ser descontaminadas a cada dia de uso. A efetividade da descontaminação deve ser verificada pelo menos mensalmente.</p> <p>Deve haver políticas específicas relativas ao pessoal autorizado para manipular radionuclídeos, incluindo a conduta para a inspeção de recebimento dos materiais radiativos.</p> <p>As áreas de armazenamento e de decaimento de materiais radiativos devem ser blindadas, como requerido.</p> <p>Deve haver monitoração contínua dos níveis de radiação do ambiente e das superfícies.</p> <p>Todas as áreas e salas onde há armazenamento e manipulação de materiais radiativos devem ser sinalizadas e ter acesso controlado.</p> <p>O pessoal deve ser treinado nas rotinas de descontaminação, de manuseio seguro e de descarte adequado de radionuclídeos e de materiais contaminados.</p> <p>O PGRSS deve incluir o manuseio de material radioativo para descarte, incluindo os registros das quantidades descartadas.</p>	<p>Verificar a licença do CNEN, os documentos e os registros necessários.</p> <p>Verificar a documentação do responsável junto ao CNEN</p> <p>Verificar o PCMSO e o PPRA.</p> <p>Verificar o PGRSS.</p>
--------------	--	---

F. GLOSSÁRIO

Controle Externo: Material (amostra ou semelhante a uma amostra) usado exclusivamente para o monitoramento da acurácia ou da exatidão de um sistema analítico. Em geral obtido de fontes externas, como um programa de ensaios de proficiência, pode também ser uma amostra conhecida, validada por meio de interações com o ambiente externo ao laboratório (outros centros de pesquisas, validação clínica, etc).

Controle Interno: Material (amostra ou semelhante a uma amostra) usado exclusivamente para o monitoramento da estabilidade do sistema analítico (sua precisão ou reprodutibilidade). Em geral obtido de fontes externas, comerciais, pode também ser uma amostra conhecida, validada por meio de procedimentos do próprio laboratório (determinação de valor esperado e estabilidade, por exemplo) ou mesmo construída por engenharia genética (plasmídeo que contenha as sequência ou



NORMA PALC

Lista de Verificação em Diagnóstico Molecular

Versão 2008 - Português



mutação de interesse). Também chamado, em Biologia Molecular, de “controle exógeno”.

Controle da Reação: Material usado exclusivamente para o monitoramento do funcionamento do sistema analítico (por exemplo, para comprovar a ausência de inibidores). Pode ser obtido de fontes externas, comerciais, pode também ser uma substância caracterizável por meio de procedimentos do próprio laboratório. Também chamado, em Biologia Molecular, de “controle endógeno”.

G. SIGLAS

CNEN: Comissão Nacional de Energia Nuclear

CG: Conteúdo de Citosina e Guanina

PCR: “Polymerase Chain Reaction” ou Reação em Cadeia da Polimerase

RFLP: “Restriction Fragment Length Polimorphism”

SNP: “Single Nucleotide Polymorphism”

STR: “Short Tandem Repeat”

Tm: “Melting temperature” – Temperatura de desnaturação.

H. REFERÊNCIAS

1- Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial. Comissão de Acreditação de Laboratórios Clínicos. Norma do Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos (PALC) versão 2007.

2- College of American Pathologists .Commission on Laboratory Accreditation. Laboratory Accreditation Program – Molecular Pathology Checklist – Dec 2006.