



Lista de Orientação em

# Diagnóstico Molecular

Segunda versão – 2018

Edição eletrônica: Lista de Orientação em Diagnóstico Molecular - Segunda versão - 2018

Páginas: 56

Logotipos:

Copyright © PALC - Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos

Copyright © Sociedade Brasileira de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial (SBPC/ML)

Revisão de texto: Editora VEGA Conteúdo & Design

Projeto gráfico, diagramação e capa: Rodrigo Paiva

Todos os direitos reservados.

Nenhuma parte desta edição poderá ser reproduzida, por qualquer processo, sem a permissão expressa da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).

Edição – 2018

## Autores

### Gustavo Barcelos Barra

Farmacêutico clínico industrial; doutor em Ciências da Saúde pela Universidade de Brasília (UnB); professor-orientador do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da UnB; coordenador de pesquisas do Sabin Medicina Diagnóstica.

### Nelson Gaburo Júnior

Farmacêutico bioquímico; mestre em Ciências da Saúde pela Universidade de São Paulo (USP); doutor em Genética Molecular – Departamento de Moléstias Infecciosas pela Faculdade de Medicina da USP; MBA em Gestão de Negócios pela Fundação Instituto de Administração (FIA); auditor voluntário do College of American Pathologists (CAP); gerente-geral DB Molecular do Diagnósticos do Brasil S/A.

### João Bosco Oliveira Filho

Médico formado pela Universidade de Pernambuco (UPE); fellowship em Imunologia Clínica e Laboratorial no National Institutes of Health, EUA; doutor em Patologia pela Universidade de São Paulo (USP); doutor em Imunologia Experimental pela Universidade de Amsterdã; diretor-executivo da Genomika Diagnósticos.

## Revisão

### Luisane Maria Falci Vieira

Patologista clínica; MBA em Gestão da Saúde; membro da Comissão de Acreditação de Laboratórios Clínicos.

# Sumário

Autores .....	3
Revisão.....	3
Introdução .....	5
Instruções de uso.....	6
1. Organização geral e gestão: .....	7
2. Gestão do sistema da qualidade:.....	7
3. Gestão do controle da documentação: .....	8
4. Gestão dos registros técnicos e da qualidade .....	9
5. Gestão das não conformidades, das reclamações e da melhoria contínua .....	10
6. Gestão dos laboratórios de apoio.....	11
7. Gestão de equipamentos e insumos:.....	12
8. Gestão da fase pré-analítica: .....	15
9. Gestão da fase analítica:.....	18
10. Gestão dos testes laboratoriais remotos:.....	29
11. Garantia da qualidade: .....	29
12. Gestão da fase pós-analítica e dos laudos: .....	31
13. Gestão de pessoas: .....	35
14. Gestão da informação técnica:.....	36
15. Gestão ambiental e da segurança:.....	36
16. Gestão do sistema de informação laboratorial (SIL): .....	37
17. Gestão de riscos e segurança do paciente: .....	38
18. Notas:.....	39
19. Abreviações utilizadas .....	46
20. Glossário .....	48
21. Referências.....	51

# Introdução

Este documento contém os requisitos técnicos específicos para métodos moleculares de diagnóstico laboratorial, de forma complementar à norma do Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos (PALC), versão 2016. Trata-se da atualização da Lista de Verificação em Diagnóstico Molecular publicada pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) pela primeira vez no ano de 2008. Sua finalidade é atualizar as mudanças ocorridas na área, melhorar a comunicação entre auditores e auditados e ser referencial de garantia da qualidade aplicável às especificidades do diagnóstico molecular.

Os requisitos técnicos específicos para diagnóstico molecular foram organizados no mesmo padrão que a norma PALC 2016. Foram-lhes atribuídos títulos para rápida identificação do assunto e orientação do leitor ao longo do documento e citações das referências bibliográficas que os suportam. Além disso, notas contendo explicações, definições e sugestões a respeito do assunto podem ser encontradas no final do documento, e suas citações encontram-se no corpo do texto. Algumas dessas notas fazem a relação entre processos no laboratório e uma sequência de itens, para tornar prática a aplicação do documento, sendo um guia para o auditor e para o auditado.

Como novidades, foram incluídos itens referentes ao sequenciamento de nova geração (NGS), ao teste pré-natal não invasivo (NIPT), à reação em cadeia da polimerase digital (dPCR), aos testes laboratoriais remotos (TLR) ou rápidos, a diferentes modalidades de validação (com base no método, em andamento e emergencial) e à gestão do risco e da segurança dos pacientes. Por outro lado, itens relacionados com as técnicas em desuso no contexto do laboratório clínico na atualidade foram retirados, por exemplo, o uso de radioisótopos.

Essas atualizações basearam-se, em parte, nas diretrizes do Laboratory Accreditation Program do College of American Pathologists (CAP) e na experiência dos profissionais de laboratórios clínicos e de pesquisa que atuam na vanguarda do setor no país.

Este documento tem caráter educativo, não prescritivo. E será revisado periodicamente, sempre que necessário.

Guilherme Ferreira de Oliveira  
Diretor de Acreditação e Qualidade

# Instruções de uso

Os itens deste documento são compostos dos seguintes atributos:

**1 – CÓDIGO**

Sessão do item e sua ordem numérica dentro da sessão (por exemplo, DM 1.2);

**2 – CÓDIGO DA NORMA PALC 2016**

Item da norma PALC 2016 que o requisito complementa, se aplicável (alguns itens são específicos);

**3 – TÍTULO DO ITEM**

Escopo principal do item para facilitar sua localização;

**4 – REFERÊNCIA**

Bibliografia na qual se baseia a orientação;

**5 – ORIENTAÇÃO**

Descrição objetiva do que deve ser atendido pelo laboratório;

**6 – EXEMPLOS**

Exemplo de evidência a ser verificada pelo auditor.

**7 – TERMOS E ABREVIACÕES**

Podem ser consultadas no final desta edição.

**Exemplo:**

<b>Item</b>	DM X.Y (código do item) PALC X.Y (item da norma PALC 2016 que o item DM complementa) Título do item (escopo)
<b>Orientação</b>	Descrição da recomendação de boa prática que deve ser observada pelo laboratório.
<b>Exemplos</b>	Exemplo de procedimento para adoção das orientações.

## 1. Organização geral e gestão:

<b>Item</b>	DM 1.1 Instalações físicas (1)
<b>Orientação</b>	A organização e a disposição das instalações físicas do laboratório ou do setor de diagnóstico molecular devem seguir a legislação vigente. As instalações físicas devem estar dispostas de forma a garantir a segurança e a qualidade das análises em conformidade com o estado atual do conhecimento e das tecnologias de diagnóstico molecular implantadas.
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se as instalações físicas atendem à RDC 50/2002 ou a outras normas aplicáveis ou àquelas que venham a substituí-la.</li> </ul> Caso haja modificações em relação ao preconizado na legislação, elas devem ser justificadas e documentadas. Contudo, a Acreditação PALC não é superior ao arcabouço legal do país.

<b>Item</b>	DM 1.2 (PALC 1.2) Supervisor técnico especializado (2)
<b>Orientação</b>	O laboratório ou o setor de diagnóstico molecular deve ter um supervisor técnico com especialização, treinamento ou experiência na área.
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Currículo do supervisor técnico, incluindo especialização, treinamento ou experiência na área.</li> </ul>

## 2. Gestão do sistema da qualidade:

<b>Item</b>	DM 2.1 (PALC 2.4) Monitoramento contínuo de novas versões de reagentes, métodos e equipamentos (sistemas analíticos)
<b>Orientação</b>	Deve haver procedimento que vise ao monitoramento contínuo da evolução dos reagentes, aos métodos e aos equipamentos para uso em diagnóstico molecular. Quando selecionados e implantados novos sistemas analíticos, são necessários registros de sua validação e seus procedimentos para avaliação do risco e garantia da qualidade. Para modificações em sistemas analíticos existentes, a extensão da revalidação deve ser vinculada e pertinente aos elementos modificados. Toda melhoria deve ser aprovada pelo supervisor técnico ou responsável designado.
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Processo e registro do monitoramento da literatura científica e do mercado em busca de melhorias em reagentes, métodos e equipamentos, incluindo <i>softwares</i>. Exemplos: novas versões de reagentes e <i>softwares</i> para NGS;</li> <li>• Registros de validação e de revalidação, incluindo tipo de melhoria e métricas e parâmetros para avaliação da qualidade a cada corrida analítica;</li> <li>• Aprovação pelo supervisor do setor.</li> </ul>

<b>Item</b>	DM 2.2 (PALC 2.6) Indicadores analíticos
<b>Orientação</b>	O laboratório ou o setor de diagnóstico molecular deve implementar indicadores próprios e específicos para avaliar e monitorar os aspectos críticos para a qualidade dos seus sistemas analíticos.
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Documentos que descrevam os indicadores e os índices específicos do setor. Exemplos: repetições de extrações, falhas do controle interno, falhas do controle de reação ou amplificação, entre outros, bem como os respectivos registros.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 2.3 (PALC 2.7) Auditorias internas
<b>Orientação</b>	Para que sejam efetivas, as auditorias internas devem ser executadas por pessoal familiarizado com a área, que possa avaliar a qualidade e a segurança dos serviços oferecidos.
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Relatórios das auditorias internas;</li> <li>• Evidências sobre a familiaridade do auditor com a área de diagnóstico molecular.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 2.4 Adequação às normas nacionais e internacionais para testes de paternidade e de finalidade forense (3, 4)
<b>Orientação</b>	Para testes de paternidade e finalidade forense, a validação, os critérios de exclusão, a interpretação dos resultados e os laudos devem estar de acordo com as normas nacional e internacionalmente aceitas. Para estudos de frequência alélica, sugere-se a utilização de bancos nacionais publicados e revisados.
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Padrões ou diretrizes da área seguidos pelo laboratório. Exemplos: AABB e ISFG;</li> <li>• Adequação do processo a essas diretrizes.</li> </ul>

### 3. Gestão do controle da documentação:

<b>Item</b>	DM 3.1 (PALC 3.5) Procedimentos documentados
<b>Orientação</b>	Os procedimentos documentados referentes aos métodos ou aos sistemas analíticos devem conter: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Uso pretendido e validade clínica do analito, do método ou do sistema analítico, incluindo referências pertinentes da literatura (5);</li> <li>• Procedimento para validação de cada lote dos reagentes usados nos métodos próprios (<i>in house</i>);</li> <li>• Descrição do procedimento para verificação do desempenho de cada corrida analítica antes da liberação dos resultados de pacientes (vide itens DM 11.1, DM 11.2, DM 11.3 e DM 11.6);</li> </ul>



	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Instruções com critérios objetivos para interpretação dos resultados de pacientes e controles (vide nota DM 3.1);</li> <li>• Para testes quantitativos, descrição clara dos métodos usados para o cálculo dos resultados e as respectivas unidades de medida, incluindo fórmulas e exemplos.</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Documentos relativos aos métodos e aos sistemas analíticos quanto às informações definidas nesta orientação, quando aplicável.</li> </ul>

  

<b>Item</b>	DM 3.2 Validação de métodos próprios ( <i>in house</i> )
<b>Orientação</b>	<p>Para cada método próprio (<i>in house</i>), o laboratório ou o setor de diagnóstico molecular deve confeccionar um documento que contenha o respectivo estudo de validação, o qual deve incluir, no mínimo, as informações descritas nas orientações DM 9.3, DM 9.4, DM 9.5 e DM 9.9.</p> <p>Para todos os ensaios com base em um método específico, um único documento de validação, que apresente os resultados para todos os ensaios, pode ser confeccionado (vide orientação DM 9.6).</p> <p>Validação clínica e em andamento (<i>ongoing</i>) são aceitáveis, desde que contempladas pelo sistema de gestão da qualidade do laboratório (vide nota DM 3.2).</p>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lista de métodos próprios e respectivos ensaios;</li> <li>• Estudos de validação dos métodos próprios.</li> </ul>

## 4. Gestão dos registros técnicos e da qualidade

<b>Item</b>	DM 4.1 (PALC 4.1) Gestão dos registros analíticos
<b>Orientação</b>	<p>Deve haver procedimento documentado para a gestão dos registros analíticos, respeitando as disposições legais específicas para sua guarda (mínimo de cinco anos).</p> <p>Os registros devem conter:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pacientes incluídos em cada corrida analítica;</li> <li>• Métodos e equipamentos utilizados em cada etapa da análise;</li> <li>• Quantidade e qualidade do ácido nucleico utilizado na análise, se aplicável;</li> <li>• Número de lote e validade dos reagentes utilizados na análise;</li> <li>• Dados brutos resultantes da corrida analítica;</li> <li>• Análises críticas efetuadas para aprovação da corrida analítica antes da liberação dos resultados de pacientes;</li> <li>• Para os métodos próprios (<i>in house</i>): aprovação de cada lote dos reagentes utilizados.</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Completude e rastreabilidade dos registros e dos dados brutos pertinentes às análises;</li> <li>• Arquivamento das cópias dos laudos e dos dados brutos de acordo com a legislação vigente (versões eletrônicas são aceitáveis).</li> </ul>

<b>Item</b>	DM 4.2 (PALC 4.1) Retenção dos dados brutos de NGS
<b>Orientação</b>	Deve haver procedimento documentado para a gestão e o armazenamento dos dados brutos de sistemas analíticos NGS, necessários para apoiar os resultados liberados e permitir reanálises, por um tempo mínimo de cinco anos. Os arquivos retidos devem permitir a reanálise, a reanotação e a reinterpretação por um segundo laboratório a pedido do médico requisitante, do paciente testado ou por iniciativa do próprio laboratório.
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimento para o armazenamento dos arquivos, o tipo de informação retida e o tempo de guarda dos dados brutos do NGS.</li> <li>• Exemplos de dados brutos: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Medidas da qualidade da corrida analítica;</li> <li>- Alinhamento;</li> <li>- Variantes analisadas manualmente;</li> <li>- Arquivos com variantes filtradas ou interpretadas;</li> <li>- Arquivos FASTQ, VCF, BAM, BAI e seus derivados.</li> </ul> </li> </ul>
<b>Item</b>	DM 4.3 (PALC 4.4) Armazenamento de amostras(6, 7)
<b>Orientação</b>	Deve haver procedimento documentado que defina o armazenamento e o manuseio confidencial dos remanescentes de amostras e dos demais derivados relevantes previamente analisados, para as finalidades de controle interno, controle externo alternativo, verificações e validações (vide nota DM 4.3).
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sistema de guarda das amostras primárias ou do ácido nucleico isolado para controle interno, controle externo alternativo, verificações e validações;</li> <li>• Procedimento documentado;</li> <li>• Cuidados relativos à confidencialidade das amostras, principalmente no caso do controle externo alternativo.</li> </ul>

## 5. Gestão das não conformidades, das reclamações e da melhoria contínua

<b>Item</b>	DM 5.1 (PALC 5.2) Não conformidades – específicas
<b>Orientação</b>	Não conformidades específicas do laboratório ou do setor de diagnóstico molecular, como as listadas a seguir, devem ser investigadas e documentadas. Quando indicadas, devem ser tomadas ações corretivas e suas efetividades analisadas: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Notificação do requisitante de que o espécime diagnóstico é inadequado;</li> <li>• Quantidade insuficiente de ácido nucleico isolado;</li> <li>• Desvios do procedimento operacional padrão;</li> <li>• Etapas que falharem em comparação aos padrões esperados;</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Discrepâncias entre os achados do diagnóstico molecular e a clínica ou entre os resultados de outros setores;</li> <li>• Verificação da calibração dos sistemas analíticos não conformes em relação aos critérios preestabelecidos;</li> <li>• Resultados inadequados no controle interno da qualidade e na avaliação externa da qualidade;</li> <li>• Retificação de laudos.</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Registro e investigação da causa raiz das não conformidades;</li> <li>• Registro da ação corretiva e da análise de sua efetividade.</li> </ul>

<b>Item</b>	DM 5.2 Registros de exceções
<b>Orientação</b>	<p>Devem ser mantidos os registros de exceções, indicando quais amostras e etapas divergiram do que é preconizado nos procedimentos. Esse registro deve permitir a rastreabilidade de:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Caso ou paciente;</li> <li>• Divergência;</li> <li>• Motivo(s) do desvio;</li> <li>• Registros de revisão da exceção pelo supervisor do laboratório ou do setor, ou do responsável designado;</li> <li>• Comentários e ações corretivas tomadas em consequência dessa revisão.</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Registros de exceções em relação aos procedimentos, (incluindo os itens descritos na orientação);</li> <li>• Registros das revisões feitas pelo supervisor do laboratório ou do setor, ou do responsável designado;</li> <li>• Ações corretivas tomadas em consequência dessa revisão.</li> </ul>

## 6. Gestão dos laboratórios de apoio

<b>Item</b>	DM 6.1 Seleção de laboratório de apoio(8)
<b>Orientação</b>	<p>O laboratório de apoio para exames de diagnóstico molecular deve ser qualificado e avaliado em relação aos seguintes aspectos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Validação ou verificação dos seus métodos;</li> <li>• Controle interno da qualidade e da avaliação externa da qualidade;</li> <li>• Tempo de atendimento total;</li> <li>• Acreditação PALC, outras certificações e acreditações.</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lista de laboratórios de apoio e respectivas análises;</li> <li>• Critérios para escolha dos laboratórios de apoio para os respectivos exames de diagnóstico molecular;</li> <li>• Registros de avaliação periódica e da acreditação PALC;</li> <li>• Registro de outras certificações e acreditações.</li> </ul>

## 7. Gestão de equipamentos e insumos:

<b>Item</b>	DM 7.1 (PALC 7.3) Reagentes/insumos para métodos próprios ( <i>in house</i> )(9, 10)
<b>Orientação</b>	Reagentes comercializados como “insumos para fabricação de produtos” ou rotulados como RUO, ASR ou IUO podem ser utilizados nos métodos próprios ( <i>in house</i> ), desde que o seu uso atenda à legislação vigente (RDC 302/2005 e à nota técnica conjunta no. 001/2016 GEVIT/GGTPS/Anvisa e GreCs/GGTES/Anvisa) e as orientações DM 7.5, DM 7.6 e DM 7.7, quando aplicáveis.
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Uso dos reagentes/insumos para métodos próprios (<i>in house</i>). Caso ocorra, atender conforme a legislação vigente e os demais itens referenciados.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 7.2 (PALC 7.4) Qualificação de fornecedores
<b>Orientação</b>	É necessário qualificar e avaliar os fornecedores de reagentes, os equipamentos e os serviços em relação a aspectos críticos para a qualidade e a execução ininterrupta das atividades, inclusive por meio de indicadores, quando aplicável.
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Documentos, critérios e registros relativos à qualificação dos fornecedores (exemplos: fornecimento ininterrupto de reagentes e insumos, execução de manutenções corretiva e preventiva em tempo hábil).</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 7.3 (PALC 7.7) Equipamentos utilizados para os métodos próprios (9, 10)
<b>Orientação</b>	Equipamentos utilizados para os métodos próprios ( <i>in house</i> ) devem atender à legislação vigente (RDC 302/2005) e ao item DM 7.5 desta norma.
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se os equipamentos utilizados para os métodos próprios (<i>in house</i>) atendem à legislação vigente e ao item referenciado.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 7.4 (PALC 7.13) Verificação dos métodos comerciais
<b>Orientação</b>	Equipamentos, insumos e reagentes de diagnóstico molecular regularizados junto à Anvisa/MS não devem ser utilizados até que sejam verificados e também comprovado que atendem às especificações ou aos requisitos definidos pelos procedimentos analíticos a eles vinculados.
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Estudo de verificação dos equipamentos, dos insumos e dos reagentes regularizados junto à Anvisa/MS (comerciais);</li> <li>• Comprovação de que as especificações ou os requisitos definidos pelos procedimentos analíticos foram atendidos.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 7.5 (PALC 7.13) Validação de métodos próprios

<b>Orientação</b>	Equipamentos, insumos e reagentes de diagnóstico molecular classificados como para uso em método próprio ( <i>in house</i> ) não devem ser utilizados até que sejam validados e também comprovado que atendem às especificações ou aos requisitos definidos para os procedimentos analíticos a eles vinculados.
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Estudos de validação dos métodos próprios (<i>in house</i>);</li> <li>• Comprovação de que as especificações ou os requisitos definidos pelos procedimentos analíticos foram atendidos.</li> </ul>

<b>Item</b>	DM 7.6 Reagentes/insumos para métodos próprios – documentações e registros
<b>Orientação</b>	Para os reagentes utilizados nos métodos próprios ( <i>in house</i> ), deve haver as seguintes documentações e os seguintes registros: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Estudo de validação que descreva sua aplicação em um método próprio;</li> <li>• Procedimento documentado referente ao método próprio que contenha instruções de uso dos reagentes;</li> <li>• Rastreabilidade do produto (nome, lote e data de validade) em cada corrida analítica;</li> <li>• Avaliação de desempenho de cada novo lote antes ou quando posto em uso (vide nota DM 7.6).</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se há métodos próprios e procedimentos documentados e registros para os respectivos reagentes.</li> </ul>

<b>Item</b>	DM 7.7 <i>Primers</i> , sondas e outras sequências de DNA/RNA sintéticas(11)
<b>Orientação</b>	Os reagentes que contêm ácidos nucleicos ( <i>primers</i> , sondas e outras sequências de DNA/RNA sintéticas) devem atender ao item DM 7.6 e incluir os seguintes detalhes nos seus registros: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tipo (DNA/RNA), nome, sequência, marcações/modificações, localização dessas marcações/modificações e fabricante;</li> <li>• Forma de preparo (diluição e diluente), concentração do estoque e concentração para uso;</li> <li>• Registro das seguintes análises: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Especificidade <i>in silico</i> da sequência (exemplo: BLAST);</li> <li>- Ocorrência de estruturas secundárias;</li> <li>- Ocorrência de dímeros, para <i>primers</i> e sondas;</li> <li>- Anelamento em pseudogenes, retropseudogenes e outros genes homólogos ao alvo, para <i>primers</i> e sondas;</li> <li>- Contexto do <i>amplicon</i>, principalmente se a sequência dos <i>primers</i> e das sondas não estiver disponível (exemplos: HPV L1, HIV LTR, dengue 3' UTR, rs6025, rs1801133, CFTR e exon 10);</li> </ul> </li> <li>• Vide nota DM 7.7</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se os estudos de validação e procedimentos do método contêm detalhes descritos neste item.</li> </ul>

<b>Item</b>	DM 7.8 (PALC 7.14) Água reagente
<b>Orientação</b>	A água reagente é considerada um insumo para métodos próprios ( <i>in house</i> ), independente de sua forma de obtenção (comercial, produzida pelo laboratório ou fornecida pelo fabricante do conjunto reagente). Deve-se comprovar que está

	adequada para o uso pretendido e monitorar seu desempenho (vide nota DM 7.8). Além disso, deve atender às orientações DM 7.5 e DM 7.6.
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Validação da água reagente para cada uso pretendido;</li> <li>• Monitoramento funcional do desempenho das diferentes águas reagentes.</li> </ul>
<b>Item</b>	<p>DM 7.9</p> <p>Equipamentos para detecção de sinais (2, 12-15)</p>
<b>Orientação</b>	<p>As recomendações para o uso dos equipamentos de detecção de sinais (exemplos: qPCR, eletroforese capilar, sequenciador NGS, leitores de microarranjos, fluorímetros, colorímetros, luminômetros, densitômetros, cintilômetros e outros) são:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mantê-los calibrados de acordo com as recomendações dos respectivos fabricantes;</li> <li>• Aplicar critérios de execução, avaliação e aceitabilidade das manutenções e calibrações, sejam elas efetuadas pelo fabricante ou pelo laboratório;</li> <li>• Medir o sinal de fundo (<i>background</i>), dependendo da recomendação do fabricante. Os critérios de aceitabilidade devem ser estabelecidos, quando aplicáveis;</li> <li>• Para sistemas analíticos que medem múltiplos fluorocromos, devem ser tomadas precauções para identificar e corrigir sinais espúrios, de um canal para o outro.</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimentos, critérios e registros relativos aos equipamentos que detectam sinais. Itens críticos, como os listados a seguir, devem estar contemplados: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Manutenção diária, semanal e mensal, quando aplicável;</li> <li>- Manutenção preventiva, no mínimo anual;</li> <li>- Calibrações recomendadas pelo fabricante;</li> <li>- Testes de temperatura exigidos pelo fabricante, quando aplicáveis;</li> <li>- Curvas de calibração devem ser repetidas ou verificadas regularmente, quando indicado pelo controle da qualidade ou após manutenções, quando aplicáveis;</li> </ul> </li> <li>- Atendimento aos critérios da orientação DM 11.3.</li> </ul>
<b>Item</b>	<p>DM 7.10</p> <p>Termocicladores (2, 16)</p>
<b>Orientação</b>	Testes de temperatura dos termocicladores e termoblocos devem ser executados, no mínimo, anualmente, respeitando as instruções do fabricante para frequência maior, caso haja (vide nota DM 7.10).
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimento para verificação da temperatura dos termocicladores e termoblocos;</li> <li>• Registros respectivos.</li> </ul>
<b>Item</b>	<p>DM 7.11</p> <p>Extratores automatizados de ácidos nucleicos</p>
<b>Orientação</b>	<p>Os extratores automatizados de ácidos nucleicos devem ser mantidos de acordo com as recomendações dos fabricantes.</p> <p>Deve haver critérios para a realização e a avaliação das manutenções, sejam elas efetuadas pelo fabricante ou pelo laboratório.</p>
<b>Exemplos</b>	Verificar:

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• procedimentos, critérios e registros relativos aos extratores automatizados de ácidos nucleicos. Itens críticos, como os listados a seguir, devem estar contemplados: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Manutenção diária, semanal e mensal, quando aplicável;</li> <li>- Manutenção preventiva, no mínimo anual;</li> <li>- Descarte apropriado do esgoto do equipamento;</li> <li>- Rastreabilidade dos dados brutos das extrações realizadas, incluindo backup.</li> </ul> </li> </ul>
<b>Item</b>	DM 7.12 Espectrofotômetros
<b>Orientação</b>	<p>Em relação aos espectrofotômetros:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Os filtros devem ser verificados periodicamente quanto à sua boa condição (limpeza, arranhões etc.);</li> <li>• A calibração dos comprimentos de onda deve ser realizada regularmente, de acordo com as instruções do fabricante;</li> <li>• Quando forem utilizadas curvas de calibração, elas devem ser repetidas ou verificadas regularmente, quando indicado pelo controle da qualidade e após manutenções.</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Documentos e registros de manutenção e calibração dos espectrofotômetros.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 7.13 Equipamentos para segurança do operador
<b>Orientação</b>	<p>Deve haver equipamentos e medidas de proteção para prevenir danos e minimizar os riscos químicos e biológicos para o operador.</p> <p>Vide requisitos específicos na seção 15 da Norma PALC – Gestão ambiental e da segurança.</p>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se os itens DM 15.2, DM 15.3, DM 15.4 e DM 15.5, relativos ao equipamento para segurança do operador, são atendidos.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 7.14 Pipetas(17)
<b>Orientação</b>	<p>As pipetas devem ser verificadas quanto à precisão e à reprodutibilidade, antes de serem colocadas em uso e em intervalos definidos (pelo menos anualmente), e os registros, mantidos.</p>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimentos e registros relativos à calibração e à recalibração das pipetas.</li> </ul>

## 8. Gestão da fase pré-analítica:

<b>Item</b>	DM 8.1 Documentação pré-analítica
<b>Orientação</b>	<p>A documentação pré-analítica deve vir acompanhada de consentimento informado assinado pelo paciente ou pelo responsável; heredograma ou raça/etnia, quando aplicável. A confidencialidade dessas informações deve ser assegurada. O responsável técnico do laboratório deve determinar formalmente as informações e os documentos necessários, bem como aprovar os termos de consentimento, podendo delegar essas funções a um profissional habilitado.</p>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Para cada teste, é fundamental a definição formal de necessidade do termo de consentimento informado e de informações clínicas;</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aprovação das políticas e dos documentos pelo responsável técnico do laboratório ou pelo pessoal designado;</li> <li>• Respectivos registros;</li> <li>• Demais critérios relativos a este item.</li> </ul>
--	--

<b>Item</b>	DM 8.2 Documentação pré-analítica – testes de paternidade e de finalidade forense(4)
<b>Orientação</b>	<p>Para testes de paternidade e de finalidade forense, os seguintes dados devem ser obtidos e registrados:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Local e data da coleta da amostra;</li> <li>• Documentação profissional ou de identificação do coletor da amostra;</li> <li>• Fotografia ou fotocópia do documento de identidade com fotografia de cada indivíduo testado;</li> <li>• Cadastro completo e assinado de cada indivíduo testado (incluindo nome, etnia e parentesco);</li> <li>• Certidão de nascimento para menores ou certidão de nascido vivo para recém-nascidos;</li> <li>• Sinopse do caso/da investigação/da fonte da amostra;</li> <li>• Consentimento informado para execução da análise;</li> <li>• Histórico de transfusão nos últimos três meses e de transplante alogênico em qualquer época prévia;</li> <li>• Declaração da existência ou não de parentesco entre a mãe e o suposto pai, ou da possibilidade de um parente do suposto pai ser o verdadeiro pai biológico;</li> <li>• Declaração com assinatura de que as partes presenciaram a coleta da parte contrária;</li> <li>• Assinatura que comprove a verificação e a aprovação das informações e da identificação das amostras pelo indivíduo testado ou por seu guardião legal.</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Documentação e registros pré-analíticos dos testes de paternidade e de finalidade forense em relação aos critérios deste item.</li> </ul>

<b>Item</b>	DM 8.3 Documentação pré-analítica – diagnóstico pré-natal não invasivo(18-21)
<b>Orientação</b>	<p>Para testes pré-natais não invasivos, a documentação pré-analítica deve incluir, quando aplicável:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Consentimento informado assinado pelo paciente;</li> <li>• Estimativa da idade gestacional pela ultrassonografia ou pela data da última menstruação;</li> <li>• Data de nascimento ou idade materna;</li> <li>• Peso materno (o peso tem influência sobre a fração fetal do DNA no plasma);</li> <li>• Informações sobre a paternidade devem ser obtidas, quando elas puderem influenciar a análise (exemplo: quando os genótipos do pai forem necessários);</li> <li>• Gravidez única ou gemelar;</li> <li>• Histórico pessoal e familiar sobre alterações cromossômicas, quando conhecido (todos os ensaios assumem que a mãe é euploide, mas em raras ocasiões esse não é o caso);</li> <li>• Submissão a procedimentos de hiperovulação, inseminação artificial ou fertilização <i>in vitro</i>;</li> <li>• Histórico e tempo decorrido de transfusão sanguínea, tratamento hemoterápico ou transplante de medula óssea;</li> </ul>



	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quando aplicável, risco <i>a priori</i> para aneuploidias (exemplo: risco para síndrome de Down).</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Documentação e registros pré-analíticos dos testes que envolvem diagnóstico pré-natal não invasivo, em relação aos critérios deste item.</li> </ul>
<b>Item</b>	<p>DM 8.4 (PALC 8.9) Aceitação ou rejeição de amostras manipuladas(2)</p>
<b>Orientação</b>	<p>Deve haver procedimentos para aceitação ou rejeição de amostras recebidas na forma de alíquotas e de amostras primárias previamente manipuladas, no sentido de prevenir alterações ou contaminações. Diante dessas situações, a interpretação dos resultados deve considerar a possibilidade de contaminação.</p>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimentos e registros referentes às amostras recebidas na forma de alíquotas ou previamente manipuladas (exemplos: alíquotas ou subprodutos da amostra primária preparados ou isolados em outro setor, em posto de coleta do laboratório; amostras primárias previamente utilizadas em outros setores).</li> </ul>
<b>Item</b>	<p>DM 8.5 Preservação das amostras(22-28)</p>
<b>Orientação</b>	<p>As amostras dos pacientes devem ser processadas imediatamente ou preservadas de modo a minimizar a sua degradação até o momento da análise. Devem ser definidos, quando aplicáveis:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tipo de anticoagulante;</li> <li>• Condições de armazenagem;</li> <li>• Temperatura e prazos;</li> <li>• Processamento de subprodutos;</li> <li>• Adição de conservantes.</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimento que estabelece as condições de coleta e conservação das amostras;</li> <li>• Registros de guarda de amostras, incluindo os de temperatura;</li> <li>• Locais de guarda de amostras, incluindo a organização, a rastreabilidade e a temperatura.</li> </ul>
<b>Item</b>	<p>DM 8.6 Identificação e rastreabilidade das amostras</p>
<b>Orientação</b>	<p>Deve haver um procedimento para a identificação dos tipos de materiais e amostras dos pacientes, suas alíquotas e subprodutos ao longo de todas as fases do processo analítico. Cada recipiente deve possibilitar a identificação única do paciente e a rastreabilidade de todo o processo. No entanto, o tipo de sistema adotado é de livre escolha do laboratório.</p>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sistema de identificação de amostras e de suas alíquotas e subprodutos ao longo do processo analítico, quando aplicável (exemplos: amostras primárias, DNA/RNA isolado, DNA/RNA amplificado etc.).</li> </ul>
<b>Item</b>	<p>DM 8.7 Recebimento e guarda de amostras para paternidade e finalidade forense(4)</p>
<b>Orientação</b>	<p>Para testes de paternidade e de finalidade forense:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• A qualidade da amostra deve ser avaliada e registrada ao seu recebimento, incluindo evidências de alteração ou adulteração, quantidade e identificação única;</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• As amostras devem ser mantidas em áreas de segurança com acesso limitado e deve haver uma cadeia de custódia adequadamente documentada.</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimentos e registros relativos à identificação de amostras;</li> <li>• Procedimentos e registros relativos ao recebimento das amostras e aos critérios de aceitabilidade;</li> <li>• Procedimentos e registros de controle de acesso, guarda, segurança, confidencialidade e cadeia de custódia das amostras de valor legal.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 8.8 Registro da análise histológica de amostras parafinadas
<b>Orientação</b>	Para as amostras tumorais embebidas em parafina, das quais o DNA/RNA é extraído para análise (exemplo: KRAS), deve haver registro histológico da avaliação do conteúdo de células neoplásicas.
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Existência de registro histológico para as análises que envolvam DNA/RNA extraído de amostra parafinada;</li> <li>• Avaliação qualitativa e quantitativa do conteúdo de células tumorais e se este ultrapassa o limite de detecção do ensaio.</li> </ul>

## 9. Gestão da fase analítica:

<b>Item</b>	DM 9.1 Extração de ácidos nucleicos(2, 29-31)
<b>Orientação</b>	Os ácidos nucleicos devem ser extraídos e purificados por meio de procedimentos reportados na literatura, recomendados pelo fabricante ou validados pelo próprio laboratório ( <i>in house</i> ). A quantidade obtida deve ser avaliada, quando aplicável. A qualidade do DNA/RNA para o uso pretendido deve ser avaliada antes da liberação do resultado para o paciente (isso pode ser feito antes ou durante a análise por meio do controle de reação/amplificação – vide orientação DM 9.12).
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimentos e registros relativos à extração de ácidos nucleicos, incluindo as referências do método;</li> <li>• Procedimentos e registros de quantificação de ácidos nucleicos, se aplicáveis;</li> <li>• Procedimentos e registros relativos à avaliação da qualidade do ácido nucleico extraído.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 9.2 Condições livres de RNases
<b>Orientação</b>	Para sistemas analíticos que tenham como alvo o RNA (exemplo: fusões gênicas na leucemia), condições RNase-free devem ser garantidas. Além disso, os itens 9.1 e 9.12 devem ser atendidos.
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimentos dos ensaios para RNA, a forma como se mantém as condições RNase-free e os registros relativos aos eventuais impactos dessas enzimas sobre as análises.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 9.3 (PALC 9.3)

	Validação de métodos próprios – características de desempenho(32-34)
<b>Orientação</b>	<p>Os métodos próprios (<i>in house</i>) devem ter as seguintes características de desempenho determinadas, registradas e aprovadas antes de serem colocados em uso na rotina (vide nota DM 9.3):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensibilidade analítica (limite de detecção);</li> <li>• Precisão;</li> <li>• Exatidão;</li> <li>• Especificidade analítica;</li> <li>• Intervalo reportável (para ensaios quantitativos);</li> <li>• Intervalo de referência, quando aplicável;</li> <li>• Sensibilidade clínica;</li> <li>• Especificidade clínica;</li> <li>• Outras características de desempenho, quando aplicáveis (utilidade clínica, estabilidade da amostra, estabilidade dos reagentes, reações cruzadas etc.);</li> <li>• Aprovação do supervisor habilitado do laboratório/setor ou do responsável designado.</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Estudos de validação dos métodos próprios (<i>in house</i>) para as características de desempenho descritas neste item, incluindo dados brutos e conclusões;</li> <li>• Aplicação de técnicas estatísticas adequadas;</li> <li>• Aprovação das características de desempenho do supervisor do laboratório/setor ou do responsável designado;</li> <li>• Caso alguma característica de desempenho tenha sido avaliada por validação em andamento (<i>ongoing</i>) devido a restrições/limitações (tipo de amostra, matrizes raras, amostragem reduzida pela dificuldade de obtenção de amostras ou controles positivos), solicitar documento confirmando finalização ou acompanhamento do processo (vide nota DM 3.2).</li> </ul>
<b>Item</b>	<p>DM 9.4 (PALC 9.3) Validação de métodos próprios – resultados possíveis (2)</p>
<b>Orientação</b>	Os estudos de validação dos métodos próprios ( <i>in house</i> ) devem incluir um número representativo de todos os resultados possíveis ou a maior parte deles, quando aplicável (vide nota DM 9.4).
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gama de resultados possíveis usados para a validação dos métodos próprios (<i>in house</i>).</li> </ul>
<b>Item</b>	<p>DM 9.5 (PALC 9.3) Validação de métodos próprios – tipos de amostras</p>
<b>Orientação</b>	<p>Os estudos para validação dos métodos próprios (<i>in house</i>) devem incluir um número representativo de cada tipo de amostra (matriz) que será analisada, quando aplicável (exemplos: sangue total, plasma, soro, urina, tecido fresco, tecido congelado, bloco de parafina etc.).</p> <p>Para amostra (matriz) rara, vide nota DM 9.5.</p>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se os estudos de validação incluem um número representativo de cada tipo de amostra que será analisada;</li> <li>• A frequência com que as matrizes raras são analisadas e os respectivos laudos.</li> </ul>
<b>Item</b>	<p>DM 9.6 Validação com base no método(35-40)</p>

<b>Orientação</b>	<p>Os sistemas analíticos (métodos) que geram uma gama de resultados possíveis, utilizando o mesmo processo analítico, podem ser validados e ter suas modificações revalidadas por uma abordagem com base no método e não analito específica (exemplos: sequenciamento de primeira geração, NGS, MLPA, entre outros). A validação deve conter:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Um espectro de amostras representativo dos possíveis resultados que o ensaio foi concebido para detectar;</li> <li>• Métricas e parâmetros de qualidade estabelecidos (exemplo: vide item DM 9.23);</li> <li>• Aprovação do supervisor do laboratório/setor ou do responsável designado (vide nota DM 9.6).</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar registros de validação e revalidação, incluindo:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Espectro de amostras e métricas;</li> <li>• Parâmetros de qualidade utilizados para estabelecer e avaliar o desempenho do método;</li> <li>• Aprovação da validação/revalidação pelo supervisor do laboratório/setor ou do responsável designado.</li> </ul> <p><i>Observação: a mesma abordagem com base no método pode ser aplicada para avaliação externa da qualidade (vide orientação DM 11.4).</i></p>
<b>Item</b>	<p>DM 9.7 NGS – validação do processo analítico de bioinformática</p>
<b>Orientação</b>	<p>O processo analítico de bioinformática utilizado para examinar, interpretar e reportar os resultados do sequenciamento NGS deve ser validado e revalidado a cada modificação/atualização.</p> <p>O estudo de validação deve incluir:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Descrição dos alvos analíticos (vide exemplo 1);</li> <li>• Etapas do processo de análise (vide exemplo 2);</li> <li>• Validação do método de pooling de amostras, se aplicável;</li> <li>• Critérios e limites para chamada de variantes (vide exemplo 3);</li> <li>• Influência de regiões homólogas (vide exemplo 4);</li> <li>• Determinação das características de desempenho do ensaio (vide exemplo 5);</li> <li>• Espécimes contendo o(s) tipo(s) de variante(s) detectado(s) pelo método;</li> <li>• Determinação da taxa de detecção de variantes causais (mutações) no sequenciamento do exoma e do genoma;</li> <li>• Critérios de aceitabilidade ou rejeição dos resultados do sequenciamento com base nos parâmetros e nas métricas da qualidade (vide exemplo 6).</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar os protocolos e os registros de validação do processo de bioinformática, incluindo a seguinte lista de exemplos, quando aplicáveis:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Exemplo 1: éxons, genes, regiões alvos, íntrons e promotores;</li> <li>• Exemplo 2: algoritmos, <i>softwares</i>, <i>scripts</i>, conjunto de dados utilizados nos testes e nos treinamentos, entre outros;</li> <li>• Exemplo 3: cobertura mínima, escore de qualidade da base ou variante, percentagem de leitura dos alelos;</li> <li>• Exemplo 4: pseudogenes;</li> <li>• Exemplo 5: sensibilidade, precisão, chamada de variantes falso-positivas, entre outras;</li> <li>• Exemplo 6: escores da qualidade do mapeamento e das bases, percentagem de leituras, incluindo sequência-alvo, cobertura da sequência-alvo etc.</li> </ul>
<b>Item</b>	<p>DM 9.8 (PALC 9.2) Verificação de métodos comerciais(32)</p>

<b>Orientação</b>	<p>As seguintes características de desempenho dos métodos comerciais com registro na Anvisa/MS devem ser verificadas, registradas e aprovadas pelo supervisor ou pelo responsável designado antes de serem colocadas em uso na rotina:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Precisão;</li> <li>• Veracidade ou acurácia;</li> <li>• Intervalo reportável (para ensaios quantitativos).</li> </ul> <p>Se devidamente justificadas, verificações em andamento (<i>ongoing</i>) e emergenciais são aceitas (vide nota DM 9.8).</p>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimentos, registros e aprovações das verificações de desempenho dos testes comerciais com registro na Anvisa/MS;</li> <li>• Necessidade, justificativa e acompanhamento para verificações em andamento (<i>ongoing</i>) e emergenciais.</li> </ul>
<b>Item</b>	<p>DM 9.9</p> <p>Validação de modificações nos métodos comerciais</p>
<b>Orientação</b>	<p>Caso o laboratório realize modificação no procedimento recomendado pelo fabricante do método comercial registrado na Anvisa/MS, deve haver uma validação dessa modificação para comprovar que o desempenho obtido seja equivalente ou superior ao desempenho informado pelo fabricante (para validação vide os itens DM 9.3, DM 9.4, DM 9.5 e DM 9.6, quando aplicável). A modificação deve ser aprovada pelo supervisor do laboratório/setor ou pelo responsável designado.</p>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se o procedimento usado corresponde ao preconizado pelo fabricante;</li> <li>• Procedimento, registros e aprovação correspondentes à validação da modificação, se aplicáveis.</li> </ul>
<b>Item</b>	<p>DM 9.10</p> <p>Carreamento de produtos previamente amplificados(2, 41)</p>
<b>Orientação</b>	<p>As amplificações de ácidos nucleicos devem ser planejadas de forma a minimizar o carreamento de produtos previamente amplificados e, consequentemente, resultados falso-positivos (vide nota DM 9.10).</p>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimentos usados para minimizar a contaminação com produtos previamente amplificados.</li> </ul>
<b>Item</b>	<p>DM 9.11</p> <p>Contaminação da amostra pelo operador</p>
<b>Orientação</b>	<p>Deve haver uma sistemática para prevenir a contaminação das amostras pelo operador, quando aplicável (exemplos: ensaios de finalidade forense e diagnóstico pré-natal não invasivo).</p>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Necessidade de prevenção da contaminação de amostras pelo operador e avaliação da eficácia de medidas adotadas.</li> </ul>
<b>Item</b>	<p>DM 9.12</p> <p>Controle de reação/amplificação (endógeno ou exógeno)</p>
<b>Orientação</b>	<p>Um controle de reação/amplificação (endógeno ou exógeno) deve ser detectado em toda amostra submetida à amplificação de ácidos nucleicos, com a finalidade de identificar reações falsamente negativas devido à presença de inibidores ou à ausência de DNA/RNA, quando aplicável.</p>

	<p>Para análises quantitativas, a questão da inibição parcial também deve ser avaliada.</p> <p>Para garantia da qualidade, vide orientação DM 11.1.</p>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimentos, critérios, registros e análises críticas para distinção entre resultados verdadeiramente negativos e resultados falsamente negativos, por meio dos controles de amplificação endógenos ou exógenos;</li> <li>• Procedimento do laboratório diante de uma amostra inibida ou parcialmente inibida.</li> </ul>
<b>Item</b>	<p>DM 9.13</p> <p>PCR convencional (30, 42)</p>
<b>Orientação</b>	<p>Para os métodos que utilizam a PCR convencional, deve haver descrição, procedimentos e registros relativos a:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Regiões-alvo da análise (<i>amplicons</i>), incluindo tamanho, sequência, estrutura secundária, conteúdo de GC e contexto (exemplos: HPV L1, HIV LTR, dengue 3' UTR, rs6025, rs1801133, CFTR éxon 10);</li> <li>• Contexto do <i>amplicon</i>, no caso dos ensaios comerciais (quando não houver informações sobre a sequência-alvo);</li> <li>• Tipos de amostras aceitáveis e requisitos mínimos para realizar o ensaio (exemplos: matriz, volume etc.);</li> <li>• Condições de armazenamento da amostra e sua duração;</li> <li>• Métodos e reagentes usados para extração de ácidos nucleicos;</li> <li>• Tipo de ácido nucleico utilizado na análise (exemplos: DNA, cDNA, RNA ou ácido nucleico total);</li> <li>• Métodos, equipamentos e reagentes utilizados para quantificação de ácido nucleico, se aplicáveis;</li> <li>• Pré-tratamentos (exemplos: desnaturação química/temperatura, tratamentos enzimáticos, sonicação, pré-amplificação);</li> <li>• Métodos e reagentes utilizados no preparo da reação e sua rastreabilidade;</li> <li>• Condições da reação, volume final e forma de preparo, incluindo: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Quantidade de ácido nucleico;</li> <li>- Concentração dos <i>primers</i>/sondas, Mg++ e dNTP;</li> <li>- Identidade da polimerase, concentração e tampões;</li> <li>- Uso de aditivos (exemplos: DMSO, formamida, betaína, Sybr green I etc.);</li> <li>- Placas ou tubos, seus respectivos fabricantes e números de catálogo;</li> <li>- No caso de <i>master mixes</i>, número de catálogo e fabricante;</li> </ul> </li> <li>• Termociclador, modelo, fabricante e parâmetros completos de termociclagem;</li> <li>• Método de análise da reação ou confirmação da identidade do <i>amplicon</i> (exemplos: eletroforese em gel, eletroforese capilar, hibridização em microarranjos, sequenciamento etc.);</li> <li>• Critérios da qualidade para validação da corrida analítica;</li> <li>• Inclusão em todas as corridas analíticas: controles de reação/amplificação e controles internos negativos e positivos (principalmente com baixos níveis da sequência-alvo, para avaliar a sensibilidade da corrida analítica, se aplicável);</li> <li>• A reprodutibilidade dos controles deve ser monitorada;</li> <li>• Modificações importantes no processo exigem revalidações;</li> <li>• Os métodos devem atender também ao item DM 11.2.</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Atendimento aos critérios descritos no item (vide nota DM 9.13).</li> </ul>

<b>Item</b>	DM 9.14 qPCR
<b>Orientação</b>	<p>Os métodos com base em qPCR precisam atender às orientações do item DM 9.13 (PCR convencional) e, além disso:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Deve-se inspecionar as curvas de amplificação para verificar se são anormais ou atípicas, quando aplicável;</li> <li>• Deve haver critérios objetivos para interpretação e aprovação das curvas de amplificação (exemplos: ciclo quantitativo e intensidade do sinal fluorescente dentro dos intervalos esperados);</li> <li>• Deve-se verificar a identidade do produto amplificado durante (exemplo: sondas de hidrólise) ou após a qPCR (exemplo: curvas de dissociação, no caso do uso de corantes intercalantes);</li> <li>• Deve-se ter resolução adequada para a curva de dissociação (<i>melting</i>) (exemplo: leituras/oC adequados), bem como para os critérios objetivos para sua interpretação e sua aprovação (exemplo: Tm do produto esperado);</li> <li>• Devem ser incluídos os controles descritos no item DM 9.13 em todas as corridas analíticas;</li> <li>• Devem ser incluídos curva de calibração, se aplicável, e controles internos com dois ou três níveis diferentes da sequência-alvo no caso dos métodos quantitativos.</li> </ul> <p>Os métodos devem atender também ao item DM 11.2 e DM 11.3.</p>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se os critérios descritos no item são atendidos;</li> <li>• Vide nota DM 9.14.</li> </ul>

<b>Item</b>	DM 9.15 dPCR(42, 43)
<b>Orientação</b>	<p>Os métodos que utilizam dPCR devem atender às orientações do item DM 9.13 (PCR convencional) e, além disso:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Deve haver registros em cada corrida analítica sobre número de partições (n), volume das partições individuais, volume total das partições medidas (tamanho efetivo da reação), variância/desvio padrão do volume das partições, média do número de cópias por partição (<math>\lambda</math>), software de análise, versão e fabricante do equipamento e ponto de corte para distinção entre as partições positivas e negativas (sobre ponto de corte, vide nota DM 11.2);</li> <li>• Devem ser incluídos os controles descritos no item DM 9.13 em todas as corridas analíticas: <ul style="list-style-type: none"> <li>- No caso da pesquisa de mutações raras e patógenos, incluir controles internos positivos com diferentes níveis da sequência-alvo (principalmente baixos);</li> <li>- No caso de quantificação absoluta, incluir calibradores (não necessitam ser na forma de curva padrão, como na qPCR);</li> <li>- A identidade do produto amplificado deve ser verificada durante (exemplo: sondas de hidrólise) ou após a dPCR (exemplo: curvas de desnaturação);</li> <li>- No caso de concatêmeros, informar estratégia de separação física das sequências-alvo (exemplos: pré-amplificação, digestão com enzimas de restrição ou sonicação);</li> <li>- Informar se o ácido nucleico-alvo está na forma de fita simples ou dupla ao ser particionado (para evitar superestimação em 2<math>\times</math>);</li> </ul> </li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Considerar se os parâmetros da mesma reação no formato de qPCR (exemplo: eficiência da reação e limite de quantificação) são aceitáveis. Contudo, a migração de um ensaio com base em qPCR para dPCR exige validação;</li> <li>- Os métodos devem atender também ao item DM 11.2 e DM 11.3, quando aplicável.</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se os critérios descritos no item são atendidos (vide nota DM 9.15).</li> </ul>

<b>Item</b>	DM 9.16 Transcrição reversa(42)
<b>Orientação</b>	Com relação aos métodos que utilizam transcrição reversa do RNA, deve haver procedimentos e registros relativos: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ao método de síntese do cDNA (exemplo: <i>primer</i> randômico, específico ou poli-T);</li> <li>• À concentração do <i>primer</i>;</li> <li>• À descrição do protocolo (um ou dois passos);</li> <li>• À quantidade de RNA utilizado e detalhes da reação (volume, componentes e condições da reação);</li> <li>• Às condições de armazenamento do cDNA (temperatura, duração e tampão), se aplicáveis.</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se os critérios descritos no item são atendidos.</li> </ul>

<b>Item</b>	DM 9.17 Eletroforese em gel(44, 45)
<b>Orientação</b>	Com relação aos métodos que utilizam eletroforese em gel: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Quantidades padronizadas de ácidos nucleicos devem ser aplicadas nos géis, quando possível;</li> <li>• Controles da reação devem ser corridos, como as amostras dos pacientes;</li> <li>• Marcadores de peso molecular conhecido em intervalo compatível com o das bandas esperadas devem ser usados a cada corrida;</li> <li>• Marcadores visuais ou de fluorescência devem ser usados para marcar o ponto final da eletroforese;</li> <li>• Deve haver critérios objetivos para a interpretação dos resultados (exemplo: padrão de bandas esperado);</li> <li>• As fotografias de géis devem apresentar boa resolução, fundo (<i>background</i>) fraco, sinal claro, ausência de bolhas e outros artefatos, ou seja, uma qualidade que permita a interpretação correta dos resultados.</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se os documentos e os registros da eletroforese em gel atendem aos critérios descritos neste item;</li> <li>• Vide nota DM 9.17.</li> </ul>

<b>Item</b>	DM 9.18 Completeness e especificidade da digestão com endonucleases de restrição
<b>Orientação</b>	A completeness e a especificidade da digestão por endonucleases de restrição devem ser avaliadas, quando aplicáveis. O tratamento do DNA com endonucleases de restrição deve ser realizado durante período de tempo e condições adequados e controlados.
<b>Exemplos</b>	Verificar:



	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimentos, critérios e registros relativos à completude e à especificidade das reações com enzimas de restrição em cada corrida analítica.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 9.19 Sequenciamento de primeira geração (Sanger e pirosequenciamento)(46-49)
<b>Orientação</b>	<p>Em relação aos métodos que incluem sequenciamento de primeira geração (Sanger e pirosequenciamento):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Devem ser reservados aos genes relacionados a doenças adequadamente caracterizados na literatura e nos bancos de dados genômicos;</li> <li>• Deve-se manter uma documentação adequada e atualizada do gene em relação à sequência referência, às mutações patogênicas e às mutações benignas;</li> <li>• Devem ser otimizados e controlados de forma a garantir a presença de sinal legível por todo o comprimento da região-alvo e a pronta detecção de variantes genéticas, especialmente aquelas em heterozigose e em pequenas proporções de alelos mutantes (exemplo: sequenciamento bidirecional ou replicatas unidirecionais independentes);</li> <li>• Deve haver critérios objetivos para admitir, tratar e interpretar os dados brutos primários (exemplos: atribuições corretas para as posições não polimórficas, definição da região de sequenciamento, intensidade do pico, flutuação da linha de base, relação sinal-ruído e formato do pico);</li> <li>• Deve-se seguir as diretrizes profissionais para interpretação clínica das variantes genéticas, como as diretrizes da ACMG para mutações germinativas e da <i>Association for Molecular Pathology</i> para mutações germinativas;</li> <li>• O método que envolve o sequenciamento para detecção de mutações somáticas em misturas de populações celulares (exemplo: amostra tumoral) deve ter seu limite de detecção determinado na validação (tipicamente 20% de alelo mutante). A percentagem de células mutantes na amostra e o limite de detecção do método devem ser levados em consideração no momento da interpretação do resultado, principalmente, o negativo. Essas informações devem ser incluídas no laudo;</li> <li>• Deve-se atentar para ocorrência de amplificação preferencial de um alelo em relação ao outro nos heterozigotos;</li> <li>• Vide item DM 8.8.</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Documentação relacionada com as sequências referências dos genes sequenciados pelo laboratório, incluindo suas mutações/variantes patogênicas e benignas;</li> <li>• Procedimentos dos métodos que incluem sequenciamento de primeira geração, especialmente os critérios para caracterização das mutações/variantes em heterozigose e baixa proporção;</li> <li>• Procedimentos adotados pelo laboratório para interpretação clínica e liberação dos resultados para as variantes genéticas encontradas (exemplos: patogênicas, benignas e de significado clínico indeterminado);</li> <li>• Vide nota DM 9.19.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 9.20 Eletroforese capilar para análises de fragmentos(4)
<b>Orientação</b>	<p>Em relação aos métodos que incluem análises de fragmentos por eletroforese capilar (exemplo: testes de paternidade e de finalidade forense):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• O padrão de peso molecular (<i>size standard</i>) deve ser adicionado a todas as amostras antes da separação eletroforética, para determinação correta do tamanho dos picos e correção das variações entre as injeções;</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uma escada alélica (<i>ladder</i>) apropriada deve ser incluída em todas as corridas analíticas, se aplicável;</li> <li>• Controles internos positivo e negativo devem ser incluídos em todas as corridas analíticas, preferencialmente a partir da etapa de extração;</li> <li>• Deve haver critérios objetivos para interpretação, tratamento e aceitabilidade do eletroferograma preliminar (na sua forma bruta), como: posicionamento das regiões polimórficas, critérios de intensidade de picos, flutuação de linha de base, razão ruído/sinal, formato dos picos, identificação e tratamento dos picos off-<i>ladder</i> e artefatos (exemplos: picos +A/-A, stutters e bobble dyes);</li> <li>• Deve haver uma documentação adequada e atualizada do banco de dados de alelos para cada loci;</li> <li>• Nos cálculos forenses (exemplo: índice de paternidade), devem ser usadas frequências alélicas da população local, ou as mais apropriadas para os casos atendidos pelo laboratório.</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nos procedimentos e nos registros relativos a eletroforese capilar para análise de fragmentos, se os critérios deste item são atendidos;</li> <li>• Vide nota DM 9.20.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 9.21 Dupla conferência dos resultados da eletroforese capilar para análise de fragmento (4)
<b>Orientação</b>	Os resultados da eletroforese capilar nos testes de paternidade e de finalidade forense devem ser interpretados por dupla conferência, de forma independente. As exclusões com base em alelos próximos ( $\pm 1$ repetição em tandem) devem ser confirmadas na mesma corrida analítica (eletroforese) ou por outros métodos.
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimentos e registros da dupla interpretação, independente do resultado referente aos testes de paternidade e de finalidade forense;</li> <li>• Procedimento relativo a exclusões com base em alelos próximos (<math>\pm 1</math> repetição).</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 9.22 Arranjos (50)
<b>Orientação</b>	<p>Em relação aos métodos que incluem análise em arranjos (exemplo: genotipagem HPV):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Para cada amostra, deve haver uma forma de verificar a qualidade do ácido nucleico extraído e se este foi devidamente marcado durante a amplificação (exemplo: controle de reação/amplificação do ensaio);</li> <li>• Para cada amostra, a qualidade do processo de hibridização e das lavagens deve ser verificada (exemplo: controles de hibridização do ensaio);</li> <li>• A qualidade do arranjo deve ser verificada, e os novos lotes, aferidos antes ou durante o uso (exemplo: inclusão de controles internos positivo e negativo em todas as corridas analíticas, com rodízio de controles positivos para que cada lote tenha as diferentes sondas avaliadas);</li> <li>• As funções do software usado para analisar os dados do arranjo devem ser verificadas periodicamente.</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nos procedimentos e nos registros relativos à análise em arranjos, se os critérios deste item são atendidos;</li> <li>• Vide nota DM 9.22.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 9.23

	NGS – Processo analítico (35-40)
<b>Orientação</b>	<p>Deve haver procedimentos e registros relativos ao processo analítico utilizado para gerar dados de sequenciamento NGS, que incluam:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Descrição das regiões-alvo da análise (vide exemplo 1);</li> <li>• Descrição dos tipos de amostras aceitáveis para o ensaio (vide exemplo 2) e dos requisitos mínimos relativos às amostras para se realizar o ensaio;</li> <li>• Métodos e reagentes usados para extração de ácidos nucleicos e sua conversão em uma biblioteca NGS, se aplicáveis;</li> <li>• Métodos e reagentes utilizados para o enriquecimento das regiões-alvo (vide exemplo 3), se aplicáveis;</li> <li>• Métodos e reagentes utilizados para a indexação molecular/bar coding, se aplicáveis;</li> <li>• Controles utilizados, se aplicável (vide exemplo 4);</li> <li>• Plataforma de sequenciamento, fabricante versão dos reagentes e dos descartáveis (vide exemplo 5);</li> <li>• Software do instrumento e da versão utilizada para gerar dados primários (no instrumento) e formato de saída (vide exemplo 6);</li> <li>• Critérios da qualidade estabelecidos durante a validação aplicados para determinar a continuação ou a interrupção do processo (vide exemplo 7);</li> <li>• Modificações importantes no processo que exijam revalidações (vide item DM 9.6);</li> <li>• Descrição dos limites de tamanho de indel detectáveis pelo método (vide exemplo 8).</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimentos e registros relativos à fase analítica dos métodos com base em NGS e atendimento aos critérios deste item (vide nota DM 9.23.);</li> <li>• Lista de exemplos: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Exemplo 1: genes incluídos no painel, no exoma, no genoma e em outras regiões específicas, como íntrons e promotores;</li> <li>- Exemplo 2: sangue, saliva, amostras parafinadas;</li> <li>- Exemplo 3: PCR multiplex, captura com oligonucleotídeos e outros;</li> <li>- Exemplo 4: controle para demonstrar o limite de detecção, controle com mutações conhecidas, controle interno com base no método etc.;</li> <li>- Exemplo 5: células de fluxo, chips etc.;</li> <li>- Exemplo 6: arquivos FASTQ;</li> <li>- Exemplo 7: distribuição de tamanho dos ácidos nucleicos após fragmentação, concentração da biblioteca e distribuição de tamanho, densidade do cluster na célula de fluxo, índices de qualidade da sequência lida, sequências que passaram pelos filtros de qualidade do instrumento, número total de sequências geradas e taxas de erros;</li> <li>- Exemplo 8: deleções até 20 bp e inserções até 10 bp. Incluir indels de tamanhos variados na validação.</li> </ul> </li> </ul>
<b>Item</b>	DM 9.24 NGS – bioinformática (33, 36, 37, 39, 51)
<b>Orientação</b>	<p>Deve haver procedimentos e registros relativos ao processo analítico de bioinformática utilizado para examinar, interpretar e reportar os resultados do sequenciamento NGS que incluam:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rastreabilidade do processo de análise [algoritmos, <i>softwares</i>, <i>scripts</i>, sequências referência e banco de dados (próprios, comerciais ou de código aberto)];</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gestão da qualidade do processo, incluindo métricas/parâmetros para monitorar o desempenho do processo a cada corrida analítica (percentagem de sequências individuais alinhadas ao alvo, número e tipo de variantes chamadas, entre outros);</li> <li>• Monitoramento, implementação e rastreabilidade das atualizações, aprimoramentos e novas versões dos componentes, como <i>softwares</i>, <i>scripts</i> e banco de dados.</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimento que descreve o processo analítico de bioinformática em relação aos critérios do requisito, se aplicável;</li> <li>• Rastreabilidade dos <i>softwares</i>, dos <i>scripts</i> e do banco de dados, e também as respectivas versões e configurações utilizadas na confecção de um determinado laudo de paciente;</li> <li>• Registros das análises que não passaram pelos requisitos de qualidade preestabelecidos, respectivas ações corretivas e registros da aprovação do responsável técnico ou designado, no caso de exceções;</li> <li>• Registros do monitoramento, da implementação e da rastreabilidade das atualizações do processo de bioinformática analítica, bem como sua revalidação, os parâmetros de qualidade e a data de implementação.</li> </ul>
<b>Item</b>	<p>DM 9.25</p> <p>Identificação de aneuploidias fetais por meio de sequenciamento do plasma materno por NGS (18-21, 52-56)</p>
<b>Orientação</b>	<p>Para os métodos que envolvem a identificação de aneuploidias fetais pelo sequenciamento do plasma materno por NGS, o laboratório deve:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Determinar e monitorar parâmetros da qualidade do ensaio (vide exemplo 1);</li> <li>• Elaborar procedimento documentado, indicando as ações corretivas para cada parâmetro da qualidade quando estes não são atendidos (vide exemplo 2);</li> <li>• Incluir controles internos positivos e negativos apropriados em cada corrida analítica (exemplo: controle interno com base no método);</li> <li>• Monitorar as características analíticas do ensaio longitudinalmente;</li> <li>• Calcular a proporção de resultados e revisá-la periodicamente (vide exemplo 3);</li> <li>• Atender conjuntamente aos itens DM 9.23 e 9.24.</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Registros relativos às características de desempenho do teste, aos parâmetros de qualidade e às respectivas ações corretivas quando estes não são atendidos;</li> <li>• Inspeção e registro dos controles internos;</li> <li>• Registro longitudinal das características de desempenho do teste (vide exemplo 1);</li> <li>• Registro da proporção de resultados.</li> <li>• Exemplo 1: fração fetal e seu intervalo aceitável, quantidade mínima de DNA fetal, quantidade mínima de reads mapeados e qualidade mínima de reads;</li> <li>• Exemplo 2: reextração, recoleta, ressequenciamento e liberação de um resultado falho (exemplo: fração fetal inadequada) ou indeterminado;</li> <li>• Exemplo 3: proporção de resultados positivos (aneuploidias do 13, 18 e 21), proporção de testes falhos (exemplo: fração fetal inadequada) e resultados inconclusivos.</li> </ul>

## 10. Gestão dos testes laboratoriais remotos:

<b>Item</b>	DM 10.1 (PALC 10.4) Testes moleculares remotos ou rápidos
<b>Orientação</b>	Nos testes de diagnóstico molecular comerciais considerados remotos ou rápidos, nos quais não há possibilidade de submeter os controles internos e os pacientes à mesma corrida analítica, o desempenho de cada novo lote de reagentes deve ser confirmado antes do uso por meio da execução do ensaio com os controles internos da qualidade ou com as amostras com resultados conhecidos. A avaliação externa da qualidade deve ser executada como nos demais testes de diagnóstico molecular, no entanto, com maior frequência.
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilização de testes comerciais considerados remotos (exemplos: Gene Expert, Biofire);</li> <li>• Confirmação do desempenho de cada novo lote;</li> <li>• Procedimento de avaliação externa da qualidade.</li> </ul>

## 11. Garantia da qualidade:

<b>Item</b>	DM 11.1 Controle de reação/amplificação
<b>Orientação</b>	Deve haver critérios objetivos para interpretação dos resultados do controle da reação/amplificação (vide orientação DM 9.12), como: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Critérios de aceitabilidade;</li> <li>• Resultados dentro do intervalo especificado, quando aplicável.</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimentos e critérios para interpretação e aceitabilidade do controle da reação/amplificação, quando aplicáveis, e os respectivos registros.</li> </ul>

<b>Item</b>	DM 11.2 Métodos qualitativo (2)
<b>Orientação</b>	Para os métodos qualitativos, os controles internos da qualidade devem ser: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Incluídos em cada corrida analítica (vide nota DM 11.2);</li> <li>• Estocados de forma que sua integridade seja mantida;</li> <li>• Compostos da mesma matriz (tipo de amostra), apropriada para o método, quando possível;</li> <li>• Processados de forma idêntica às amostras dos pacientes, quando possível;</li> <li>• Verificados e aceitos/rejeitados de acordo com critérios preestabelecidos;</li> <li>• Aprovados antes da liberação do resultado para o paciente;</li> <li>• Revistos mensalmente pelo supervisor do laboratório/setor (ou pelo profissional designado) em busca de discrepâncias, tendências e omissões. Os registros dessa análise mensal pelo supervisor devem ser guardados/mantidos e, se necessário, a avaliação do risco e da investigação de causa-raiz deve ser instaurada;</li> <li>• Monitorados por meio de controle interno da qualidade, utilizando abordagem com base no método (sequenciamento de primeira geração, NGS, MLPA e outros) (vide requisito DM 9.6).</li> </ul>

<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se os itens relativos aos controles internos da qualidade descritos na orientação são atendidos.</li> </ul>
<b>Item</b>	<p>DM 11.3</p> <p>Métodos quantitativos (2, 57-59)</p>
<b>Orientação</b>	<p>Para os métodos quantitativos, os controles internos da qualidade devem atender a todas as orientações do item DM 11.2 e, adicionalmente:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cada rotina analítica deve contemplar um controle interno negativo, positivo baixo e positivo alto;</li> <li>• Devem verificar controles e calibradores em relação a sua qualidade antes do uso, no caso dos métodos próprios;</li> <li>• Devem ser estabelecidos os critérios para a frequência, a verificação e a aceitabilidade da calibração do método;</li> <li>• Deve-se evitar utilizar os calibradores como controles. Caso sejam usados, devem ser preparados de maneira distinta;</li> <li>• Os métodos quantitativos e os equipamentos vinculados a eles devem atender ao item DM 7.9.</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se os itens relativos aos controles internos da qualidade descritos na orientação são atendidos.</li> </ul>
<b>Item</b>	<p>DM 11.4</p> <p>(PALC 11.11, 11.12, 11.13, 11.14 e 11.15)</p> <p>Avaliação externa da qualidade (60)</p>
<b>Orientação</b>	<p>O laboratório ou o setor de diagnóstico molecular deve atender aos itens 11.11, 11.12, 11.13, 11.14 e 11.15 da Norma PALC vigente relativos ao controle externo da qualidade proveniente de um provedor habilitado ou implantar uma avaliação externa alternativa. O supervisor do laboratório/setor ou o responsável designado deve rever e analisar criticamente os resultados das avaliações externas da qualidade. Registros dessa análise devem ser mantidos. A avaliação externa por meio de uma abordagem com base no método pode ser aplicada (sequenciamento de primeira geração, NGS, MLPA e outros) (vide orientação DM 9.6).</p>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se os itens relativos ao controle externo da qualidade da Norma PALC vigente, descritos nesta orientação, são atendidos.</li> </ul>
<b>Item</b>	<p>DM 11.5</p> <p>Estatística de resultados</p>
<b>Orientação</b>	<p>Devem ser mantidas as estatísticas dos resultados de testes moleculares de maneira que permita o acompanhamento do desempenho analítico, a avaliação de tendências e a detecção de erros sistemáticos. Exemplos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Percentagem de resultados normais e anormais;</li> <li>• Frequência alélica ou genotípica;</li> <li>• Estudos comparativos, se aplicável.</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• O procedimento para cálculo de estatísticas e os respectivos registros, as avaliações (comparações) e as ações corretivas, quando aplicável.</li> </ul>
<b>Item</b>	<p>DM 11.6</p> <p>NGS – confirmação das variantes identificadas</p>
<b>Orientação</b>	<p>Em relação aos ensaios com base em sequenciamento NGS, deve-se determinar, durante a validação, quando um teste confirmatório para variantes identificadas</p>

	tem de ser realizado (exemplos: confirmação por sequenciamento de Sanger, PCR alelo específica, curva de dissociação ou químicas alternativas de NGS, entre outras). Se o laboratório concluir, durante a validação, que o teste confirmatório não é necessário, a razão para isso e os dados que suportam essa conclusão devem constar nos estudos de validação (vide nota DM 11.6).
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• O procedimento que descreve as indicações para que as variantes encontradas no NGS sejam confirmadas em outra metodologia e os estudos de validação, quando aplicáveis.</li> </ul>

## 12. Gestão da fase pós-analítica e dos laudos:

<b>Item</b>	DM 12.1 (PALC 12.1) Comunicação de resultados e disponibilização de laudos – confidencialidade
<b>Orientação</b>	Devem ser avaliados e definidos quais resultados e laudos de testes moleculares precisam ser transmitidos de forma a preservar a confidencialidade, devido aos riscos de discriminação ou estigmatização do paciente.
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimentos relativos à informação confidencial dos resultados e aos laudos de testes moleculares considerados críticos pelo laboratório, incluindo a entrega apenas para o paciente e em quais casos (considerar as cautelas aplicadas e os meios de baixa confidencialidade: intranet, Internet e fax).</li> </ul>

<b>Item</b>	DM 12.2 (PALC 12.2) Laudo com componentes subjetivos – assinatura
<b>Orientação</b>	O supervisor do laboratório/setor ou o responsável técnico designado, qualificado e habilitado deve rever e assinar o laudo definitivo sempre que houver um componente subjetivo ou interpretativo no resultado da análise (exemplo: painéis de genes).
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se há laudos com componentes subjetivos ou interpretativos do resultado e designação, qualificação e habilitação dos responsáveis pela revisão e pela assinatura de laudos.</li> </ul>

<b>Item</b>	DM 12.3 Conteúdo do laudo
<b>Orientação</b>	Os seguintes itens devem ser incluídos nos laudos, quando aplicáveis/apropriados: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sumário do método utilizado;</li> <li>• Analito(s), locus(i), gene(s) ou variante(s) genética(s) testado(s);</li> <li>• Sensibilidade analítica;</li> <li>• Valores de referência;</li> <li>• Definições para os valores de referência;</li> <li>• Intervalo analítico (métodos quantitativos) e abordagens de amostras acima ou abaixo do intervalo analítico;</li> <li>• Interpretação analítica e interpretação clínica;</li> <li>• Definição dos resultados reportáveis (exemplos: homozigoto selvagem, heterozigoto ou homozigoto mutante);</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limitações do método (exemplo: variantes não detectadas pelo ensaio);</li> <li>• Para os métodos próprios (<i>in house</i>), declaração de que o ensaio foi desenvolvido pelo próprio laboratório;</li> <li>• Cobertura e profundidade, quando aplicáveis e relevantes;</li> <li>• Descrição da cobertura do gene ou do painel de genes;</li> <li>• Descrição clara das áreas não cobertas pelo teste.</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Conteúdo dos laudos e confronto com esse item;</li> <li>• Procedimentos documentados e estudos de validações;</li> <li>• Se os laudos emitidos permitem uma interpretação adequada por parte de um médico não especialista;</li> <li>• Declaração relativa aos métodos próprios (vide nota DM 12.3).</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 12.4 Resultados preliminares
<b>Orientação</b>	Devem ser gerados resultados preliminares, quando apropriados. Discrepâncias entre os resultados preliminares e os laudos definitivos devem ser investigadas e documentadas.
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rastreabilidade dos dados que compõem o laudo, incluindo a emissão de resultados preliminares.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 12.5 Informações dos laudos – doenças genéticas complexas (61)
<b>Orientação</b>	Quando aplicável, nos 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 mutações não testadas (exemplos: duplicações/deleções dos/nos genes CFTR e BRCA 1 e 2 não detectadas pelo sequenciamento completo desses genes).
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Informações fornecidas nos laudos dos testes genéticos para doenças complexas;</li> <li>• Liberação do risco residual dos resultados negativos, com base nas frequências conhecidas dos alelos na população (recomendável).</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 12.6 Discussão e implicação clínica do resultado – doenças genéticas complexas (2)
<b>Orientação</b>	Quando aplicável, para 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 a herança recessiva ou dominante, risco de recorrência, penetrância, gravidade e outros aspectos da correlação genótipo/fenótipo.
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar registros de validação e revalidação, incluindo:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inclusão da implicação clínica do resultado nos testes para doenças genéticas complexas (não é aceitável liberação de laudos apenas com resultado “positivo” para uma mutação).</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 12.7 Recomendação para aconselhamento genético (2)
<b>Orientação</b>	Quando aplicável, o laudo deve incluir recomendações para que o paciente receba aconselhamento genético e esclarecimentos acerca das implicações do resultado do teste, dos riscos residuais, das incertezas e das opções médicas e reprodutivas, uma vez que os resultados de testes genéticos moleculares são complexos e probabilísticos.



<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Testes genéticos cujos resultados implicam aconselhamento genético ou esclarecimentos adicionais;</li> <li>• Inclusão dessas informações no laudo;</li> <li>• Assistência de um profissional capacitado disponibilizado pelo laboratório para esclarecimento do médico e do paciente.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 12.8 Nomenclatura de genes, loci e mutações (62, 63)
<b>Orientação</b>	<p>A nomenclatura para designar os genes, o loci e as mutações recomendada por diretrizes profissionais deve ser usada.</p> <p>Quando aplicáveis, os símbolos oficiais, como, por exemplo, ERBB2, devem ser usados juntamente aos nomes coloquiais utilizados na literatura médica (exemplos: HER2, HER-2/neu, TKR1) para melhorar a clareza e evitar mal-entendidos.</p>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nomenclatura para genes, loci e mutações utilizadas nos laudos.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 12.9 Interpretação e comunicação de variantes genéticas (46, 48, 64)
<b>Orientação</b>	<p>A interpretação e a comunicação de variantes devem seguir as recomendações científicas e as diretrizes profissionais. Se aplicável, o laboratório/setor de diagnóstico molecular precisa ter um algoritmo para classificar e interpretar o significado clínico das variantes identificadas que inclua a relação causa-efeito (gene-doença), principalmente no contexto do sequenciamento de exoma/genoma. A versão do genoma referência utilizada para o alinhamento e a chamada da variante deve ser relatada. A posição cromossomal variante (exemplo: coordenada genômica) deve ser relatada. As orientações ACMG têm de ser usadas para a classificação e a interpretação de variantes/mutações germinativas. Para mutações somáticas, como, por exemplo, tumores, deve-se considerar a frequência da variante por tipo de tumor (exemplo: banco de dados COSMIC), a função específica do gene, a disponibilidade de terapia direcionada e outros fatores clinicopatológicos específicos do paciente. As variantes precisam ser designadas, utilizando a nomenclatura HGVS, e incluir o nome do gene definido pela HUGO Gene Nomenclature Committee e um identificador padrão para o transcrito/a proteína que permita o mapeamento inequívoco da variante (exemplos: REFSeq Accession Number, Ensemble Transcript/Protein ID ou CCDS ID). Deve haver procedimentos que descrevam a frequência com que as variantes encontradas pelo laboratório são reavaliadas e qual ação tem de ser tomada quando há uma mudança da classificação (como, por exemplo: de significado clínico indeterminado para patogênica).</p>
<b>Exemplos</b>	<p>Verificar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimento que descreve o processo usado para classificação, interpretação e comunicação das variantes genéticas;</li> <li>• Registros de conformidade com procedimento de classificação, interpretação e comunicação de variantes;</li> <li>• Banco de dados de variantes identificadas e/ou relatadas pelo laboratório;</li> <li>• Registros das ações tomadas quando as variantes são reclassificadas;</li> <li>• Exemplo de ação: notificação formal ao médico solicitante.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 12.10 Laudo NGS

<b>Orientação</b>	Para cada laudo de paciente, a versão específica do processo analítico de bioinformática utilizado para gerar e analisar dados NGS deve ser rastreável, incluindo cada componente ( <i>softwares</i> , <i>scripts</i> e banco de dados) e suas configurações (linha de comando e outros itens de configuração). A versão do processo deve ser incluída no laudo (exemplo: NGS pipeline v1. 01).
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rastreabilidade da versão do processo analítico de bioinformática utilizado para gerar os laudos dos métodos que envolvem sequenciamento NGS.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 12.11 Laudos dos testes de paternidade (4)
<b>Orientação</b>	O laudo do teste de paternidade deve incluir: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Um índice individual de chance de paternidade para cada sistema genético;</li> <li>• Um índice de paternidade combinado;</li> <li>• A probabilidade de paternidade percentual;</li> <li>• A chance de paternidade <i>a priori</i> utilizada nos cálculos;</li> <li>• A população fonte das frequências alélicas usadas para os cálculos.</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Conteúdo dos laudos, interpretação dos resultados e critérios para exclusão;</li> <li>• Adequação do laudo às diretrizes da área (exemplo: SWGDAM).</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 12.12 Laudo para identificação de aneuploidias fetais pelo sequenciamento do plasma materno por NGS (52)
<b>Orientação</b>	O laudo da identificação de aneuploidias fetais pelo sequenciamento do plasma materno por NGS deve incluir: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Informações a respeito da sensibilidade, da especificidade, do valor preditivo positivo e do valor preditivo negativo do ensaio para cada aneuploidia avaliada;</li> <li>• Fração fetal da amostra e risco para aneuploidia, claramente visíveis;</li> <li>• Informações qualitativas ou quantitativas para cada cromossomo avaliado no ensaio (exemplos: score-z e fração fetal);</li> <li>• Valores de referência ou ponto de corte, se aplicáveis;</li> <li>• Sumário e interpretação relativos ao risco/à categoria do resultado;</li> <li>• Se possível, uma interpretação final que inclua ou se refira a resultados prévios e relevantes para o caso;</li> <li>• Declaração de que se trata de um teste de triagem e não de diagnóstico;</li> <li>• Declaração de que os resultados positivos devem ser confirmados por um teste diagnóstico (exemplos: amniocentese e amostragem de vilosidade coriônica);</li> <li>• Declaração de que este teste não avalia o risco para defeitos no tubo neural;</li> <li>• Explicação para os resultados inconclusivos ou falhos;</li> <li>• Recomendações a respeito dos próximos passos para os casos inconclusivos ou falhos (exemplo: fração fetal insuficiente);</li> <li>• Informações de quando o resultado inconclusivo/falho é consequência de dissomia uniparental ou consanguinidade dos pais;</li> <li>• Declaração de que desbalanceamentos genômicos maternos, constitucionais ou adquiridos (vide exemplo 1) e desbalanceamentos no genoma fetoplacental (vide exemplo 2) podem dificultar a interpretação e têm potencial para gerar falso-positivos.</li> </ul>
<b>Exemplos</b>	Verificar no conteúdo dos laudos: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Informações qualitativas ou quantitativas dos cromossomos avaliados;</li> <li>• Valores de referência ou ponto de corte;</li> <li>• Interpretação do resultado com estimativa do risco para aneuploidia identificada;</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Declarações e recomendações conforme descrição na orientação.</li> <li>• Exemplo 1: aneuploidia do cromossomo X, microdeleções, neoplasia, quimerismo devido a transplante de órgãos e mosaicismos;</li> <li>• Exemplo 2: mosaicismo confinado a placenta.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 12.13 Política para tratamento de achados incidentais (65-68)
<b>Orientação</b>	Deve haver procedimento documentado para comunicação de achados incidentais ou secundários não relacionados com a finalidade clínica do exame (vide nota DM 2.4).
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimento que descreve quais e por que razões descobertas sem relação com a finalidade clínica do exame são relatadas;</li> <li>• Respectivos registros relacionados com este processo;</li> <li>• Consentimentos informados sobre achados incidentais, se aplicáveis.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 12.14 Banco de variantes genéticas
<b>Orientação</b>	Deve ser mantido um registro atualizado das mutações, dos polimorfismos benignos e das variantes de significância indeterminada para os genes analisados, se aplicável.
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Banco de variantes genéticas e mutações para os genes que o laboratório sequencia;</li> <li>• Respectivos registros de atualizações (exemplo: painéis de genes por NGS).</li> </ul>

## 13. Gestão de pessoas:

<b>Item</b>	DM 13.1 (PALC 13.3) Qualificação de pessoal
<b>Orientação</b>	O pessoal que executa as técnicas de diagnóstico molecular deve ter nível superior e experiência comprovada na área molecular, ou deve atuar sob supervisão direta de um profissional com essa qualificação.
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Atuação do pessoal que executa as técnicas de diagnóstico molecular;</li> <li>• Análise dos respectivos currículos.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 13.2 (PALC 13.3) Treinamento introdutório e de educação continuada (2)
<b>Orientação</b>	Deve haver um treinamento introdutório para os principiantes e um programa de educação continuada para toda a equipe.
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Planos e registros de treinamento inicial e continuado.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 13.3 (PALC 13.9) Segurança do pessoal em função do risco ocupacional

<b>Orientação</b>	Deve haver procedimentos em relação a manipulação, armazenamento e descarte de produtos e substâncias químicas que possam acarretar risco ocupacional (exemplos: brometo de etídio, poliacrilamida e tiocianato de guanidina).
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• FISPQ dos reagentes do setor;</li> <li>• Lista de reagentes ou substâncias químicas que oferecem risco ocupacional;</li> <li>• Procedimentos e treinamentos em relação a essas substâncias.</li> </ul>

## 14. Gestão da informação técnica:

<b>Item</b>	DM 14.1 Literatura científica utilizada
<b>Orientação</b>	A literatura científica referente, a qual descreve os processos, os procedimentos, as metodologias e os métodos executados no laboratório/setor deve estar disponível e atualizada.
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Literatura científica referente aos métodos próprios, utilidade clínica do teste, diretrizes profissionais utilizadas, cálculos executados, novas metodologias, reagentes para métodos próprios (<i>in house</i>) e equipamentos, entre outros.</li> </ul>

## 15. Gestão ambiental e da segurança:

<b>Item</b>	DM 15.1 (PALC 15.3) Substâncias tóxicas específicas – PGRSS
<b>Orientação</b>	O PGRSS deve incluir o manuseio e o descarte das substâncias tóxicas específicas do setor (exemplos: brometo de etídio, poliacrilamida, tiocianato de guanidina, entre outros).
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• FISPQ dos reagentes do setor;</li> <li>• Lista de reagentes ou substâncias químicas tóxicas;</li> <li>• Procedimentos em relação a essas substâncias no PGRSS.</li> </ul>

<b>Item</b>	DM 15.2 Cabine de segurança química (69)
<b>Orientação</b>	Uma cabine de segurança com exaustão apropriada (ou unidade de filtragem química) deve estar disponível para todos os procedimentos que utilizem ou gerem produtos químicos voláteis.
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se há procedimentos que utilizam ou geram produtos químicos voláteis e se estes atendem essa orientação;</li> <li>• Certificação anual da cabine.</li> </ul>

<b>Item</b>	DM 15.3 Cabine de segurança biológica (69)
<b>Orientação</b>	Uma cabine de segurança biológica deve estar disponível, quando apropriada, a depender da classificação de risco do agente etiológico manipulado (exemplos: influenzavírus, <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , entre outros).

<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Necessidade de uma cabine de segurança biológica e sua classe, a depender da classificação de risco do agente etiológico (exemplo: classe IIB2);</li> <li>• Certificação anual dessa cabine em relação aos filtros, ao fluxo de ar e à luz UV.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 15.4 EPI e EPC (69)
<b>Orientação</b>	Deve haver procedimentos que descrevam quais EPIs e EPCs são necessários em cada processo.
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimento descrevendo EPI/EPC necessários para a execução das diferentes atividades do setor e sua disponibilidade.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 15.5 Proteção para luzes UV (2)
<b>Orientação</b>	Se forem utilizadas fontes de luz UV, proteção adequada deve estar disponível para os usuários.
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fontes de luz UV e respectivas proteções para o usuário.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 15.6 Refrigeradores
<b>Orientação</b>	Os refrigeradores não devem conter materiais impróprios.
<b>Exemplos</b>	Verificar registros de validação e revalidação, incluindo: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Por exemplo, existência de amostras contaminadas externamente, materiais voláteis não fechados, em refrigeradores de alimentos.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 15.7 (PALC 15.5) Limpeza – superfícies contaminadas
<b>Orientação</b>	Deve haver procedimento para limpeza de superfícies contaminadas com ácido nucleicos e produtos previamente amplificados.
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimento para limpeza de superfícies de trabalho.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 15.8 (PALC 15.5) Limpeza – área pós-amplificação
<b>Orientação</b>	Dever haver procedimento de limpeza apropriado para a área de pós-amplificação que impeça a disseminação de produtos previamente amplificados para outros locais.
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimento para limpeza da área de pós-amplificação.</li> </ul>

## 16. Gestão do sistema de informação laboratorial (SIL):

<b>Item</b>	DM 16.1 Novas versões de <i>softwares</i>
-------------	--

<b>Orientação</b>	As novas versões de <i>softwares</i> devem ser validadas com o uso de controles/amostras com resultados conhecidos antes do seu uso na rotina.
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimento e registros relativos à avaliação das novas versões dos <i>softwares</i>.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 16.2 (PALC 16.11) Backup dos dados em nuvem
<b>Orientação</b>	Caso o laboratório utilize sistemas com base em nuvem para <i>backups</i> de dados, as medidas de segurança apropriadas devem ser adotadas.
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• procedimentos usados para garantir a segurança dos dados armazenados em nuvem, como uso de protocolos seguros e criptografados para transferência de dados (por exemplo, SFTP, HTTPS, FTPS), sistema e autenticação de usuários, registros de atividade e restrições de acesso.</li> </ul>
<b>Item</b>	DM 16.3 Transmissão de dados – NGS
<b>Orientação</b>	O laboratório ou o setor de diagnóstico molecular deve garantir que o armazenamento interno e externo e a transferência dos dados NGS mantenham a confidencialidade do paciente e a segurança e a integridade dos dados. Esses procedimentos precisam atender também às exigências legais em relação à segurança de dados sensíveis dos pacientes aplicáveis no país (vide nota DM 16.3).
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Registros relativos aos parâmetros de segurança, aos protocolos de transmissão e aos locais para armazenamento dos dados NGS, incluindo criptografia, controle de acesso físico e virtual aos dados, <i>backups</i> e redundância do sistema;</li> <li>• Registros relativos à rastreabilidade das transferências, a qual envolve dados NGS: arquivos, data/hora, identificação de usuário, se aplicáveis, e sistemas de envio e recebimento;</li> <li>• Cópias dos contratos e certificação das empresas terceirizadas responsáveis pelas análises ou pelo armazenamento dos dados NGS que comprovem as políticas relacionadas com a confidencialidade e a segurança das informações sensíveis dos pacientes.</li> </ul>

## 17. Gestão de riscos e segurança do paciente:

<b>Item</b>	DM 17.1 Garantia da qualidade com base na avaliação da gestão de risco
<b>Orientação</b>	A garantia da qualidade deve monitorar todas as fases do processo baseando-se na avaliação de risco feita pelo laboratório e nas instruções dos fabricantes (vide nota DM 17.1).
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Avaliação de riscos do setor e sua correlação com a gestão do sistema de qualidade (sessão 2), gestão de não conformidades, reclamações, melhoria contínua e garantia da qualidade (sessão 11).</li> </ul>

<b>Item</b>	DM 17.2 Validade clínica e utilidade clínica dos métodos, dos testes e dos exames de biologia molecular
<b>Orientação</b>	O laboratório ou o setor de diagnóstico molecular deve ser capaz de comprovar a validade clínica e a utilidade clínica dos métodos, dos testes e dos exames que oferece.
<b>Exemplos</b>	Verificar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Documentos da literatura que suportam a validade clínica e a utilidade clínica do método, do teste ou dos exames em questão.</li> </ul>

## 18. Notas:

### Nota DM 2.4

Sequenciamento de painéis de genes, exoma, genoma, transcriptoma, estudos de vínculo genético, painéis de vírus e outros exames podem resultar em descobertas não relacionadas com a apresentação clínica pela qual o paciente se submeteu ao exame. O laboratório deve possuir procedimento que descreva quais e por que razões os achados incidentais ou secundários devem ser reportados ao médico solicitante e ao paciente, quando aplicável, incluindo a forma de comunicação. O laboratório pode seguir as recomendações da *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) ou desenvolver suas próprias políticas. Limitar-se à análise dos genes relevantes para o diagnóstico diminui, mas não elimina a possibilidade de achados incidentais (65-68).

### Nota DM 3.1

Exemplos de critérios objetivos para interpretação dos resultados de pacientes e controles:

- Para testes qualitativos – padrão de bandas esperado, temperatura de dissociação e ponto de corte numérico para distinção entre resultados positivos e negativos;
- Para testes quantitativos – sensibilidade e linearidade dentro dos padrões preestabelecidos, ausência de inibição significativa nas amostras dos pacientes e valor liberado compatível com a inspeção visual do resultado bruto;
- Para ensaios com base no método – métricas ou parâmetros para monitorar o desempenho do processo a cada corrida analítica (por exemplo, qualidade das bases, percentagem de leituras, incluindo a sequência-alvo, cobertura da sequência-alvo, número e tipo de variantes chamadas etc.).

### Nota DM 3.2

#### **Validação clínica:**

Avalia a concordância entre os resultados obtidos pelo método em validação, bem como o diagnóstico clínico. Pode ser utilizada quando não existe método de referência, quando a frequência de exames é baixa (doenças infecciosas e genéticas raras) e ainda quando não é possível a comparação com o método atual, por se tratar de um avanço na técnica utilizada. Deve-se obter informações clínicas e exames complementares que permitam a classificação dos pacientes como normais ou saudáveis (alterados), sendo necessário que ambas as populações sejam incluídas na validação.

#### **Validação em andamento (*ongoing*)**

Havendo limitações ou particularidades para validar um ensaio (obtenção de amostras positivas ou de padrões com concentração conhecida, cultura de microrganismos, tipo de amostra rara e resultado raro), um número de amostras ou tipo de amostras pequeno poderá ser adotado. No entanto, é necessário o acompanhamento do desempenho e dos resultados do teste até que um número adequado de amostras seja alcançado (conforme preconizado pelo sistema de qualidade). São necessários os mesmos estudos de uma validação analítica. E, enquanto não se finalizada a validação, uma frase relatando que a validação está em andamento e a importância da correlação com a clínica para interpretação do resultado devem ser adicionadas ao laudo.

#### **Validação emergencial**

Neste caso, em que não é possível a validação integral do método, aceitam-se os critérios de habilitação apresentados pelo fabricante nas instruções de uso, com o compromisso de realizar os estudos de validação tão logo se encerre a situação emergencial. São consideradas as características de desempenho do método: precisão intra e interensaio e, nos casos indicados, comparação de métodos.

### **Nota DM 4.3**

Em diagnóstico molecular, a maior parte dos materiais de referência e controle não estão disponíveis comercialmente ou são de difícil obtenção. Para controlar a qualidade das etapas do processo, é essencial o uso desses materiais na forma mais semelhante à das amostras de pacientes na corrida analítica (matriz original, preferencialmente, ou ácido nucleico isolado). Assim, e em consonância com opiniões de entidades internacionais, remanescentes de amostras e derivados relevantes, as amostras podem ser armazenadas para os usos supracitados, desde que mantidos os cuidados apropriados para sua conservação e a segurança em relação à confidencialidade. Devem-se preferir amostras anonimizadas ou na forma de pools. Elas têm de ser armazenadas de forma que permita sua pronta recuperação e a execução de outros ensaios (6, 7).

### **Nota DM 7.6**

A avaliação de desempenho de novos lotes pode ser feita por comparação com o lote anterior previamente validado ou mediante avaliação do desempenho perante amostras com resultados conhecidos, como, por exemplo, controles internos.

### **Nota DM 7.7**

Os parâmetros como tamanho, percentual de guanina-citosina (%GC), temperatura de fusão ( $T_m$ ) e localização genômica podem ser obtidos a partir da sequência. Algumas sequências podem não estar disponíveis, se forem objeto de proteção comercial. Considera-se que os reagentes de ácido nucleico – *primers*, sondas e outras sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA)/ácido ribonucleico (RNA) sintéticas – têm prazo de validade longo (> 2 anos) se armazenados apropriadamente(70). Seu desempenho pode ser monitorado a cada corrida analítica por meio dos controles internos ou das métricas e dos parâmetros de qualidade.

### **Nota DM 7.8**

Não há especificações claras sobre o grau de pureza mínimo da água reagente para diagnóstico molecular, e este pode variar, dependendo da aplicação. É consenso que deve ser livre de nucleases, proteases e ácidos nucleicos (71). Além disso, alguns fabricantes sugerem que tenha alta pureza iônica (resistividade > 18 MΩ·cm), níveis razoavelmente baixos de compostos orgânicos [carbono orgânico total (TOC) < 10 ppb] e conteúdo microbiológico (UFC/ml < 1) (72-74). No entanto, independentemente de sua forma de obtenção, a qualidade da água se deteriora com tempo e uso (71). O certificado de análise produzido no momento do envase não garante que a água comercial possua as especificações nele contidas no momento do uso (71-75).



Ademais, monitorar a resistividade, o conteúdo microbiológico e os compostos orgânicos da água reagente para diagnóstico molecular pode ser útil para classificá-la como não apta, mas não é suficiente para classificá-la com apta; os ensaios para desoxirribonuclease (DNAse) e ribonuclease (RNAse) não são amplamente difundidos (76). Portanto, o monitoramento mais adequado é o funcional (71).

Individualmente ou em conjunto, as abordagens listadas a seguir são suficientes para sua validação e seu monitoramento(71):

- Uso como branco de reação e em amostras controles, amostras previamente testadas com resultados aceitáveis, material de referência ou calibradores;
- Comparação com uma água autenticada;
- Revisão dos registros dos controles internos e externos da qualidade.

## Nota DM 7.10

Medida posterior da acurácia da temperatura dos poços, como produtividade da amplificação, pode ser uma opção para o atendimento funcional a esse critério.

## Nota DM 9.3

Características de desempenho no contexto de um método molecular (30, 32):

- Sensibilidade analítica – número mínimo de cópias em uma amostra que podem ser detectadas com certeza razoável por um determinado método (95% de probabilidade são comumente utilizados). É expressa tipicamente como limite de detecção (LOD);
- Precisão – concordância entre medidas idênticas feitas com a mesma amostra (réplicas). Tem dois componentes importantes: repetitividade e reprodutividade. A repetitividade (precisão de curto prazo ou variação intraensaio) refere-se à robustez e à precisão do método com as mesmas amostras repetidamente analisadas no mesmo ensaio; já a reprodutibilidade (precisão de longo prazo ou variação interensaio), à variação entre os resultados das mesmas amostras em diferentes corridas analíticas;
- Veracidade (exatidão, acurácia) – diferença entre concentrações ou resultados obtidos e reais. Pode ser medida por comparação com um kit comercial, comparação interlaboratorial ou por ensaios de recuperação. Útil para verificar se o método está produzindo resultados válidos e verdadeiros;
- Especificidade analítica – detecção da sequência-alvo apropriada em vez de outros alvos não específicos também presentes na amostra;
- Intervalo reportável – número mínimo e máximo de cópias que um método quantitativo pode reportar com confiança;
- Intervalo de referência – faixa de valores esperados para 95% dos indivíduos supostamente “saudáveis” ou “normais” em uma determinada população; pouco aplicável para diagnóstico molecular;
- Sensibilidade clínica – percentual de indivíduos com determinada condição que o método classifica como positivo (ou detectado);
- Especificidade clínica – percentual de indivíduos sem determinada condição que o método classifica como negativo (ou não detectado).

## Nota DM 9.4

- Para os ensaios com número limitado de resultados possíveis, todos devem ser testados, por exemplo, fator V Leiden;
- Para os ensaios com considerável heterogeneidade de resultados possíveis, um número razoável deles deve ser testado, por exemplo, genotipagem para papilomavírus humano (HPV);
- Para os ensaios quantitativos, deve-se testar um número razoável de amostras por todo intervalo reportável do ensaio;

- Para os ensaios com número significativo de resultados exclusivos, deve-se comprovar que o método tem excelente acurácia ou executar validação com base no método, por exemplo, sequenciamento BRCA 1 e 2.

## Nota DM 9.5

Tipo de amostra (matriz) rara, cuja corrida analítica foi validada com o uso de controles internos; pode ter seu resultado liberado desde que exista uma nota no laudo informando que o tipo de matriz em questão não foi validado, devendo seu resultado ser avaliado juntamente a outros exames correlatos ou dados clínicos.

## Nota DM 9.6

Ao se utilizar o mesmo processo em ensaios concebidos para detectar o mesmo tipo de variante, por exemplo, diferentes painéis de genes Next Generation Sequencing (NGS) com a mesma química de enriquecimento das regiões-alvo, uma única validação com base nos métodos pode ser realizada, e os resultados desses ensaios podem ser agrupados nessa única validação.

## Nota DM 9.8

A verificação em andamento (*ongoing*) é análoga à validação em andamento (*ongoing*), considerando-se a diferença entre validação e verificação (vide nota DM 3.2). Na verificação emergencial, não é possível a verificação do método, e, se aceitas as características de desempenho apresentadas pelo fabricante nas instruções de uso com o compromisso de realizar os estudos de verificação, tão logo se encerra a situação emergencial.

## Nota DM 9.10

Os seguintes procedimentos podem ser utilizados para minimizar a contaminação com produtos previamente amplificados: barreiras físicas adequadas entre áreas pré e pós-amplificação, equipamentos (pipetas, centrifugas etc.) e materiais (jalecos, luvas etc.) dedicados às áreas pré e pós-amplificação; fluxo unidirecional das amostras entre essas mesmas áreas; preparo das reações em fluxo laminar ou cabine de reação em cadeia da polimerase (PCR); uso de ponteiras com filtro; amplificação em tempo real; monitoramento com reação em branco (H<sub>2</sub>O); destruição enzimática dos produtos pré-amplificados – por exemplo, uracil-N-glicosilase (UNG)/uracil-DNA glicosilase (UDG); preferência pela seguinte ordem das amostras na reação: pacientes, controles positivos e controles negativos.

## Nota DM 9.13

Verificar se os métodos com base em PCR convencional atendem também às orientações DM 7.4 e DM 7.5 (verificação ou validação do método), DM 7.6 (validação e rastreabilidade dos novos lotes de reagentes), DM 7.7 (*primers* e sondas), DM 7.8 (água reagente), DM 7.9 (manutenção e desempenho dos sistemas de leitura), DM 7.10 (manutenção dos termocicladores), DM 8.1 (documentação pré-analítica), DM 8.3 (documentação pré-analítica – diagnóstico pré-natal não invasivo, se aplicável), DM 8.5 (conservação das amostras), DM 8.6 (identificação da amostra ao longo do processo), DM 9.1 (extração de DNA/RNA), DM 9.3, DM 9.4 e DM 9.5 (validação, se aplicável), DM 9.8 (verificação, se aplicável), DM 9.9 (modificações nos métodos comerciais), DM 9.10 (contaminação), DM 9.12 e DM 11.1 (controle de reação/amplificação), DM 11.2 ou DM 11.3 (controles internos), DM 11.4 (avaliação externa da qualidade), DM 11.5 (estatísticas de resultados), DM 16.1 (novas versões dos *softwares*), DM 5.1 (registro de ações corretivas), DM 5.2 (registros de exceções), DM 12.3 (informações incluídas no laudo), DM 17.3 (utilidade e validade clínica do exame).

## Nota DM 9.14

Verificar se os métodos com base na PCR em tempo real (qPCR) atendem também às orientações DM 7.4 e DM 7.5 (verificação ou validação do método), DM 7.6 (validação e rastreabilidade dos novos lotes de reagentes), DM 7.7 (*primers* e sondas), DM 7.8 (água reagente), DM 7.9 (manutenção e desempenho dos sistemas de leitura), DM 7.10 (manutenção dos termocicladores), DM 8.1 (documentação pré-analítica), DM 8.3 (documentação pré-analítica – diagnóstico pré-natal não invasivo, se aplicável), DM 8.5 (conservação das amostras), DM 8.6 (identificação da amostra ao longo do processo), DM 9.1 (extração de DNA/RNA), DM 9.3, DM 9.4 e DM 9.5 (validação, se aplicável), DM 9.8 (verificação, se aplicável), DM 9.9 (modificações nos métodos comerciais), DM 9.10 (contaminação), DM 9.12 e DM 11.1 (controle de reação/amplificação), DM 11.2 ou DM 11.3 (controles internos), DM 11.4 (avaliação externa da qualidade), DM 11.5 (estatísticas de resultados), DM 16.1 (novas versões dos *softwares*), DM 5.1 (registro de ações corretivas), DM 5.2 (registros de exceções), DM 12.3 (informações incluídas no laudo) e DM 17.3 (utilidade e validade clínica do exame).

## Nota DM 9.15

Danos na sequência, na inibição ou na baixa sensibilidade do ensaio podem interferir na quantificação ou na reação por PCR digital (dPCR). Apesar de a dPCR gerar medidas precisas, essa precisão depende do número médio da molécula-alvo por partição (que é ditado pela concentração da amostra original e como ela foi preparada) e do número de partições. Consequentemente, é necessária uma estimativa prévia da concentração da sequência-alvo na amostra. Replicatas biológicas são recomendadas, pois existe variação na quantidade de ácido nucleico extraído e na quantidade de inibidores copurificados, e ambos podem influenciar adversamente a transcrição reversa ou a reação de dPCR. Apesar desse tipo de reação depender menos da eficiência da reação em comparação com a qPCR, a eficiência influencia a sensibilidade (42).

Verificar se os métodos com base na dPCR atendem também às orientações DM 7.4 e DM 7.5 (verificação ou validação do método), DM 7.6 (validação e rastreabilidade dos novos lotes de reagentes), DM 7.7 (*primers* e sondas), DM 7.8 (água reagente), DM 7.9 (manutenção e desempenho dos sistemas de leitura), DM 7.10 (manutenção dos termocicladores), DM 8.1 (documentação pré-analítica), DM 8.3 (documentação pré-analítica – diagnóstico pré-natal não invasivo, se aplicável), DM 8.5 (conservação das amostras), DM 8.6 (identificação da amostra ao longo do processo), DM 9.1 (extração de DNA/RNA), DM 9.3, DM 9.4 e DM 9.5 (validação, se aplicável), DM 9.8 (verificação, se aplicável), DM 9.9 (modificações nos métodos comerciais), DM 9.10 (contaminação), DM 9.12 e DM 11.1 (controle de reação/amplificação), DM 11.2 ou DM 11.3 (controles internos), DM 11.4 (avaliação externa da qualidade), DM 11.5 (estatísticas de resultados), DM 16.1 (novas versões dos *softwares*), DM 5.1 (registro de ações corretivas), DM 5.2 (registros de exceções), DM 12.3 (informações incluídas no laudo) e DM 17.3 (utilidade e validade clínica do exame).

## Nota DM 9.17

Verificar se os ensaios com base em eletroforese em gel atendem também às orientações DM 7.4 e DM 7.5 (verificação ou validação do método), DM 7.6 (validação e rastreabilidade dos novos lotes de reagentes), DM 7.8 (água reagente), DM 8.6 (identificação da amostra ao longo do processo), DM 9.1 (extração de DNA/RNA, se aplicável), DM 9.3, DM 9.4 e DM 9.5 (validação, se aplicável), DM 9.12 e DM 11.1 (controle de reação/amplificação), DM 9.18 (completude e especificidade da digestão com endonucleases, se aplicável), DM 15.5 [proteção para luzes ultravioleta (UV)], DM 11.2 ou DM 11.3 (controles internos), DM 11.4 (avaliação externa da qualidade), DM 16.1 (novas versões dos *softwares*), DM 5.1 (registro de ações corretivas), DM 5.2 (registros de exceções) e DM 12.3 (informações incluídas no laudo).

## Nota DM 9.19

Verificar se os métodos com base em sequenciamento de primeira geração também atendem aos itens DM 7.4 e DM 7.5 (verificação ou validação do método), DM 7.6 (validação e rastreabilidade dos novos lotes de reagentes), DM 7.7 (*primers* e sondas), DM 7.8 (água reagente), DM 7.9 (manutenção e desempenho dos sistemas de leitura), DM 7.10 (manutenção dos termocicladores), DM 8.1 (documentação pré-analítica), DM 8.5 (conservação das amostras), DM 8.6 (identificação da amostra ao longo do processo), DM 9.1 (extração de DNA/RNA), DM 9.3, DM 9.4 e DM 9.5 (validação, se aplicável), DM 9.8 (verificação, se aplicável), DM 9.9 (modificações nos métodos comerciais), DM 9.10 (contaminação), DM 9.12 e DM 11.1 (controle de reação/amplificação), DM 11.2 ou DM 11.3 (controles internos), DM 11.4 (avaliação externa da qualidade), DM 11.5 (estatísticas de resultados), DM 16.1 (novas versões dos *softwares*), DM 5.1 (registro de ações corretivas), DM 5.2 (registros de exceções), DM 12.3 (informações incluídas no laudo), DM 12.2 (laudo com componentes subjetivos), DM 12.4 (resultados preliminares), DM 12.5 (informações laudos – doenças complexas), DM 12.6 (discussão e implicações clínicas do resultado), DM 12.6 (recomendação para aconselhamento genético, se aplicável), DM 17.1 (nomenclatura de genes, loci e mutações), DM 12.8 (interpretação e comunicação de variantes genéticas) e DM 17.3 (utilidade e validade clínica do exame).

## Nota DM 9.20

Verificar se os ensaios com base em análises de fragmentos por eletroforese capilar atendem aos itens DM 7.4 e DM 7.5 (verificação ou validação do método), DM 7.6 (validação e rastreabilidade dos novos lotes de reagentes), DM 7.7 (*primers* e sondas), DM 7.8 (água reagente), DM 7.9 (manutenção e desempenho dos sistemas de leitura), DM 7.10 (manutenção dos termocicladores), DM 8.2 (documentação de paternidade), DM 8.3 (documentação pré-analítica – diagnóstico pré-natal não invasivo, se aplicável), DM 8.5 (conservação das amostras), DM 8.6 (identificação da amostra ao longo do processo), DM 8.7 (recebimento e guarda de amostras forenses), DM 9.1 (extração de DNA/RNA), DM 9.3, DM 9.4 e DM 9.5 (validação, se aplicável), DM 9.8 (verificação, se aplicável), DM 9.9 (modificações nos métodos comerciais), DM 9.10 (contaminação), DM 9.12 e DM 11.1 (controle de reação/amplificação), DM 11.2 ou DM 11.3 (controles internos), DM 11.4 (avaliação externa da qualidade), DM 11.5 (estatísticas de resultados), DM 5.1 (registro de ações corretivas), DM 5.2 (registros de exceções), DM 12.3 (informações incluídas no laudo), DM 9.21 (dupla conferência dos resultados), DM 12.1 (transmissão dos laudos com confidencialidade), DM 12.3 (informações incluídas no laudo), DM 12.4 (resultados preliminares), DM 12.10 (laudos da paternidade) e DM 16.1 (novas versões dos *softwares*).

## Nota DM 9.22

Verificar se os métodos com base em arranjos também atendem aos itens DM 7.5 (verificação), DM 7.6 (validação e rastreabilidade dos novos lotes de reagentes), DM 7.8 (água reagente), DM 7.9 (manutenção e desempenho dos sistemas de leitura), DM 7.10 (manutenção dos termocicladores), DM 8.1 (documentação pré-analítica), DM 8.5 (conservação das amostras), DM 8.6 (identificação da amostra ao longo do processo), DM 9.1 (extração de DNA/RNA), DM 9.8 (verificação), DM 9.9 (modificações nos métodos comerciais), DM 9.10 (contaminação), DM 9.12 e DM 11.1 (controle de reação/amplificação), DM 11.2 ou DM 11.3 (controles internos), DM 11.4 (avaliação externa da qualidade), DM 11.5 (estatísticas de resultados), DM 16.1 (novas versões dos *softwares*), DM 5.1 (registro de ações corretivas), DM 5.2 (registros de exceções), DM 12.3 (informações incluídas no laudo) e DM 12.2 (laudo com componentes subjetivos).

## Nota DM 9.23

Verificar se os métodos com base em sequenciamento NGS também atendem aos itens DM 7.4 e DM 7.5 (verificação ou validação do método), DM 7.6 (validação e rastreabilidade dos novos lotes de reagentes), DM 7.7 (*primers* e sondas), DM 7.8 (água reagente), DM 7.9 (manutenção e desempenho dos sistemas de leitura), DM 7.10 (manutenção dos termocicladores), DM 8.1

(documentação pré-analítica), DM 8.3 (documentação pré-analítica – diagnóstico pré-natal não invasivo, se aplicável), DM 8.5 (conservação das amostras), DM 8.6 (identificação da amostra ao longo do processo), DM 9.1 (extração de DNA/RNA), DM 9.3, DM 9.4 e DM 9.5 (validação, se aplicável), DM 9.8 (verificação, se aplicável), DM 9.9 (modificações nos métodos comerciais), DM 9.10 (contaminação), DM 9.12 e DM 11.1 (controle de reação/amplificação), DM 11.2 ou DM 11.3 (controles internos), DM 11.4 (avaliação externa da qualidade), DM 11.5 (estatísticas de resultados), DM 16.1 (novas versões dos *softwares*), DM 5.1 (registro de ações corretivas), DM 5.2 (registros de exceções), DM 12.3 (informações incluídas no laudo), DM 12.2 (laudo com componentes subjetivos), DM 12.4 (resultados preliminares), DM 12.5 (informações laudos – doenças complexas), DM 12.6 (discussão e implicações clínicas do resultado), DM 12.6 (recomendação para aconselhamento genético, se aplicável), DM 17.1 (nomenclatura de genes, loci e mutações), DM 12.8 (interpretação e comunicação de variantes genéticas) e DM 17.3 (utilidade e validade clínica do exame).

## Nota DM 11.2

Controles internos da qualidade por tipo de método:

- Para os métodos do tipo presença/ausência, deve haver uma sistemática de verificação da sensibilidade analítica (detecção de níveis baixos de sequências-alvo);
- Para os métodos próprios (*in house*), deve ser corrido também o controle interno branco (água); a necessidade da inclusão desse controle nos métodos comerciais tem de ser considerada;
- Para os métodos qualitativos para variantes genéticas clinicamente relevantes – por exemplo, fator V Leiden –, devem ser corridos os seguintes controles internos: branco (água), homozigoto selvagem, heterozigoto e homozigoto mutante, em cada corrida analítica. Para os grandes painéis de mutações – por exemplo, fibrose cística – pode ser usado o sistema de rodízio dos controles positivos de forma que, periodicamente, os principais alvos sejam contemplados;
- Para os ensaios multiplex, deve haver controles positivos para todos os alvos em todas as corridas, no caso de grandes painéis, de maneira a possibilitar o uso de um sistema de rodízio dos controles positivos, de forma que, periodicamente, os principais alvos sejam contemplados;
- Para os testes que usam um valor de ponto de corte (cut-off) para a distinção entre os resultados positivos e os negativos, o valor do ponto de corte deve ser avaliado inicialmente e a cada seis meses depois da primeira avaliação. 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 indicada pelo controle da qualidade. Caso um controle interno próximo ao ponto de corte (baixo) seja utilizado em cada corrida analítica, essa orientação será atendida;
- Para os ensaios com base em métodos [sequenciamento de primeira e segunda geração – NGS e Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)], devem ser estabelecidos métricas e parâmetros de controle da qualidade para monitorar e avaliar o desempenho por corrida analítica, periodicamente (mensal ou trimestralmente)(36).

## Nota DM 11.4

Na avaliação externa alternativa, diante da impossibilidade da obtenção ou da troca de amostras primárias raras, estas podem ser substituídas por ácidos nucleicos extraídos ou sintéticos. Além disso, o controle externo alternativo pode ser executado confrontando os resultados do método em questão com os de um método alternativo (próprio ou comercial).

## Nota DM 11.6

Reconhece-se que a necessidade de confirmação para variantes/mutações detectadas por NGS pode mudar ao longo do tempo, como resultado de alterações na tecnologia. A lógica e os dados que suportam essa mudança na política de confirmação devem ser registrados.

### Nota DM 12.3

Exemplo de nota para métodos próprios:

"Este teste foi desenvolvido e teve suas características de desempenho determinadas pelo (nome do laboratório) de acordo com o preconizado pela legislação vigente (Ex.: RDC 302/2005 – Anvisa/MS) e pelas orientações técnicas específicas para diagnóstico molecular do Programa de Acreditação em Laboratórios Clínicos (PALC) da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial (SBPC/ML). "

### Nota DM 16.3

Reconhece-se que os laboratórios podem transferir dados do sequenciamento NGS a laboratórios de referência para a análise ou a empresas externas para o armazenamento dos dados, inclusive por meio de computação com base em nuvem. Procedimentos para garantir a confidencialidade podem incluir: segurança de mensagens, uso de protocolos seguros e criptografados para transferência de dados – por exemplo, Secure File Transfer Protocol (SFTP), Hyper Text Transfer Protocol Secure (HTTPS) e File Transfer Protocol + Secure Sockets Layer (FTPS), sistema de autenticação de usuários, registros de atividade, criptografia, restrições de acesso e *backups* adequados dos dados.

### Nota DM 17.1

Riscos frequentes no laboratório ou no setor de diagnóstico molecular: interrupção de energia elétrica; falha no sistema de refrigeração geral; liberação de resultado por profissional não qualificado; pane nos congeladores e nos refrigeradores em fim de semana ou feriado; falha na rastreabilidade do processo; troca de pacientes/amostra nas fases pré-analíticas e analíticas; falta de manutenção local e imediata dos equipamentos; falta de planos de contingência para fornecedores de produtos e serviços essenciais para a realização dos exames; descumprimento do procedimento do método; contaminação com produtos previamente amplificados; armazenamento incorreto dos kits; aceite de material/amostra não conforme; não realização de manutenção preventiva e corretiva dos equipamentos; uso de reagente fora do prazo de validade; uso de equipamentos descalibrados; dificuldade na validação de um processo por escassez de amostras; falha no controle externo; falha no controle interno; ausência de avaliação externa da qualidade; falta de estabilidade dos controles internos (RNA); falta de critérios para interpretação do controle de reação/amplificação; análise crítica incorreta do controle de reação/amplificação; não validação dos reagentes antes do uso; fornecedores sem certificação de qualidade; atraso na importação de reagentes; atraso na liberação alfandegária de reagentes; ausência do controle de reação/amplificação; não determinação de todos os parâmetros de desempenho relativos aos métodos próprios; oferecimento de teste sem utilidade clínica; incêndio do setor; falta de planejamento para implantação de melhorias no laboratório/setor; problema no lote dos reagentes; desconhecimento do profissional a respeito do processo que executa; troca de resultado na liberação; e ausência de comparabilidade entre equipamentos.

## 19. Abreviações utilizadas

AABB: American Association of Blood Banks

ACMG: American College of Medical Genetics and Genomics

Anvisa: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASR: Assay Specific Reagent  
BAI: BAM Archive Index  
BAM: Binary Alignment/Map  
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool  
CCDS: Consensus Coding Sequence  
cDNA: Complementary DNA  
CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator  
COSMIC: Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer  
DMSO: Dimetilsulfóxido;  
DNA: Deoxyribonucleic Acid  
dNTP: Desoxinucleotídeo  
dPCR: Reação em Cadeia da Polimerase Digital  
EPC: Equipamento de Proteção Coletiva  
EPI: Equipamento de Proteção Individual  
FASTQ: Arquivo de texto com sequência biológica e índice de qualidade correspondente.  
FISPQ: ficha de informação de segurança de produtos químicos  
FTPS: File Transfer Protocol SFTP (Secured File Transfer Protocol)  
GEVIT: Gerência de Produtos para Diagnóstico *in vitro*  
GGTES: Gerência-Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde  
GGTPS: Gerência-Geral de Tecnologia de Produtos para a Saúde  
GRECS: Gerência de Regulamentação e Controle Sanitário em Serviços de Saúde  
HGVS: Human Genome Variation Society  
HIV: Human Immunodeficiency Virus - Vírus da Imunodeficiência Humana  
HPV: Human Papillomavirus  
HTTPS: Hyper Text Transfer Protocol Secure  
HUGO: Human Genome Organization  
ISFG: International Society for Forensic Genetics  
IUO: Investigational Use Only  
KRAS: Kirsten Rat Sarcoma  
LTR: Long Terminal Repeats - Repetição Terminal Longa  
MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification - Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação  
NGS: Next Generation Sequencing  
PALC: Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos  
PCR: Polymerase Chain Reaction - Reação em Cadeia da Polimerase



**PGRSS:** Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde

**qPCR:** Quantitative real-time PCR - Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

**RDC:** Resolução da Diretoria Colegiada

**REFSeq:** Reference Sequence [National Center for Biotechnology Information (NCBI)]

**RNA:** Ribonucleic Acid

**RNases:** Ribonucleases

**RUO:** Research Use Only

**SFTP:** Secure File Transfer Protocol

**UTR:** Untranslated Region

**UV:** Ultravioleta

**VCF:** Variant Call Format

## 20. Glossário

**Ação corretiva** – ação implementada para eliminar a(s) causa(s) raiz(izes) de uma não conformidade, os defeito ou outra situação indesejável, a fim de prevenir sua repetição. É considerada uma ação reativa.

**Ação preventiva** – ação implementada para eliminar a(s) causa(s) raiz(izes) de uma não conformidade potencial. É considerada uma ação proativa. Deve-se notar que a ação preventiva, pela natureza de sua definição, não é aplicável a não conformidades já identificadas.

**Amostras anonimizadas** – amostras irreversivelmente dissociadas dos seus identificadores.

**Análise crítica** – atividade realizada para determinar a pertinência, a adequação e a eficácia daquilo que está sendo examinado, de modo a concluir se ele atende aos objetivos estabelecidos.

**Análise de riscos** – uso sistemático da informação disponível para identificar os perigos e estimar os riscos associados a um processo. A análise de risco inclui criar hipótese de diferentes sequências de eventos que podem gerar perigos e danos. A avaliação de risco (do inglês risk assessment) é o processo global que inclui a análise e a estimativa de riscos.

**Auditoria** – atividade de verificação planejada, programada e documentada, executada de preferência por pessoal independente da área auditada, para determinar, mediante investigação e avaliação de evidência objetiva, o ambiente, a adaptação e a observância de normas, especificações, procedimentos, instruções, códigos, atividades ou programas administrativos ou operacionais e outros documentos aplicáveis, bem como a efetividade da implementação desses documentos e os resultados que estão sendo obtidos. Pode ser externa ou interna.

**Avaliação externa da qualidade** – avaliação da acurácia ou da exatidão do desempenho de um sistema analítico que engloba o ensaio de proficiência e a avaliação externa alternativa.

**Avaliação externa da qualidade com base no método** – modalidade de teste proficiência em que a avaliação externa de qualidade tem como base o método e não o analito. Além da biologia molecular, também se aplica à citogenética, à citometria de fluxo e à imuno-histoquímica.



**Avaliação externa alternativa da qualidade** – avaliação da acurácia ou da exatidão do desempenho de um sistema analítico quando não há disponibilidade de ensaio de proficiência. Compreende métodos alternativos de avaliação da confiabilidade dos sistemas analíticos, como, por exemplo, controles interlaboratoriais, análise de amostras de referência e validação clínica.

**Calibração** – conjunto de operações que estabelecem, sob condições especificadas, a relação entre valores de quantidades indicadas por um instrumento ou sistema de medição, ou por valores representados por uma medida material ou material de referência, além dos valores correspondentes fornecidos por padrões.

**Características de desempenho** – vide nota DM 9.3.

**Causa raiz (do inglês *root cause*)** – é a causa que está na origem de uma não conformidade, ou seja, a causa mais básica ou fundamental para o defeito ou o problema em um produto ou serviço. A prova cabal de que uma causa definida como “raiz” foi correta é a sua eliminação, da qual deve decorrer a não repetição da não conformidade. Uma não conformidade pode, contudo, ter mais de uma causa raiz.

**Certificação** – modelo pelo qual uma terceira parte dá garantia escrita de que um produto, processo ou serviço está em conformidade com os requisitos especificados.

**Controle de reação/amplificação** – DNA/RNA endógeno ou exógeno detectado em toda amostra submetida – por exemplo, a amplificação de ácidos nucleicos –, com a finalidade de identificar reações falsamente negativas devido à presença de inibidores ou à ausência de DNA/RNA.

**Controle externo** – avaliação externa da qualidade. Material (amostra ou composto semelhante a uma amostra) usado exclusivamente para o monitoramento da acurácia ou da veracidade (exatidão) de um sistema analítico. Em geral, obtido de fontes externas, como um programa de avaliação externa da qualidade (programa 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 composto semelhante a uma amostra) usado exclusivamente para o monitoramento da estabilidade do sistema analítico (sua precisão ou sua 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 biologia molecular ou biologia sintética (plasmídeo ou DNA/RNA sintético que contenha a sequência ou a mutação de interesse).

**Correção** – ação para eliminar uma não conformidade encontrada. A correção não envolve o estudo das causas da não conformidade e visa apenas a solução imediata do problema ou defeito encontrado. Comumente chamada de “disposição”, “reparo” e outros termos aplicáveis a diferentes formas de correção.

**Crítérios para aceitabilidade dos resultados de controle** – regras, em geral de origem estatística, que podem ser usadas para dar suporte ao julgamento técnico dos resultados de controles em um determinado sistema analítico.

**Dados brutos** – conjunto de registros de dados e fatos que possibilitam a reconstituição de um laudo, das atividades e dos responsáveis pela sua geração.

**Efetividade** – capacidade de realizar uma ação capaz de modificar a realidade existente de forma a obter os resultados desejados ou planejados.

**Ensaio de proficiência** – é uma ferramenta eficaz para determinar o desempenho da fase analítica do laboratório. Também conhecido como controle externo, é uma sistemática

contínua e periódica, constituída por avaliações de resultados obtidos pelo laboratório na análise de materiais desconhecidos que simulam pacientes. Tais avaliações resultam de estudos estatísticos, que apoiam a identificação de erros e possíveis causas, acertos e considerações sobre o desempenho global dos participantes. Relatórios são disponibilizados para o laboratório verificar seu desempenho e identificar melhorias relacionadas com a sistemática de ensaio, os equipamentos e o corpo técnico. Vide Avaliação externa da qualidade.

**Documento** – informação e seu meio de suporte.

**Garantia da qualidade** – conjunto de atividades planejadas, sistematizadas e implementadas com o objetivo de cumprir os requisitos da qualidade especificados.

**Indicadores da qualidade** – medições realizadas para avaliar se o desempenho de um processo atende aos objetivos estabelecidos ou às expectativas do cliente.

**Laboratório de apoio** – laboratório clínico que realiza exames em amostras enviadas por outros laboratórios clínicos, mediante contrato. Não há relação de dependência entre as partes, podendo o laboratório cliente enviar amostras para diferentes laboratórios de apoio devidamente qualificados e contratados.

**Limites para aceitabilidade dos resultados de controle** – intervalo de valores (com limites inferior e superior) que delimita a faixa dos resultados esperados de materiais de controle a serem obtidos em um determinado sistema analítico.

**Melhoria contínua** – parte da gestão da qualidade focada no melhoramento contínuo dos processos, por meio da redução de custos, da melhoria do desempenho e da satisfação dos clientes.

**Método** – regras e procedimentos utilizados para se executar um teste diagnóstico.

**Métodos próprios (*in house*)** – reagentes ou sistemas analíticos produzidos e validados pelo próprio laboratório clínico, exclusivamente para uso próprio, em pesquisa ou apoio diagnóstico.

**Metodologia** – estado da arte em que o teste diagnóstico se baseia.

**Procedimento** – modo de fazer (algo); técnica, processo, método. Todo procedimento deve estar documentado, ou seja, contemplar um documento escrito – por exemplo, procedimento operacional padrão (POP).

**Rastreabilidade** – capacidade de recuperação do histórico, da aplicação ou da localização daquilo que está sendo considerado, por meio de identificações registradas.

**Reagentes/insumos para métodos próprios (*in house*)** – componentes, materiais e reagentes para uso em método próprio. Podem ser comercializados como insumos para fabricação de produtos ou rotulados como Research Use Only (RUO), Analytic Specific Reagent (ASR) ou Investigational Use Only (IUO). Produtos que não possuem uma aplicação diagnóstica específica não são passíveis de cadastro ou registro junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), sendo a responsabilidade pela sua utilização atribuída exclusivamente ao laboratório clínico, respeitando a regulamentação sanitária vigente.

**Registro** – documento que apresenta resultados obtidos ou fornece evidências das atividades desempenhadas. Registro crítico é aquele que representa o registro de fatos e dados necessários para a reconstituição de uma ação, um processo ou um resultado de impacto na qualidade dos laudos emitidos ou necessários para a investigação da conformidade dos processos analíticos. Em geral, exigidos na norma.

**Requisitos da qualidade (especificações dos requisitos da qualidade analítica)** – critérios documentados definidos pelo laboratório, de preferência

antecipadamente e de acordo com o estado da arte, para a avaliação do desempenho dos sistemas analíticos.

**Replicatas biológicas** – no contexto deste documento, processamento em paralelo de amostras distintas.

**Replicatas técnicas** – no contexto deste documento, processamento em paralelo de alíquotas da mesma amostra.

**Sistema analítico** – conjunto de elementos necessários para a determinação de um analito, o qual pode incluir reagentes, calibradores, equipamentos e operador, entre outros componentes.

**Sistema de informação laboratorial (SIL)** – conjunto de dados, eletrônicos ou não, que permite o rastreamento de toda e qualquer informação definida como registro da qualidade, adequadamente ordenado e protegido contra perdas pelo tempo, conforme estabelecido pela RDC 302 da Anvisa, ou suas atualizações.

**Tempo de atendimento total (TAT)** – tempo decorrido para que se libere o laudo de um exame laboratorial. Devido à possibilidade de variação entre o ponto considerado zero (início do processo) e o ponto considerado terminal (final do processo), recomenda-se que, ao se falar em TAT, os pontos iniciais e finais da medição de tempo sejam claramente estabelecidos.

**Utilidade clínica** – refere-se aos riscos e aos benefícios resultantes do uso de um teste diagnóstico, com relação a intervenções subsequentes que visam melhorar sua condição de saúde, mas que podem também apresentar riscos.

**Validade clínica** – acurácia do teste diagnóstico para identificar uma condição clínica particular. É descrita em termos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo.

**Validação** – estabelece, por meio de evidências objetivas, as características de desempenho de um sistema analítico. O laboratório deve assegurar que requisitos específicos para um determinado uso pretendido sejam atendidos de forma consistente.

**Validação com base no método** – modalidade de validação na qual as características de desempenho do sistema têm como base o método e não o analito. Além da biologia molecular, também se aplica à citogenética, à citometria de fluxo e à imuno-histoquímica.

**Variante genética** – presença de um alelo particular, que não é o alelo mais comum encontrado na população em geral. Pode se referir a nucleotídeo, gene ou locus.

**Verificação** – confirmação, por meio de evidências objetivas, das características de desempenho de um sistema analítico. O laboratório deve assegurar que o sistema analítico, cuja características de desempenho são conhecidas, funcione como esperado.

## 21. Referências

1. Agência Nacional de vigilância Sanitária (Anvisa). RDC no. 50, de 21 de fevereiro de 2002. Regulamento técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Establishing molecular testing in clinical laboratory environments. CLSI Document MM19-A; 2011.
3. DNA advisory board. Quality assurance standards for DNA testing laboratories. Forensic Sci Commun. 2000; 2:2.

4. Standards for parentage testing laboratories. Bethesda, MD: AABB; 2003: 5.4.2.1-2.
5. 14971:2007(E) I. Medical devices – application of risk management to medical devices. 2 edition ed; 2007-03-01.
6. Food and Drug Administration. Informed consent for *in vitro* diagnostic device studies using leftover human specimens that are not individually identifiable; 2006.
7. College of American Pathologists. Advanced notice of proposed rulemaking (ANPRM) entitled — human subjects research protections; 2011.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Quality management system: qualifying, selecting and evaluating a referral laboratory. CLSI document GP09-A2; 2012.
9. Agência Nacional de vigilância Sanitária (Anvisa). RDC no. 302, de 13 de outubro de 2005. Regulamento técnico para funcionamento de laboratórios clínicos.
10. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Nota técnica conjunta 001/2016. Aplicação de produtos rotulados como RUO em metodologias *in house* por laboratórios clínicos.
11. Integrated DNA technologies. Oligonucleotide stability study [citado em: 13 jun 2016]; Disponível em: [http://www.idtdna.com/pages/docs/default-source/technical-reports/stability-guidance-external\\_final.pdf?sfvrsn=2](http://www.idtdna.com/pages/docs/default-source/technical-reports/stability-guidance-external_final.pdf?sfvrsn=2).
12. Kroll MH, Emancipator K. A theoretical evaluation of linearity. Clin Chem. 1993; 39: 405-13.
13. Kroll MH, Praestgaard J, Michaliszyn E, Styer PE. Evaluation of the extent of nonlinearity in reportable range studies. Arch Pathol Lab Med. 2000; 124: 1331-8.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of matrix effects; approved guideline. CLSI Document EP14-A3. Wayne, PA; 2014.
15. Miller WG. Quality control. Professional practice in clinical chemistry: a companion text. Dufour DR, editor. Washington, DC: AACC Press; 1999.
16. Saunders GC, Dukes J, Parkes HC, Cornett JH. Interlaboratory study on thermal cycler performance in controlled PCR and random amplified polymorphic DNA analyses. Clin Chem. 2001; 47: 47-55.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Laboratory instrument implementation, verification, and maintenance. CLSI Document GP31-A. Wayne, PA; 2009.
18. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. Genet Med. 2011; 13: 913-20.
19. Savva GM, Walker K, Morris JK. The maternal age-specific live birth prevalence of trisomies 13 and 18 compared to trisomy 21 (Down syndrome). Prenat Diagn. 2010; 30: 57-64.
20. Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, et al. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. Obstet Gynecol. 2012; 119: 890-901.
21. Canick JA, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, et al. DNA sequencing of maternal plasma to identify Down syndrome and other trisomies in multiple gestations. Prenat Diagn. 2012; 32: 730-4.
22. Farkas DH, Drevon AM, Kiechle FL, DiCarlo RG, Heath EM, Crisan D. Specimen stability for DNA-based diagnostic testing. Diagn Mol Pathol. 1996; 5: 227-35.
23. Farkas DH, Kaul KL, Wiedbrauk DL, Kiechle FL. Specimen collection and storage for diagnostic molecular pathology investigation. Arch Pathol Lab Med. 1996; 120: 591-6.
24. Pahl A, Brune K. Stabilization of gene expression profiles in blood after phlebotomy. Clin Chem. 2002; 48: 2251-3.

25. Pont-Kingdon G, Gedge F, Wooderchak-Donahue W, et al. Design and analytical validation of clinical DNA sequencing assays. *Arch Pathol Lab Med*. 2012; 136: 41-6.
26. Rainen L, Oelmueller U, Jurgensen S, et al. Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. *Clin Chem*. 2002; 48: 1883-90.
27. Schultz CL, Akker Y, Du J, Ratech H. A lysis, storage, and transportation buffer for long-term, room-temperature preservation of human clinical lymphoid tissue samples yielding high molecular weight genomic DNA suitable for molecular diagnosis. *Am J Clin Pathol*. 1999; 111: 748-52.
28. Tsui NB, Ng EK, Lo YM. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem*. 2002; 48: 1647-53.
29. Farrel R. Gel electrophoresis based assessment of cellular RNA quality may also be used (RNA isolation strategies). *RNA methodologies: a laboratory guide for isolation and characterization*: Academic Press; 1998.
30. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009; 55: 611-22.
31. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, John R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol*. 2012; 113: 1014-26.
32. Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2010; 23: 550-76.
33. Jennings L, Van Deerlin VM, Gulley ML; College of American Pathologists Molecular Pathology Resource C. Recommended principles and practices for validating clinical molecular pathology tests. *Arch Pathol Lab Med*. 2009; 133: 743-55.
34. Halling KC, Schrijver I, Persons DL. Test verification and validation for molecular diagnostic assays. *Arch Pathol Lab Med*. 2012; 136: 11-3.
35. Aziz N, Zhao Q, Bry L, et al. College of American Pathologists' laboratory standards for next-generation sequencing clinical tests. *Arch Pathol Lab Med*. 2015; 139: 481-93.
36. Gargis AS, Kalman L, Berry MW, et al. Assuring the quality of next-generation sequencing in clinical laboratory practice. *Nat Biotechnol*. 2012; 30: 1033-6.
37. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med*. 2013; 15: 733-47.
38. Richards CS, Palomaki GE, Lacbawan FL, et al. Three-year experience of a CAP/ACMG methods-based external proficiency testing program for laboratories offering DNA sequencing for rare inherited disorders. *Genet Med*. 2014; 16: 25-32.
39. Schrijver I, Aziz N, Farkas DH, et al. Opportunities and challenges associated with clinical diagnostic genome sequencing: a report of the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn*. 2012; 14: 525-40.
40. Schrijver I, Aziz N, Jennings LJ, Richards CS, Voelkerding KV, Weck KE. Methods-based proficiency testing in molecular genetic pathology. *J Mol Diagn*. 2014; 16: 283-7.
41. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature*. 1989; 339: 237-8.
42. Huggett JF, Foy CA, Benes V, et al. The digital MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments. *Clin Chem*. 2013; 59: 892-902.
43. Huggett JF, Cowen S, Foy CA. Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clin Chem*. 2015; 61: 79-88.

44. Cossman J, Zehnbaueer B, Garrett CT, et al. Gene rearrangements in the diagnosis of lymphoma/leukemia. Guidelines for use based on a multiinstitutional study. *Am J Clin Pathol*. 1991; 95: 347-54.
45. American Association of Blood Banks. Guidance for standards for parentage testing laboratories; 2004.
46. ACMG Standards and Guidelines for Clinical Laboratories. Disponível em: <http://www.acmg.net>.
47. Clinical and Laboratory Standards Institute. Nucleic acid sequencing methods in diagnostic laboratory medicine. CLSI Document MM09-A2; 2014.
48. Forbes SA, Tang G, Bindal N, et al. COSMIC (the catalogue of somatic mutations in cancer): a resource to investigate acquired mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res*. 2010; 38: D652-7.
49. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, et al. Standards and guidelines for the interpretation and reporting of sequence variants in cancer: a joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn*. 2017; 19: 4-23.
50. Clinical and Laboratory Standards Institute. User evaluation of between reagent lot variation. CLSI Document EP26-A; 2013.
51. Mattocks CJ, Morris MA, Matthijs G, et al. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. *Eur J Hum Genet*. 2010; 18: 1276-88.
52. Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med*. 2016; 18: 1056-65.
53. Zimmermann B, Hill M, Gemelos G, et al. Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenat Diagn*. 2012; 32: 1233-41.
54. Benn P, Cuckle H, Pergament E. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol*. 2012; 119: 1270; author reply-1.
55. Palomaki GE, Knight GJ, McCarthy J, Haddow JE, Eckfeldt JH. Maternal serum screening for fetal Down syndrome in the United States: a 1992 survey. *Am J Obstet Gynecol*. 1993; 169: 1558-62.
56. Stokowski R, Wang E, White K, et al. Clinical performance of non-invasive prenatal testing (NIPT) using targeted cell-free DNA analysis in maternal plasma with microarrays or next generation sequencing (NGS) is consistent across multiple controlled clinical studies. *Prenat Diagn*. 2015; 35: 1243-6.
57. Clinical and Laboratory Standards Institute. Statistical quality control for quantitative measurement procedures: principles and definitions CLSI document C24-A3; 2006.
58. Ross JW, Lawson NS. Analytic goals, concentration relationships, and the state of the art for clinical laboratory precision. *Arch Pathol Lab Med*. 1995; 119: 495-513.
59. Ye JJ, Ingels SC, Parvin CA. Performance evaluation and planning for patient-based quality control procedures. *Am J Clin Pathol*. 2000; 113: 240-8.
60. Bermudez de Leon M, Penuelas-Urquides K, Aguado-Barrera ME, et al. *In vitro* transcribed RNA molecules for the diagnosis of pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus by real-time RT-PCR. *J Virol Methods*. 2013; 193: 487-91.

61. Gulley ML, Brazier RM, Halling KC, et al. Clinical laboratory reports in molecular pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2007; 131: 852-63.
62. Wain HM, Bruford EA, Lovering RC, Lush MJ, Wright MW, Povey S. Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics*. 2002; 79: 464-70.
63. den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mut*. 2000; 15: 7-12.
64. HGVS. Nomenclature for the description of sequence variants. Disponível em: <http://www.hgvs.org/mutnomen>.
65. May T. On the justifiability of ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *J Law Med Ethics*. 2015; 43: 134-42.
66. Evans BJ. Minimizing liability risks under the ACMG recommendations for reporting incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med*. 2013; 15: 915-20.
67. Green RC, Berg JS, Grody WW, et al. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med*. 2013; 15: 565-74.
68. Allyse M, Michie M. Not-so-incidental findings: the ACMG recommendations on the reporting of incidental findings in clinical whole genome and whole exome sequencing. *Trends Biotechnol*. 2013; 31: 439-41.
69. Clinical and Laboratory Standards Institute. Clinical laboratory safety. CLSI Document GP14-A3. Wayne, PA; 2012.
70. Integrated DNA Technologies. Oligonucleotide stability study. 2014. Disponível em: <http://goo.gl/9gcCRF>.
71. Clinical and Laboratory Standards Institute. Preparation and testing of reagent water in the clinical laboratory. CLSI Document C03-A4-AMD; 2006.
72. National Institutes of Health (NIH). Laboratory water – its importance and application; 2013 [citado em: 12 jun 2015]. Disponível em: [http://orf.od.nih.gov/PoliciesAndGuidelines/Documents/DTR White Papers/Laboratory Water-Its Importance and Application-March-2013\\_508.pdf](http://orf.od.nih.gov/PoliciesAndGuidelines/Documents/DTR%20White%20Papers/Laboratory%20Water-Its%20Importance%20and%20Application-March-2013_508.pdf).
73. Long J, Mabic S. The impact of water quality on IVD testing. *In vitro Diagn Technol*. 2009; 29-35.
74. Mabic S, Kano I. Impact of purified water quality on molecular biology experiments. *Clin Chem Lab Med*. 2003; 41: 486-91.
75. Stewart BM. The production of high-purity water in the clinical laboratory. *Lab Med*. 2000; 31: 7.
76. Barra GB, Santa Rita TH, Vasques JA, Chianca CF, Nery LF, Costa SS. EDTA-mediated inhibition of DNases protects circulating cell-free DNA from ex vivo degradation in blood samples. *Clin Biochem*. 2015; 48(15): 976-81.

