

A. INTRODUCCIÓN

Presentación de la Directoria de Acreditación

A lo largo de mi actuación junto al Programa de Acreditación de Laboratorios Clínicos desde su creación, ha sido establecida y luego consolidada la filosofía del programa. La principal es su carácter educativo. Uno de los principios que siempre teníamos seguido es de que la norma sería “abierta”, o sea, ella siempre diría “qué hacer”, pero nunca “cómo hacer”.

A pesar de eso hemos observado durante estos años el intenso crecimiento del diagnóstico molecular y la consecuente (y bienvenida) incorporación a los laboratorios clínicos de profesionales de esta área de la investigación. A la vez, entre los auditores del PALC teníamos una mayoría de profesionales que no son expertos en técnicas de diagnóstico molecular.

Por esta razón, percibimos la necesidad de crear, aunque de manera contraria a la filosofía del PALC, la norma de Diagnóstico Molecular (checklist), que ahora presentamos. Ella ha sido basada en las directrices del “Laboratory Accreditation Program” del “College of American Pathologists”, en la experiencia de auditores PALC y en la experiencia de expertos de laboratorios clínicos y de investigación de vanguardia en el país, a los cuales agradezco una vez más.

Durante la fase de “consulta pública” ha sido cuestionado el uso de los términos “control interno” y “control de la reacción” en esta norma, en lugar de los términos conocidos en el área (“control exógeno” y “control endógeno”). Sin embargo, uno de los objetivos de la elaboración de esta norma es la aproximación del personal de Biología Molecular al PALC. La nomenclatura estándar (en el mundo) en el tema de Acreditación es Evaluación Externa de la Calidad, control interno de la calidad y control de la reacción. Esta utilización será estimulada, pero los términos que son usados en Biología Molecular se quedarán en el glosario como sinónimos y no impide la continuidad del uso en la rutina diaria del laboratorio.

Sin embargo no podríamos abandonar la nomenclatura usada y conocida en la comunidad mundial de laboratorios clínicos acreditados en razón de esta especialidad. Este “checklist” será usado en la complementación de auditorías realizadas en laboratorios clínicos que utilizan técnicas de Biología Molecular como una herramienta de mejora de comunicación entre auditores y personas del laboratorio de manera a establecer un referencial de garantía de la calidad aplicable al sector. Será revisada periódicamente, cuando sea necesario, para seguimiento de los cambios en el sector de diagnóstico molecular. Sean bienvenidos al PALC.



Luisane M. F. Vieira
Médica Patologista Clínica
Directora de Acreditación SBPC/ML
Biênio 2006/2007



NORMA PALC

Diagnóstico Molecular

Versión 2008 - Español



B. DIRECTORÍA SBPC/ML – 2006/2007

DIRECTORÍA EJECUTIVA

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

PRESIDENTES REGIONALES

REGIÓN NORTE

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

REGIÓN 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
Sergipe: Joaquim Machado

REGIÓN SURESTE

Espírito Santo: Thales Gouveia Limeira
Rio de Janeiro: Eduardo Jorge Emery Carvalho Pinto
Rio de Janeiro Interior: João Tadeu Damian Souto
São Paulo: Murilo Rezende Melo
São Paulo Região ABC: Fernando Kooro
São Paulo Interior : Paula Virginia Bottini
Minas Gerais: Eliane Lustosa Cabral Gomez
Minas Gerais Interior : Guilherme Ferreira de Oliveira

REGIÓN SUR

Rio Grande do Sul: Rubens Hemb
Santa Catarina: Eduardo Sá de Oliveira

REGIÓN CENTRO OESTE

Distrito Federal: André Gomes Ouvinha Peres
Goiás: Paulo Luiz Carvalho Francescantonio
Mato Grosso: Natasha Shhessarenko



NORMA PALC

Diagnóstico Molecular

Versión 2008 - Español



		correctivas y de los análisis críticos de la dirección.
BM. 2	El supervisor técnico del laboratorio de biología molecular y de análisis forenses debe tener entrenamiento, experiencia o especialización en el área.	Verificar el currículum del responsable técnico por la biología molecular.
BM. 3	El personal que ejecuta las técnicas de biología molecular, debe tener nivel superior y debe tener experiencia comprobada en la ejecución de técnicas de biología molecular o debe actuar, bajo supervisión directa de un profesional con esta calificación.	Verificar la actuación del personal que ejecuta las técnicas de biología molecular y analizar los respectivos currículos.
BM.4	Debe haber un entrenamiento introductorio para los principiantes en el sector y debe haber un programa de educación continuada para todo el equipo.	Verificar el plan y los registros de entrenamiento.
BM.5	La documentación pre-analítica debe incluir, cuando sea aplicable: <ul style="list-style-type: none">- consentimiento informado firmado por el paciente o por el responsable.- Raza o etnia- Heredograma	Verificar los análisis para los cuales son necesarios consentimiento informado o datos de raza o etnia y heredograma, y analizar los respectivos registros.
BM.6	Para análisis de paternidad y con fines forenses, los siguientes datos deben ser obtenidos y registrados: <ul style="list-style-type: none">- Local y fecha de la toma de muestra;- Documentación profesional o identificación de la persona que toma la muestra;- Fotografía o fotocopia del documento de identificación con fotografía de cada individuo examinado;- Hoja de datos demográficos completa y firmada de cada individuo examinado (incluyendo nombre, etnia, parentesco);- Registro de nacimiento para los menores de edad o de nacido vivo para los recién nacido;- Sinopsis del caso/investigación/fuente de la muestra;- Consentimiento informado;- Historia de transfusión en los últimos tres meses y de transplante alogénico en cualquier época previa.- Declaración de la existencia o no de	Verificar los registros de las hoja de datos demográficos de análisis de paternidad y con fines forenses.



NORMA PALC

Diagnóstico Molecular

Versión 2008 - Español



	<p>parentesco entre madre y supuesto padre o posibilidad del pariente del supuesto padre ser el verdadero padre biológico;</p> <ul style="list-style-type: none">- Firma con declaración de que las partes presenciaron la toma de muestra de la parte contraria.	
BM.7	<p>Para análisis de paternidad y con fines forenses:</p> <ul style="list-style-type: none">- La exactitud de las informaciones y de la identificación de las muestras debe ser verificada y aprobada por el individuo examinado o por su representante legal.- La calidad de la muestra debe ser evaluada y registrada al momento de recibirla, incluyendo evidencias de alteración, cantidad e identificación única.- Las muestras se deben mantener en áreas de seguridad con acceso limitado y debe haber una cadena de custodia adecuadamente documentada.	<p>Verificar los documentos y los registros de identificación de las muestras.</p> <p>Verificar los documentos y los registros relativos a la recepción de las muestras y los criterios de aceptación.</p> <p>Verificar la seguridad, la confidencialidad y la cadena de custodia de la guarda de la muestras de valor legal.</p>
BM. 8	<p>Debe haber procedimientos documentados para la prevención de pérdidas, alteraciones o contaminaciones de las muestras.</p>	<p>Verificar los procedimientos, documentos y registros de toma, identificación, transporte, almacenamiento y proceso de las muestras.</p>
BM.9	<p>Debe haber criterios documentados para el rechazo de muestras inaceptables o que puedan haber perdido su integridad, incluyendo:</p> <ul style="list-style-type: none">- Muestras mal identificadas- Material inadecuado;- Recipientes manipulados antes de entrar para los análisis de Biología Molecular. <p>En caso de que sean retiradas alícuotas de los materiales, deben haber procedimientos documentados para prevenir, inclusive, la prohibición de retornar una alícuota para el recipiente original.</p>	<p>Verificar los documentos que establecen los criterios de rechazo de muestras y de alícuotas de materiales. Verificar los registros de rechazo de muestras. Observar las prácticas de hacer alícuotas de muestras.</p>
BM.10	<p>Debe haber un procedimiento documentado para que el solicitante sea informado</p>	<p>Verificar los documentos relacionados con el rechazo de muestras y los respectivos</p>



NORMA PALC

Diagnóstico Molecular

Versión 2008 - Español



	rápidamente en el caso de que la muestra sea inadecuada.	registros de comunicación al solicitante.
BM.11	Debe hacer un procedimiento documentado para la identificación de los tipos de materiales y muestras de los pacientes y sus alícuotas a lo largo de todas las fases analíticas, incluyendo la recepción de las muestras, la extracción de ácidos nucleicos, cuantificación de los ácidos nucleicos (cuando aplicable), la hibridización, la detección y el almacenamiento. Cada recipiente de muestra primaria y de alícuotas debe posibilitar la identificación única del paciente y la rastreabilidad de la toma de la muestra, pero el tipo de sistema adoptado es de libre elección del laboratorio.	Verificar el sistema de identificación de muestras y de sus alícuotas.
BM. 12	Las muestras de pacientes deben ser procesadas inmediatamente o conservadas de manera a minimizar su degradación hasta el momento del análisis.	Verificar el documento que establece las condiciones de conservación de las muestras. Verificar los registros de almacenamiento de muestras incluyendo los registros de temperatura. Evaluar los sitios de almacenamiento de muestras incluyendo la organización, rastreabilidad y temperatura.
BM.13	Para los métodos propios (<i>in house</i>) debe haber documentación y registro de estudios de validación de las características de desempeño realizados antes de su implantación que incluyan, cuando sea aplicable: <ul style="list-style-type: none">- Sensibilidad diagnóstica (clínica);- Sensibilidad analítica;- Especificidad diagnóstica (clínica);- Especificidad analítica;- Precisión;- Linealidad (ensayos cuantitativos);- Rango reportable de resultados de pacientes;- Intervalo de referencia;- Cualquier otra característica de desempeño aplicable.	Verificar la lista de análisis propios y los respectivos protocolos de validación, incluyendo documentos, datos brutos y conclusiones. Verificar si la documentación de la validación de los análisis genéticos incluye las características de desempeño clínicos: sensibilidad y especificidad diagnósticas, valores predictivos positivos y negativos en las diversas poblaciones blanco; contexto clínico para uso del examen (screening, diagnóstico, monitoreo), asociaciones de genotipos/fenotipos cuando estas varían en relación a determinadas mutaciones o polimorfismos; factores genéticos, ambientales u otros que modifican las



NORMA PALC

Diagnóstico Molecular

Versión 2008 - Español



	<p>Para los métodos propios (<i>in house</i>) para análisis genéticos, los protocolos de validación deben incluir la documentación sobre:</p> <ul style="list-style-type: none">- Exactitud;- Sensibilidad analítica;- Especificidad analítica;- Precisión;- Características clínicas de desempeño (revisiones de la literatura científica en publicaciones, revistas por pares o sumario de los datos de los estudios propios).	<p>expresiones clínicas de las alteraciones genéticas detectadas; penetración de la enfermedad.</p>
BM.14	<p>Para los métodos propios (<i>in house</i>) los estudios de validación deben incluir, cuando sea aplicable:</p> <ul style="list-style-type: none">- Muestras representativas de todos los resultados (genotipos) accesibles;- Un número representativo de cada tipo de muestra que será analizada;- La comparación de los resultados obtenidos por el método que se está testando con resultados obtenidos por un método comparativo válido o por medio de la validación clínica.	<p>Evaluar la gama de muestras conocidas usadas para la validación de los testes genéticos. Para los ensayos para enfermedades genéticas con un número limitado de genotipos posibles, todos los genotipos deben ser testados. Para los ensayos de enfermedades genéticas con considerable heterogeneidad alélica, deben ser testados el mayor porcentaje posible de genotipos.</p> <p>Verificar si los estudios de validación incluyen un número representativo de cada tipo de muestra que será analizada, por ejemplo:</p> <ul style="list-style-type: none">- Sangre total;- Tejido fresco;- Tejido congelado;- Bloque de parafina;- Muestras prenatales o perinatales <p>Verificar los estudios de comparación entre métodos. El método comparativo puede ser del propio laboratorio o de un laboratorio de apoyo o de referencia. Cuando no haya disponibilidad de método comparativo, la sensibilidad y la especificidad deben ser evaluadas en función del diagnóstico clínico del paciente.</p>
BM.15	<p>Para métodos propios (<i>in house</i>) para análisis cualitativos, los valores de referencia</p>	<p>Para los análisis cualitativos (ej. Ensayos para mutaciones germinativas) verificar en</p>



NORMA PALC

Diagnóstico Molecular

Versión 2008 - Español



	(resultados normales versus resultados anormales) y los resultados reportables (ej. Tipo salvaje homocigoto; heterocigoto u homocigoto mutante) deben ser definidos. Cuando los valores de referencia dependen de la situación clínica, las directrices para la interpretación de los resultados de pacientes deben ser definidas y documentadas.	los documentos y en los resultados: <ul style="list-style-type: none">- Valores de referencia;- Resultados reportables;- Directrices para interpretación.
BM.16	Para métodos propios (<i>in house</i>) para análisis cuantitativos, los valores de referencia (valores esperados para la población "normal") y los rangos reportables (intervalo de valores que pueden ser reportados) deben estar definidos.	Para los análisis cuantitativos, verificar en los documentos y en los resultados: <ul style="list-style-type: none">- valores de referencia;- intervalo analítico (IA);- como abordar muestras encima o debajo del IA (por ejemplo $a < x$ o $> y$; "positivo bajo" o "positivo alto" más una explicación de que valores fuera de la linealidad no pueden ser cuantificados, o instrucciones para la concentración o dilución de muestras). Ej. ensayos para tejido tumoral, quimerismo o carga patogénica (carga viral).
BM. 17	Para los análisis comerciales, el laboratorio debe verificar las características de desempeño informadas por los fabricantes.	Verificar los criterios y los registros de las verificaciones de desempeño de los análisis comerciales
BM.18	Cuando el laboratorio realice modificaciones en los procedimientos recomendados por el fabricante, debe haber una validación de las modificaciones realizadas, de forma tal que compruebe que el desempeño obtenido es equivalente o superior al desempeño informado por el fabricante.	Verificar si los procedimientos usados para los análisis comerciales corresponden a los preconizados por el fabricante. En caso de modificaciones, verificar los documentos y los registros correspondientes a esta validación.
BM.19	El Director del Laboratorio, o el responsable designado, debe analizar críticamente y aprobar todas las validaciones de todos los métodos antes de ser puestos en uso en la rutina.	Verificar las aprobaciones de las validaciones de las rutinas de todos los métodos, en relación a las fechas de inicio de uso en la rutina.
BM.20	En relación a los reactivos de ácidos nucleicos usados para análisis genéticos o moleculares (como sondas de DNA o iniciadores (primers) de PCR), debe haber documentos de todos los datos relevantes, cuando sea aplicable, en relación a:	Verificar la documentación referente a estos reactivos. Tamaño y secuencia puede que no estén disponibles cuando estas informaciones sean objeto de propiedad industrial.

	<ul style="list-style-type: none"> - Primers: tamaño, contenido de CG, Tm, secuencia, localización genómica, concentración molar del estoque, temperatura usada para anillado y para hibridización; - Sondas: secuencia parcial o total de nucleótidos, localización genómica, vector de clonación, temperatura de hibridización y método de preparación 	
<p>BM.21</p>	<p>En relación a los análisis moleculares cuantitativos, el laboratorio debe:</p> <ul style="list-style-type: none"> - tener los métodos para el cálculo de los resultados y unidades descritas de manera clara, incluyendo las fórmulas usadas y ejemplos de cálculos; - el rango de trabajo (rango dinámico) del ensayo debe ser definido y el desempeño debe ser monitoreado a cada corrida con el uso de controles internos negativo y positivos (niveles recomendables: negativo y positivos bajo y alto). - cuando el ensayo genere una curva de desnaturalización debe haber criterios para su validación. 	<ul style="list-style-type: none"> - Verificar los documentos (POPs) de los análisis moleculares cuantitativos y los registros respectivos.
<p>BM.22</p>	<p>Para los sistemas analíticos moleculares, tanto cualitativos como cuantitativos, debe haber documentos para la interpretación de los resultados que incluyan los criterios para la verificación del desempeño de cada ensayo de acuerdo con las características de cada corrida analítica, antes de entregar los resultados de los pacientes. Debe haber registros de los análisis críticos efectuados.</p>	<p>Para los sistemas cuantitativos, verificar los documentos y registros referentes a:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Evaluación de la sensibilidad y de la linealidad del ensayo de acuerdo con estándares pre-establecidos; - Evaluación de la presencia de inhibidores de la reacción del paciente; - Evaluación de los datos brutos y de su coherencia con los datos calculados. <p>Para los sistemas cualitativos, verificar los documentos y los registros en relación a:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Evaluación del padrón de las bandas en relación al estándar esperado; - Temperatura de desnaturalización; - Punto de corte (<i>cutoff</i>) numéricos para distinguir los resultados



NORMA PALC

Diagnóstico Molecular

Versión 2008 - Español



		positivos y negativos.
BM.23	Para todos los sistemas analíticos que incluyan una o más fases de detección de señales cuantitativos deben haber criterios para que la realización y evaluación de la(s) calibración(es), sea (n) efectuada(s) por el fabricante o por el laboratorio.	Verificar los documentos y registros de calibración de los sistemas analíticos cuantitativos en uso.
BM.24	Para los análisis cualitativos, deben ser corridos controles internos negativos y positivos y debe haber una forma sistemática de verificación de la sensibilidad analítica (detección de niveles bajos de secuencias blanco).	Verificar el uso de controles negativos y positivos para cada analito en cada corrida. Para algunos sistemas analíticos (por ejemplos grandes paneles de mutación de fibrosis quística) este procedimiento puede no ser factible. En estos casos, puede ser usada una forma sistemática de intercambio de controles positivos.
BM.25	Para análisis cualitativos que usan un valor de punto de corte (cutoff) para la distinción entre los resultados positivos y negativos (ej. detección de virus en escobillones (swabs)), el valor del punto de corte debe ser evaluado inicialmente y cada seis meses de ahí en adelante. La verificación del punto de corte también debe ser realizada a cada cambio de lote de los reactivos críticos, después de mantenimientos correctivos con cambio de componentes críticos y cuando sea indicado por el control de la calidad.	Verificar la evaluación inicial y las evaluaciones periódicas del punto de corte. Si el valor del calibrador o del verificador de calibración en uso es próximo del valor de corte, el requisito está atendido.
BM.26	Los ácidos nucleicos deben ser extraídos y purificados por medio de métodos reportados en la literatura, recomendados por el fabricante o validados por el propio laboratorio (<i>in house</i>). La cantidad y la integridad de DNA de alto peso molecular debe ser evaluada por electroforesis en gel u otro método comparable, cuando sea aplicable, o sea, para procedimiento que dependa de gran cantidad de DNA disponible.	Verificar los documentos, los procesos y los registros de la calidad y de la cantidad de los ácidos nucleicos extraídos. Verificar si el laboratorio realiza análisis que dependen de gran cantidad de DNA y verificar como esta cantidad es evaluada (ej. análisis tipo Southern Blot o aislamiento de DNA para depósitos en bancos de DNA).
BM.27	Para sistemas analíticos que tengan como blanco el RNA humano (ej. investigación de transcripción de genes), la integridad de RNA de la muestra debe ser evaluada.	Verificar si el laboratorio tiene una sistemática que compruebe la capacidad de detección del RNA humano y verificar el procedimiento usado para evaluación



NORMA PALC

Diagnóstico Molecular

Versión 2008 - Español



		de la calidad de la muestra (ej. espectrofotometría o utilización de otro gen blanco para la amplificación del RNA).
BM.28	Los procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos (ej. PCR) deben ser planeados de forma que minimicen la contaminación por “ <i>carry-over</i> ” y resultados falso-positivos por medio del uso de barreras físicas y de procedimientos para minimizar los aerosoles (ej. cambio frecuente de guantes, pipetas exclusivas con barreras o tipo de desplazamiento positivo). Debe haber barreras físicas adecuadas entre las muestras pre y post-amplificación para evitar la contaminación con amplicones. Las muestras deben ser ordenadas así: muestras de pacientes, controles positivos y controles negativos.	Verificar las barreras físicas y de procedimientos usadas para minimizar la contaminación (ej. destrucción enzimática de productos de amplificación, medida en tiempo real de los productos de amplificación).
BM.29	En todos los procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos deben ser corridos controles de la reacción (controles “endógenos”) capaces de detectar reacciones falsamente negativas debidas a la presencia de inhibidores, cuando sea aplicable. Para análisis cuantitativos, la cuestión de la inhibición parcial también debe ser evaluada.	Verificar como el laboratorio hace la distinción entre resultados verdaderamente negativos y resultados falsamente negativos. Verificar como son registrados y analizados críticamente los resultados falsamente negativos. Métodos extremadamente robustos, después de consideraciones acerca de las implicaciones de resultados falsamente negativos pueden tener parámetros más laxos para la realización del control de la reacción (“endógeno”).
BM.30	La complitud y la especificidad de la digestión usando endonucleasas de restricción deben ser evaluadas (cuando aplicable). El tratamiento del DNA con endonucleasas de restricción debe ser realizado durante periodo de tiempo y condiciones adecuadas y controladas.	Evaluar los procedimientos usados para el uso de enzimas. Por ejemplo, el examen de nuevos lotes de enzimas con muestras examinadas por lotes anteriores (ej. a cada nuevo lote de enzimas y a cada nueva corrida).
BM.31	Para los análisis de las enfermedades genéticas, debe haber información adecuada acerca del gen a ser examinado en relación a su secuencia salvaje, las mutaciones reportadas y sus polimorfismos. Los análisis de secuenciamento del DNA, deben ser restringidas a enfermedades genéticamente bien caracterizadas en la literatura y en los bancos de los datos genómicos sobre la región blanco.	Verificar los documentos acerca de los análisis para enfermedades genéticas.



NORMA PALC

Diagnóstico Molecular

Versión 2008 - Español



BM.32	Los ensayos de secuenciamiento deben ser optimizados de forma que garantice la presencia de señal detectable en toda la longitud de la región blanco y la rápida detección de secuencias variantes, especialmente de aquellas en estado de heterocigocidad (ej. secuenciamiento bidireccional).	Verificar los ensayos de secuenciamiento y evaluar la garantía de la calidad de la visualización de todos los blancos.
BM.33	Las auto-radiografías y las fotografías de geles deben presentar buena resolución, fondo ("background) débil, señal claro, ausencia de burbujas y otros artefactos, en fin, una calidad que permita la interpretación correcta de los resultados.	Evaluar la calidad de las auto-radiografías y las fotografías de geles.
BM.34	En relación a la electroforesis en gel: <ul style="list-style-type: none">- La calidad (integridad) del DNA de alto peso molecular debe ser evaluado cuando sea aplicable;- Cantidades estandarizadas de ácido nucleico deben ser colocadas en los geles, cuando sea posible;- Se deben usar en cada corrida, marcadores de peso molecular conocido en intervalo compatible con el de las bandas esperadas;- Marcadores visuales o de fluorescencia se deben usar para marcar el punto final;- Deben haber criterios objetivos para la interpretación de auto-radiografías o de la electroforesis en gel.	Verificar: <ul style="list-style-type: none">- La calidad (integridad) del DNA de alto peso molecular;- La estandarización de las cantidades de ácido nucleico;- El uso de marcadores de peso molecular conocido en cada corrida;- El uso de marcadores visuales o de fluorescencia para marcar el punto final;- Criterios objetivos para la interpretación de auto-radiografías o de la electroforesis en gel.
BM.35	En relación a la electroforesis capilar: <ul style="list-style-type: none">- Debe haber criterios para validar e interpretar los datos del secuenciamiento preliminar (Primario)- Debe haber una documentación adecuada y actualizada del banco de datos de alelos conocidos;- Debe ser determinada la secuencia de bandas "sense" y "anti-sense" en heterocigotos, alelos raros y combinaciones raras de alelos.- El banco de datos para la determinación de alelos debe constar de la documentación y debe ser actualizado cuando sea aplicable.	Verificar los documentos y los registros relacionados a la electroforesis capilar y evaluar la existencia de criterios para la interpretación y aceptabilidad de los datos del secuenciamiento que incluyan: <ul style="list-style-type: none">- Posicionamiento de segmentos no polimórficos;- Definición de la región de secuenciamiento;- Criterios de la intensidad de picos;- Fluctuación de línea de base;- Razón ruido/señal;- Formato de los picos.

	<ul style="list-style-type: none"> - Cuando apenas una banda sea secuenciada en los heterocigotos, el proceso de validación del sistema analítico debe presentar evidencias de que apenas una banda genera resultados exactos. En este caso se recomienda que haya confirmación periódica de las bandas complementares. 	
BM.36	<p>En relación a la PCR en tiempo real (<i>Real Time PCR</i>):</p> <ul style="list-style-type: none"> - para análisis que generen resultados basados en T_m, deben ser definidos y monitoreados intervalos de temperatura adecuadamente estrechos ($\leq \pm 2,5\text{ }^\circ\text{C}$); - para análisis cuantitativos, los resultados de control interno deben estar dentro del intervalo específico de cada corrida; - lotes nuevos de reactivos fluorescentes conteniendo oligonucleotidos deben ser examinados antes o cuando sean puestos en uso; - Para sistemas analíticos que midan múltiples fluorocromos, se deben tomar precauciones para identificar y corregir señales espurias de un canal para otro; - Nuevas versiones de softwares deben ser validadas con el uso de controles conocidos 	<p>Para los ensayos de PCR en tiempo real, verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> - el monitoreo de la temperatura; - la adecuación de los controles internos; - la verificación de lotes nuevos de reactivos; - el desempeño de los sistemas de lectura; - la validación del método y de nuevas versiones de software; - el control de la calidad y las respectivas acciones correctivas.
BM.37	<p>En relación a los ensayos tipo “arreglo” (Microarray):</p> <ul style="list-style-type: none"> - La integridad del ácido nucleico así como su marcación (sondas de hibridización) debe ser verificada y monitoreada; - La calidad de los arreglos debe ser verificada de acuerdo con las especificaciones del fabricante; - Para los ensayos cuantitativos (expresión génica, carga patogénica) debe ser usado un control de nivel positivo bajo para una o más sondas y también un blanco de reacción a 	<p>Evaluar la documentación y los registros relacionados a:</p> <ul style="list-style-type: none"> - control (es) utilizado (s) en la metodología (ej: control de la reacción (endógeno) positivo, verificación subjetiva del resultado en gel de agar/electroforesis capilar o aún por detección de señal fluorescente). - verificación de cada sonda a cada lote (ej: uso de oligonucleotidos marcados que se hibridizan a todas las sondas; mezcla de oligonucleotidos específicos para



NORMA PALC

Diagnóstico Molecular

Versión 2008 - Español



	<p>cada corrida;</p> <ul style="list-style-type: none">- Las funciones del software usado para analizar los datos deben ser verificadas periódicamente.	<p>cada sonda o mezcla de muestras controles que se hibridizan con cada sonda).</p> <ul style="list-style-type: none">- utilización alternada de sondas y un blanco a cada corrida;- control de la calidad realizado según el fabricante. <p>Debido a la complejidad de la metodología, el auditor debe evaluar en conjunto con el auditado todas las evidencias relacionadas con el adecuado desempeño analítico y juntos deben procurar identificar eventuales puntos deficientes en la sistemática del control usado.</p>
BM.38	<p>Los resultados de los análisis de DNA (paternidad e identificación génica por FLP, STR, SNP) deben ser interpretados en doble conferencia, de manera independiente.</p>	<p>Verificar la política, los documentos y los registros de las interpretaciones en duplicado e independiente de los resultados de los análisis de DNA.</p>
BM.39	<p>Para la hibridización <i>in situ</i> fluorescente (FISH):</p> <ul style="list-style-type: none">- debe haber políticas y procedimientos documentados para la validación de las sondas;- debe haber procedimientos documentados para la graduación de la escala de resultados y los análisis deben ser graduados de forma preconizada;- deben ser usados y registrados loci controle (internos o externos) para cada análisis.- deben ser retenidas imágenes digitalizadas o fotográficas como registros para la documentación de todos los análisis (por lo menos una célula por análisis con resultados normales y por lo menos dos células por análisis con resultados anormales).	<p>Verificar los documentos y los registros relativos a FISH.</p> <p>Cuando se espera blancos en cromosomas normales, un control interno para aquel blanco debe ser usado en cada hibridización.</p> <p>En el caso que se use una sonda que no produzca un señal de control interno (ej: sonda para el cromosoma Y en mujeres) otra muestra con el blanco debe ser corrida en paralelo.</p> <p>La lámina debe recibir una evaluación cito o histopatológica para confirmar que la muestra es representativa de la lesión.</p>
BM.40	<p>Para la hibridización <i>in situ</i> (ISH) de campo claro:</p> <ul style="list-style-type: none">- las condiciones de pre-tratamiento y	<p>Verificar los documentos y registros relativos a la ISH.</p> <p>El ajuste de las condiciones del ensayo</p>

	<p>las condiciones de análisis deben ser verificadas para cada muestra, con el uso de sondas controle positivas adecuadas contra los blancos endógenos;</p> <ul style="list-style-type: none"> - condiciones libres de ribonucleasa deben ser mantenidas en todos los análisis para la detección del RNA blanco en los tejidos o para el uso de sondas de RNA; - para análisis realizados en muestras de citología o histología, el resultado interpretativo debe incluir la correlación con los hallazgos morfológicos. - el resultado debe proveer una interpretación adecuada de los resultados de la ISH. 	<p>para demostrar la señal con un control positivo endógeno permite la interpretación de un resultado negativo y la eliminación de muestras inadecuadas. La RNAsa es ubicua y el RNA es extremadamente susceptible a la degradación. Verificar las precauciones tomadas para evitar esta interferencia. La lámina debe recibir una evaluación cito o histopatológica para confirmar que la muestra es representativa de la lesión.</p>
<p>BM.41</p>	<p>Se deben mantener estadísticas de los resultados de los análisis moleculares de manera que permita el seguimiento del desempeño analítico, la evaluación de las tendencias poblacionales y la realización de estudios comparativos, cuando sea aplicable.</p>	<p>Por ejemplo, verificar las estadísticas de:</p> <ul style="list-style-type: none"> - % de hallazgos normales y anormales, - frecuencia de alelos. <p>Verificar los resultados de estudios comparativos.</p>
<p>BM.42</p>	<p>En relación a la fase post-analítica:</p> <ul style="list-style-type: none"> - se deben generar resultados preliminares, cuando sea apropiado; - discrepancias entre los resultados preliminares y los resultados finales deben ser investigados y documentados; - discrepancias entre los hallazgos de la biología molecular y la clínica y otros hallazgos de laboratorio deben ser investigados y documentados y se deben tomar acciones correctivas cuando sean indicadas. - deben haber protocolos 	<p>Verificar los pasos de la fase post-analítica, su documentación y los registros pertinentes. Evaluar la rastreabilidad de los datos que componen el resultado. Evaluar si los resultados emitidos permiten una interpretación adecuada por parte de un médico no especialista.</p>



NORMA PALC

Diagnóstico Molecular

Versión 2008 - Español



	<p>documentados para la entrega de los resultados;</p> <ul style="list-style-type: none">- el resultado final debe incluir un resumen de los métodos, de los loci o mutaciones examinadas, la interpretación analítica y la interpretación clínica cuando sea apropiado.	
BM.43	<p>El informe de resultado definitivo debe ser revisado y firmado por el director del laboratorio o por un responsable designado, calificado y habilitado cuando hay un componente subjetivo o interpretativo en el resultado del análisis.</p>	<p>Verificar la designación, calificación y la habilitación de los responsables por la revisión y por la firma de los informes de resultados.</p>
BM.44	<p>Debido a los riesgos de discriminación o estigmatización del paciente, los informes y resultados de los análisis de genética molecular deben ser transmitidos de manera que preserve la confidencialidad.</p>	<p>Verificar si el laboratorio tiene una política para la confidencialidad de los resultados, incluyendo la entrega apenas para el paciente y en cuales casos. Verificar si hay una política para la restricción al uso de medios de baja confidencialidad como fax, intranet e internet.</p>
BM.45	<p>Para análisis de ligación, el informe de resultado para enfermedades moleculares hereditarias debe incluir las estimativas de riesgo de resultados falso negativos y falso positivos debidos a recombinaciones entre las sondas y los alelos o mutaciones de la enfermedad.</p>	<p>Verificar los informes del análisis de ligación sobre la explicación del riesgo de resultados falsamente positivos o negativos.</p>
BM.46	<p>Para análisis genéticos de enfermedades complejas con múltiples mutaciones posibles, el informe de resultados debe incluir en lenguaje claro, una estimativa del chance de detección de la mutación y el riesgo residual de ser portador de una o más mutaciones no examinadas, cuando sea aplicable (por ejemplo, fibrosis quística, cáncer de seno y ovario).</p>	<p>Verificar los informes de análisis genéticos de enfermedades complejas en relación a las informaciones dadas a los médicos. Es recomendable colocar el riesgo residual de los resultados negativos, con base en las frecuencias conocidas de los alelos en la población.</p>
BM.47	<p>Para las enfermedades genéticas complejas, el informe de resultado debe incluir una discusión de las limitaciones de los hallazgos y de las implicaciones clínicas de las mutación detectadas (ó del resultado negativo) con respecto a la herencia</p>	<p>Verificar los informes de las enfermedades genéticas complejas. La entrega de resultados apenas "positivos" para una mutación es inaceptable.</p>



NORMA PALC

Diagnóstico Molecular

Versión 2008 - Español



	recesiva o dominante, el riesgo de recurrencia, la penetrancia, la gravedad y otros aspectos de la correlación genotipo-fenotipo.	
BM.48	El informe de resultados debe incluir recomendaciones para que el paciente reciba consejería genética y aclaración acerca de las implicaciones del resultado del examen, los riesgos residuales y las incertidumbres y las opciones médicas y reproductivas que el resultado da, cuando sea apropiado, una vez que los resultados de los análisis genéticos moleculares son complejos y probabilísticas.	Verificar los informes de enfermedades genéticas y las posibilidades de consejería genética por profesional capacitado ofrecidas por el laboratorio para el médico y para el paciente.
BM.49	Debe ser usada nomenclatura de patrón internacional para designar genes y mutaciones. Para la interpretación de nuevas variantes <i>missense</i> , el laboratorio debe seguir directrices existentes para la evaluación del efecto y del impacto clínico, en el caso que existan, del gen o de las proteínas detectadas. De cualquier manera, la nomenclatura usada debe ser ampliamente aceptada y rápidamente comprensible para los profesionales del área.	Verificar los criterios de elección y la nomenclatura usada por el laboratorio para la emisión de resultados. Para genes y loci humanos se debe usar la nomenclatura definida por la HUGO Gene Nomenclature Committee (http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/).
BM.50	Para los análisis de paternidad e identificación forense, la validación, los criterios de exclusión, la interpretación de los resultados y los resultados, deben estar de acuerdo con normas aceptadas internacionalmente.	Verificar la validación y la estandarización de los análisis forenses de acuerdo con los patrones como los del "DNA Advisory Board Standards" y las directrices SWGDAM.
BM.51	Para análisis de paternidad el informe de resultados debe incluir un índice individual de chance de paternidad para cada sistema genético, un índice combinado, la probabilidad de paternidad porcentual, el chance de paternidad usada en los cálculos y la población usada para comparación.	Para análisis de paternidad de verificar el formato de los resultados, la interpretación de los resultados y los criterios de exclusión.
BM.52	El laboratorio debe mantener registros suficientes y adecuado acerca de las condiciones de muestra y de su análisis, tales como:	Verificar la complitud y la rastreabilidad de los registros pertinentes a las muestras y a los análisis. Verificar la complitud y rastreabilidad de los datos brutos.

	<ul style="list-style-type: none"> - Cantidad y calidad del ácido nucleico aislado y la cantidad usada en el análisis; - Número de lotes de las endonucleasas de restricción; sondas o primers usados; - Otras variables importantes del análisis <p>Se deben mantener copias de:</p> <ul style="list-style-type: none"> - resultados; - datos brutos; - membranas; - auto-radiografías; - fotografías de geles; - láminas de hibridización <i>in situ</i>. <p>Las auto-radiografías, las fotografías en gel y las láminas de hibridización <i>in situ</i> se deben identificar de modo que permitan su referencia cruzada a los registros del caso en referencia.</p>	<p>Verificar el almacenamiento de las copias de los resultados y de los datos brutos de acuerdo con la legislación vigente. Versiones electrónicas son aceptables.</p>
BM.53	<p>Para los espectrofotómetros:</p> <ul style="list-style-type: none"> - los filtros deben ser verificados periódicamente sobre sus buenas condiciones (limpieza, arañazos, etc.). - la lectura de las longitudes de onda debe ser calibrada regularmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante; - cuando sean utilizadas curvas de calibración, ellas deben ser repetidas o verificadas regularmente, según como sea indicado por el control de la calidad y después de cada mantenimiento. 	<p>Verificar los documentos y los registros del mantenimiento y de la calibración de los espectrofotómetros.</p>
BM.54	<p>Para los equipos de detección de señales: (contadores de cintilación, luminómetros, densitómetros, etc):</p> <ul style="list-style-type: none"> - los niveles de conteo de fondo deben ser medidos y registrado cada día o a cada uso; - los niveles aceptables de conteo de fondo deben estar definidos. 	<p>Verificar los registros de monitorización de los conteos de fondo.</p>



NORMA PALC

Diagnóstico Molecular

Versión 2008 - Español



BM.55	<p>Para los equipos procesadores de películas fotográficas:</p> <ul style="list-style-type: none">- debe haber mantenimiento adecuado, incluyendo los reactivos;- las cámaras fijas deben estar seguras y niveladas;- las fuentes de luz UV deben ser protegidas por barreras.	<p>Verificar el mantenimiento de los equipos procesadores de películas fotográficas. Si el equipo está bajo la responsabilidad de otro sector, la calidad de las auto-radiografías debe ser monitoreada y el personal competente debe ser notificado si hay problemas.</p>
BM.56	<p>Para los termocicladores, los pozos individuales o una muestra significativa de ellos, la exactitud de la temperatura debe ser verificada antes de ser puestos en uso y posteriormente, a intervalos adecuados.</p>	<p>Verificar la monitorización de la temperatura de los termocicladores. Medida posterior de la exactitud de la temperatura de los pozos (como productividad de la amplificación) puede ser una opción para funcionalmente atender este criterio.</p>
BM.57	<p>Cuando sea aplicable, se deben tomar medidas de protección (EPC o EPI) para prevenir los riesgos causados por líquidos volátiles. Donde sea aplicable, debe haber una cámara de bioseguridad certificada por lo menos anualmente.</p>	<p>Verificar la necesidad de medidas de seguridad química y el uso de la cámara de seguridad y los registros que indican su funcionamiento apropiado.</p>
BM.58	<p>Debe haber una sistemática para prevenir la contaminación de las muestras por el operador, incluyendo, donde sea aplicable, medidas como:</p> <ul style="list-style-type: none">- utilización de cabinas de PCR;- flujo unidireccional;- áreas de pre y post-amplificación.	<p>Evaluar la necesidad de prevención de la contaminación de las muestras por el operador y las medidas adoptadas, evaluando su eficacia.</p>
BM.59	<p>Para los sistemas analíticos en los cuales la contaminación ambiental por ribonucleasas debe ser evitada, se deben mantener condiciones ambientales controladas.</p>	<p>Verificar los procedimientos para el mantenimiento de las condiciones ambientales libres de RNAsa, donde sea aplicable.</p>
BM.60	<p>En el caso de manipulación de productos radioactivos, las normas de la CNEN para la manipulación y desecho de materiales se deben atender.</p> <p>Las mesas y los lavamanos deben ser descontaminados todos los días en que sean usados. La efectividad de la descontaminación debe ser verificada por lo menos mensualmente. Debe haber políticas específicas relacionadas al personal</p>	<p>Verificar la licencia del CNEN, los documentos y los registros necesarios. Verificar la documentación del responsable frente al CNEN. Verificar el PCMSO y el PPRA. Verificar el PGRSS.</p>

	<p>autorizado para manipular radionucleótidos, incluyendo la conducta para la inspección al recibir los materiales radiactivos.</p> <p>Las áreas de almacenamiento y de decaimiento de materiales radiactivos deben ser blindadas, como requerido.</p> <p>Debe haber monitorización continua de los niveles de radiación del ambiente y de las superficies.</p> <p>Todas las áreas y salas donde hay almacenamiento y manipulación de materiales radiactivos, deben ser señalizadas y tener acceso controlado.</p> <p>El personal debe ser entrenado en las rutinas de descontaminación, de manipulación seguro y desecho adecuado de radionucleótidos y de materiales contaminados.</p> <p>El PGRSS debe incluir la manipulación de material radiactivo para el desecho, incluyendo los registros de las cantidades descartadas.</p>	
--	---	--

F. GLOSARIO

Control externo: Material (muestra o similar a una muestra) usado exclusivamente para monitorear la precisión o la exactitud de un sistema analítico. En general es obtenido de fuentes externas como un programa de ensayos de eficiencia, puede también ser una muestra conocida, validada por medio de interacciones con el ambiente externo del laboratorio (otros centros de investigación, validación clínica, etc.).

Control interno: Material usado exclusivamente para el monitoreo de la estabilidad del sistema analítico (su precisión o reproducibilidad). En general se obtiene de fuentes externas, comerciales, puede también ser una muestra conocida, validada por medio de procedimientos del propio laboratorio (determinación del valor esperado y estabilidad por ejemplo). También denominado, en Biología Molecular, de “control exógeno”.

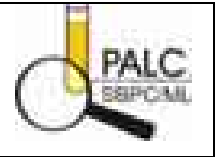
Control de la Reacción: Material usado exclusivamente para el monitoreo del funcionamiento del sistema analítico (por ejemplo, para comprobar la ausencia de inhibidores). Puede ser obtenido de fuentes externas comerciales, puede también ser una sustancia caracterizable por medio de procedimientos del propio laboratorio. También denominado, en Biología Molecular, de “control endógeno”.



NORMA PALC

Diagnóstico Molecular

Versión 2008 - Español



Obs.: Definiciones adicionales deben ser consultadas en el glosario de la norma PALC versión 2007.

G. SIGLAS

CNEN: Comisión Nacional de Energía Nuclear

CG: Contenido de Citocina e Guanina

PCR: "Polymerase Chain Reaction" o Reacción en Cadena de la Polimerasa.

RFLP: Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción.

SNP: Polimorfismo de nucleótido único

STR: Repetición corta en tándem.

Tm: Temperatura de "melting". Temperatura de desnaturalización

H. REFERENCIAS

1. Sociedad Brasileña de Patología Clínica/Medicina de Laboratorio. Comisión de Acreditación de Laboratorios Clínicos. Norma del Programa de Acreditación de Laboratorios Clínicos (PALC) versión 2007;
2. College of American Pathologists. Commission on Laboratory Accreditation. Laboratory Accreditation Program – Molecular Pathology Checklist – Dec 2006.