

GUIA DE BOAS PRÁTICAS LABORATORIAIS EM CITOGENÉTICA E GENÉTICA MOLECULAR HUMANA

COMITÊ DE NORMATIZAÇÃO E RECOMENDAÇÕES PARA PROCEDIMENTOS UTILIZADOS EM LABORATÓRIOS QUE PRESTAM SERVIÇOS NA ÁREA DE GENÉTICA HUMANA – SOCIEDADE BRASILEIRA DE GENÉTICA

Cleide Largman Borovik
Eloiza Helena Tajara
José Cláudio Rocha
Leila Montenegro Silveira Farah
Nadyr Fernandes Naccache
Regina Célia Mingroni Netto
Raquel Joffe

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Nas últimas duas décadas, a área de Genética, em especial de Genética Humana, cresceu muito no Brasil e tem atraído um grande número de profissionais. A Citogenética Humana foi uma de suas primeiras sub-áreas a serem implantadas no país, inicialmente em laboratórios de pesquisa e, mais recentemente, também em laboratórios de análises clínicas. Atualmente, suas aplicações incluem a caracterização de polimorfismos nas populações e a pesquisa da ação de agentes mutagênicos ou carcinogênicos em ensaios *in vitro*, além da análise de cariótipo em muitas doenças. Suas técnicas compreendem importantes ferramentas de diagnóstico pré e pós-natal de anomalias congênitas e de diagnóstico e monitoramento de terapia em casos de neoplasias, principalmente hematológicas.

Nos últimos anos, cresceu também o interesse em dados moleculares de doenças genéticas por parte de médicos e profissionais da saúde, acompanhando o progresso da Biologia Molecular. Os testes moleculares que se baseiam na análise dos ácidos nucleicos são sem dúvida métodos fundamentais no diagnóstico das doenças humanas que resultam de lesões do DNA. Esses testes podem ser realizados com amostras oriundas dos mais diversos tipos de tecidos, incluindo aquelas obtidas por amniocentese, biópsia de vilosidade coriônica e outras. A inovação tecnológica oferecida pela reação em cadeia da polimerase (PCR) possibilitou também que quantidades mínimas dessas amostras pudessem ser analisadas.

O alcance e a precisão dos diagnósticos genéticos trazem responsabilidades clínicas, éticas e legais sem precedentes. Indivíduos identificados como portadores de mutações podem se tornar ansiosos, depressivos e sentirem-se socialmente estigmatizados. Diagnósticos pré-sintomáticos de doenças de manifestação tardia podem ser emocionalmente devastadores. Do mesmo modo que o erro técnico, a compreensão incorreta do significado de um exame é igualmente prejudicial. Assim, todos nós devemos ter consciência de nossa responsabilidade e de que erros laboratoriais podem causar danos irreparáveis na vida de um paciente.

.A meta dos laboratórios que prestam serviços nessa área deve ser o desenvolvimento de uma política de qualidade que faça com que o número de erros

tenda a zero e que os laudos emitidos sejam compreensíveis pelos profissionais que atuam junto ao paciente. É dentro deste espírito que apresentamos nossa proposta de um guia de boas práticas laboratoriais em Citogenética e Genética Molecular Humana, com o objetivo de ampliar o diálogo entre os profissionais e, dentro do possível, maximizar o grau de confiabilidade dos resultados emitidos pelos diversos laboratórios. Os aspectos discutidos neste guia são mais voltados a laboratórios que realizam exames relacionados a doenças genéticas humanas e foram divididos em duas partes: a primeira refere-se a exames citogenéticos e a segunda a análises moleculares. Cada parte é subdividida em 12 tópicos, para facilitar a consulta e a compreensão.

TÓPICOS

- 1. Espaço físico e equipamentos**
- 2. Recursos humanos**
- 3. Segurança de laboratório**
- 4. Recepção e a identificação de amostras**
- 5. Rejeição de amostras**
- 6. Critérios de armazenamento/arquivamento de amostras**
- 7. Documentação de procedimentos**
- 8. Registro de exames**
- 9. Validação de testes**
- 10. Confecção de laudos**
- 11. Nomenclatura para descrição de resultados**
- 12. Confidencialidade de resultados**

PARTE I

GUIA DE BOAS PRÁTICAS LABORATORIAIS EM CITOGENÉTICA HUMANA

1. Espaço físico e equipamentos

Os laboratórios de Citogenética Humana devem ter espaços seguros e apropriados para:

- manipulação de amostras
- manipulação de substâncias tóxicas
- correto funcionamento dos equipamentos
- estocagem de reagentes
- estocagem de amostras e laudos
- setores administrativos

- 1.1. Os espaços destinados a laboratórios devem ter tamanhos apropriados que contribuam para a qualidade do trabalho e para a segurança dos funcionários.
- 1.2. Se for realizado atendimento a pacientes, deve ser disponibilizado um espaço adequado para essa atividade. Espaços adicionais separados do ambiente laboratorial devem ser reservados para administração e para outros serviços relacionados.
- 1.3. Os espaços devem ser organizados de maneira que todas as amostras e culturas de células sejam feitas sob condições estéreis e protegidas do operador. Recomenda-se o uso de fluxo laminar para manipulação de amostras.
- 1.4. Os equipamentos e instrumentos devem ter uma rotina de limpeza, manutenção e calibragem. Os manuais de operação devem estar disponíveis na bancada, ao lado do equipamento. Equipamentos, reagentes e amostras temperatura-dependentes devem ser controlados adequadamente. As estufas devem ser equipadas com alarmes que indiquem desvios de temperatura e condições de CO₂.
- 1.5. Os microscópios devem ter resolução para uma análise citogenética adequada.
- 1.6. As datas de manutenção da câmara de fluxo laminar e troca de filtro devem ser rigorosamente registradas e seguidas. O tempo de uso das lâmpadas de UV também deve ser registrado, já que possuem vida útil limitada.
- 1.7. Recomenda-se que culturas de células para exames citogenéticos sejam mantidas em estufa e ambiente separados de outras amostras (como, por exemplo, vírus e bactérias) para minimizar riscos de contaminação.
- 1.8. As culturas celulares devem ser preferencialmente feitas em duplicata e incubadas em duas estufas diferentes, com circuitos e fornecimento de gás independentes e com lâmpadas de emergência. Se isto não for possível, um protocolo deve ser estabelecido com os requerimentos necessários para garantir o sucesso das culturas.
- 1.9. Uma área especial, protegida da luz, deve ser reservada para os procedimentos de citogenética molecular (FISH, CGH etc). Laboratórios que produzem suas próprias sondas devem seguir normas de laboratórios de Biologia Molecular relativas à prevenção de contaminação por DNA. Equipamentos específicos para esses procedimentos devem ser incluídos, tais como micro-centrífuga, microscópio de fluorescência com filtros apropriados e

câmera ou analisador de imagens. O uso de formamida requer a instalação de capela.

2. Recursos humanos

O Laboratório deve ter pessoal devidamente habilitado e treinado com conhecimento técnico e experiência para as funções designadas. É recomendado que o responsável técnico possua Título de Especialista em Citogenética Humana.

3. Segurança de laboratório

- 3.1. Os procedimentos desenvolvidos no laboratório devem ser executados por profissionais adequadamente treinados. O treinamento deve ser realizado antes do início de suas atividades, incluindo normas de segurança nos casos de acidentes ou contaminação de pessoal. O responsável pelo laboratório deve assegurar que existam disponíveis e acessíveis manuais com recomendações gerais e específicas sobre segurança e que eles sejam consultados com frequência e seguidos rotineiramente.
- 3.2. Os procedimentos executados em laboratório devem ser realizados por profissionais paramentados adequadamente para cada situação (por exemplo, usando aventais e luvas descartáveis).
- 3.3. Vários compostos químicos utilizados em laboratórios de Citogenética são tóxicos, cáusticos ou potencialmente cancerígenos. É recomendado que o laboratório disponha de manuais específicos de segurança que contenham instruções sobre manuseio, estocagem e descarte desses produtos.
- 3.4. Recomenda-se a utilização de (a) capelas de exaustão para manipulação de substâncias voláteis e tóxicas que apresentem risco se inaladas ou em contato com a pele e mucosas; (b) capelas de fluxo laminar destinadas à manipulação de meios de cultura e de material biológico, para evitar contaminação tanto do operador quanto da amostra.
- 3.5. Materiais biológicos, reagentes e organismos geneticamente modificados requerem cuidados no manuseio e no descarte. A vigilância sanitária e a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CNTBio) recomendam procedimentos específicos para cada caso.
- 3.6. É desejável que cada laboratório mantenha uma relação de documentos e normas externos relativos a todas as questões de segurança.

4. Recepção e identificação de amostras

- 4.1. Todas as amostras encaminhadas ao laboratório devem ser imediatamente registradas e receber um código de identificação único que as acompanhará em todas as fases da análise. Normalmente, nomes não são suficientes para prevenir confusões e erros de identificação. O sistema de identificação de amostras deve ser capaz de distinguir indivíduos da mesma família ou diferentes amostras colhidas de um mesmo indivíduo.
- 4.2. Todas as amostras devem ser acompanhadas de um formulário de requisição de exames, que deve conter o máximo de informações possíveis, dentre as listadas abaixo:
 - a) Nome do paciente.
 - b) Código de registro do laboratório.

- c) Data de nascimento / idade.
- d) Sexo do paciente.
- e) Data e hora da colheita.
- f) Tipo de amostra (sangue periférico, líquido amniótico, medula óssea etc).
- g) Profissional que solicitou a realização do exame.
- h) Indicação para realização do exame.
- i) Informações clínicas pertinentes à realização do exame.
- j) História familiar, se necessário.
- k) Profissional que procedeu à colheita do material, quando pertinente.

5. Rejeição de amostras

Todo laboratório deve ter critérios bem estabelecidos para aceitação/rejeição de amostras e manter um registro escrito desses critérios. As amostras deverão ser rejeitadas quando não estiverem de acordo com esses critérios, incluindo aqueles relacionados com as condições ideais para colheita, acondicionamento, transporte e armazenamento. Exemplos de critérios de rejeição são apresentação da amostra com dados de identificação do paciente e informações clínicas incompletos, volume insuficiente de amostra etc. Naqueles casos em que uma nova colheita é impossível (restos ovulares), implica em risco (vilosidades coriônicas) ou grande desconforto para o paciente (biópsia de pele ou punção esternal), o laboratório deverá entrar imediatamente em contato com o serviço ou médico responsável e comunicar a inadequação da amostra enviada, discutindo a conveniência da realização do exame e informando as chances de sucesso envolvidas. A critério do responsável, o profissional solicitante pode ser informado quando a realização do exame não é indicada em função da suspeita clínica.

6. Critérios de armazenamento/arquivamento de amostras

Em virtude da ausência de legislação específica no país sobre armazenamento/arquivamento de amostras biológicas ou de produtos resultantes de seu manuseio por metodologias utilizadas em citogenética clínica e/ou em pesquisa, cabe ao laboratório definir quais são os períodos mais adequados de armazenamento e retenção desses materiais. Estas definições devem levar em consideração as normas gerais da legislação brasileira para laboratórios e têm o objetivo de melhor atender às necessidades dos pacientes bem como à segurança e à conveniência dos profissionais envolvidos.

- 6.1. Lâminas usadas para testes diagnósticos em citogenética têm uma vida útil limitada. Se coradas por técnicas de bandamento que não utilizem fluorocromos, devem ser guardadas por um período de um ano. Lâminas usadas na análise de bandas obtidas após marcação por agentes fluorescentes e em estudos de FISH devem ser guardadas até o momento da emissão final do resultado e um registro permanente (fotografia ou imagem digitalizada) deve ser mantido.
- 6.2. Cada laboratório deve estabelecer uma rotina relativa à retenção de amostras excedentes, como culturas ou pacotes celulares (*pellets*) derivados da amostra original. Recomenda-se que sejam mantidos, no mínimo, até o momento da

emissão do resultado final. O tempo de retenção das amostras nos casos com resultado anormal fica a critério do responsável pelo laboratório.

7. Documentação de procedimentos

É imprescindível que cada laboratório possua um registro próprio documentando todos os procedimentos utilizados em sua rotina (Ex.: Procedimentos Operacionais Padrão/POPs), de forma que qualquer profissional recém-admitido e em fase de treinamento tenha condições de executar os procedimentos exatamente da mesma maneira que seus colegas mais experientes. Esse registro deve ser datado, revisado e atualizado periodicamente e deve conter:

- 7.1. Descrição detalhada de cada um dos procedimentos utilizados no laboratório.
- 7.2. Descrição detalhada dos procedimentos de preparo de cada um dos reagentes ou soluções utilizados em cada etapa do processo.
- 7.3. Indicações sobre marca, fabricante, número de catálogo e validade dos produtos utilizados no preparo de cada reagente ou solução.
- 7.4. Instruções especiais de segurança a serem seguidas durante a execução de cada procedimento (por exemplo, a utilização de luvas) e em caso de contaminação e/ou dano ao meio ambiente e/ou ao profissional.
- 7.5. Descrição detalhada dos procedimentos para utilização de cada um dos aparelhos ou instrumentos do laboratório.
- 7.6. Documentação sobre manutenção de equipamentos e sobre controles de qualidade. Essa documentação deve incluir: qualidade das preparações citológicas, índice de falhas de cultura e de coloração, frequência de resultados alterados e de erros de resultados.

8. Registro de exames

- 8.1. Deve ser estabelecido e mantido o registro de todos os exames realizados no laboratório e dos resultados obtidos. Todos os registros devem utilizar o código de identificação da amostra e incluir informações como:
 - a) Quantidade e qualidade da amostra recebida e utilizada.
 - b) Procedimentos aos quais a amostra foi submetida.
 - c) Descrição dos resultados observados.
 - d) Documentação dos resultados.
- 8.2. Os resultados devem estar sob a forma de fotos, microfilmagem, imagens digitalizadas e/ou em disquetes e serem de fácil acesso.
- 8.3. O tempo adequado de retenção e disposição dos registros deve ser definido pelo laboratório, considerando as leis vigentes.

9. Validação dos testes

9.1 Validação analítica

- a) Citogenética clássica. O laboratório deve estabelecer um número de células padrão que devem ser analisadas e um nível adequado de resolução de bandas, dependendo do tipo de amostra e da indicação clínica do exame. De forma geral, é recomendada a análise de 20 células em metáfases com 400 bandas. Recomendações para exames específicos serão detalhadas em documentos posteriores.

- b) FISH. Sempre que for utilizada uma sonda nova, é necessária a realização de testes em amostras controles para avaliação de sua especificidade e sensibilidade.

9.2 Validação clínica

- a) Na análise por FISH, é importante que sejam sempre estabelecidos protocolos de validação clínica de sondas novas.

10. Confeção dos laudos

Recomenda-se que, na confeção do laudo, sejam contempladas as seguintes partes:

- a) Nome do indivíduo.
- b) Data do nascimento.
- c) Data da colheita da amostra.
- d) Tipo de amostra.
- e) Código de identificação do caso no laboratório.
- f) Nome do profissional ou do laboratório que solicitou o exame.
- g) Resumo da indicação do exame, quando possível.
- h) Nome do exame realizado.
- i) Descrição resumida da metodologia (tipo de cultura, número de células analisadas, técnica de banda e nível de resolução).
- j) Nos casos de análise por FISH, deve ser referida a sonda utilizada.
- k) Descrição dos dados obtidos, além do cariótipo.
- l) Interpretação do resultado do exame e, quando pertinente, indicações sobre aconselhamento genético ou exames complementares. A interpretação deve ser compreensível a um profissional não geneticista.
- m) Data do laudo.
- n) Assinatura, nome e registro no respectivo conselho profissional do responsável técnico pelo exame (ou laboratório).
- o) Nome, endereço e telefone do laboratório.
- p) Nome do laboratório de apoio, nos casos pertinentes.

De maneira geral, os laudos não devem fazer menção a aberrações cromossômicas não clonais. Da mesma maneira, na descrição de resultados de exames pré-natais, os mosaicismos não devem ser mencionados se a linhagem anormal for resultante de mecanismos que ocorreram *in vitro*.

Variantes cromossômicas normais (como tamanho de heterocromatina e satélite ou intensidade de fluorescência), exceto aquelas envolvendo quebra e reunião de cromossomos, não necessitam ser incluídas na descrição dos resultados. Se forem mencionadas, o seu significado deve estar claramente descrito nos comentários dos laudos.

Sempre que possível as imagens de cariótipos devem ser anexadas ao laudo.

11 - Nomenclatura para descrição de resultados

11.1 A nomenclatura recomendada para a apresentação dos resultados está descrita no **ISCN**. *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (1995). Mitelmam F.(ed): S. Karger, Basel, 1995. Esse sistema de nomenclatura foi desenvolvido a partir de discussões realizadas em várias conferências internacionais e incorpora todas as recomendações de ISCN anteriores. Ele deve

sempre ser utilizado com o intuito de fornecer interpretações universais do resultado citogenético.

11.2 Os resultados obtidos por técnicas de citogenética molecular devem seguir também as normas do ISCN, 1995.

12. Confidencialidade de resultados

12.1 Tendo em vista a possibilidade de discriminação individual que os resultados de exames genéticos podem acarretar, os laboratórios devem implantar procedimentos seguros sobre o armazenamento físico ou eletrônico de resultados, que impeçam seu acesso a pessoas não autorizadas. A confidencialidade desses dados é de suma importância e todos os membros do laboratório com acesso às informações confidenciais dos pacientes devem obedecer a normas de sigilo e discricção.

12.2 Os resultados devem ser entregues ao paciente, ao médico solicitante ou ao aconselhador genético.

12.3 Critérios rígidos devem ser estabelecidos quando o resultado for transmitido por telefone. Esse tipo de comunicação é aceitável quando for reconhecida a necessidade de comunicação imediata com o paciente ou com o médico responsável. O mesmo se aplica aos resultados emitidos por FAX.

12.4 Na transferência eletrônica de dados, deve-se assegurar que o sistema oferece garantia de privacidade e integridade dos resultados. É recomendado que, no título da mensagem, haja menção ao caráter confidencial da mesma e que o nome do paciente seja substituído pelo seu registro.

PARTE II

GUIA DE BOAS PRÁTICAS LABORATORIAIS EM GENÉTICA MOLECULAR HUMANA

1. Espaço físico e equipamentos

Grande parte dos exames realizados em laboratórios de Genética Molecular Humana utiliza a reação em cadeia da polimerase (PCR) como ferramenta básica. É conhecido que a PCR, dependendo das condições técnicas e laboratoriais, está sujeita a interferências graves se houver contaminação da amostra a ser amplificada por outras moléculas de DNA ou RNA. As moléculas de DNA previamente amplificadas em outras reações (amplicons) são as que representam as maiores ameaças de contaminação. Detalhes da organização do espaço físico dos laboratórios podem minimizar esse risco de contaminação. Essa organização deve também prever espaços seguros e apropriados para manipulação de amostras e de substâncias tóxicas, correto funcionamento dos equipamentos, estocagem de reagentes, estocagem de amostras e laudos e setores administrativos.

- 1.1. É recomendado que as reações pré-PCR sejam preparadas em capelas exclusivas para esse fim ou em salas isoladas daquelas onde são manuseadas amostras com DNA amplificado ou material clonado, como, por exemplo, locais onde são realizadas as eletroforeses (salas de pós-PCR). Os ambientes para preparação de pré-PCR devem conter lâmpada de luz ultravioleta, que deve ser ligada cerca de 15 minutos antes e depois do preparo de cada bateria de reações pré-PCR.
- 1.2. A localização das máquinas de PCR (termocicladores) é optativa: podem ficar em recintos de pré-PCR bem como de pós-PCR. Caso fiquem em recinto de pré-PCR, os tubos contendo amostras amplificadas nunca devem ser abertos nesse compartimento, mas somente em salas de manuseio de amostras pós-PCR.
- 1.3. O armazenamento de frascos contendo DNA amplificado pela PCR ou DNA clonado deve ser feito em local distinto dos locais de armazenamento de reagentes utilizados na preparação de reações pré-PCR.
- 1.4. Os locais onde são realizadas as extrações de DNA devem ser preferencialmente isolados daqueles onde as amostras de DNA amplificado são manuseadas como, por exemplo, salas de eletroforese. O objetivo desta medida é evitar que amostras de DNA recém-extraídas sejam contaminadas por amplicons.
- 1.5. É também recomendado que equipamentos, vidrarias e reagentes (centrífugas, micropipetadores, soluções etc) utilizados nas etapas de pré-PCR sejam distintos daqueles utilizados nas etapas de pós-PCR.
- 1.6. Os espaços destinados a laboratórios devem ter um tamanho apropriado que contribua para a qualidade do trabalho e para a segurança dos funcionários.
- 1.7. Se for realizado atendimento a pacientes, deve ser destinado espaço adequado para essa atividade. Espaços adicionais separados do ambiente laboratorial devem ser reservados para administração e para outros serviços relacionados.
- 1.8. Os equipamentos e instrumentos devem ter uma rotina de limpeza, manutenção e calibragem. Os manuais de operação devem estar disponíveis

na bancada, ao lado do equipamento. Equipamentos, reagentes e amostras temperatura-dependentes devem ser controlados adequadamente.

2. Recursos humanos

O Laboratório deve ter pessoal devidamente habilitado e treinado com conhecimento técnico e experiência para as funções designadas. Recomenda-se que o responsável técnico possua Título de Especialista em Biologia Molecular Humana.

3. Segurança de laboratório

- 3.1. Os procedimentos desenvolvidos no laboratório devem ser executados por profissionais adequadamente treinados. O treinamento deve ser realizado antes do início de suas atividades e o responsável pelo laboratório deve assegurar que existam disponíveis e acessíveis manuais com recomendações gerais e específicas sobre segurança e que eles sejam consultados com frequência e seguidos rotineiramente.
- 3.2. Os procedimentos executados em laboratório devem ser realizados por profissionais paramentados adequadamente para cada situação (por exemplo, usando aventais e luvas descartáveis). Alguns procedimentos podem requerer equipamentos extras de segurança, como máscaras e óculos de proteção.
- 3.3. Vários compostos químicos utilizados em laboratórios de Biologia Molecular são tóxicos, cáusticos ou potencialmente cancerígenos. É recomendado que o laboratório disponha de manuais específicos de segurança que contenham instruções sobre manuseio, estocagem e descarte desses produtos. Acrilamida, fenol, clorofórmio e brometo de etídeo são compostos que merecem atenção especial nesse sentido.
- 3.4. Agentes físicos, como a luz ultra-violeta, a eletricidade e especialmente as radiações emitidas por radioisótopos, também merecem atenção especial no que diz respeito às instalações e às precauções no seu manuseio. A luz ultra-violeta utilizada na visualização de géis após coloração com brometo de etídeo exige proteção para os olhos e para a face, principalmente. Em relação aos radioisótopos, os profissionais que os manipulam devem realizar treinamento prévio e ter acesso a cursos especializados sobre segurança no seu manuseio, armazenamento e descarte, conforme preconizado pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN). Voltagens elevadas (1500 a 2500 V) são utilizadas muitas vezes para eletroforeses em géis de poliacrilamida. É recomendado que tais procedimentos não sejam conduzidos na ausência de pessoal do laboratório, pois significam risco aumentado de incêndio ou de dano a indivíduos não treinados (por exemplo, pessoal de limpeza).
- 3.5. Recomenda-se a utilização de capelas de exaustão para manipulação de substâncias voláteis e tóxicas que apresentem riscos se inaladas ou em contato com a pele e mucosas, como o fenol.
- 3.6. Materiais biológicos, reagentes e organismos geneticamente modificados requerem cuidados no manuseio, armazenagem e no descarte. A vigilância sanitária e a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CNTBio) recomendam procedimentos específicos para cada caso.
- 3.7. É desejável que cada laboratório mantenha uma relação de documentos e normas externos relativos a todas as questões de segurança.

4. Recepção e identificação de amostras

- 4.1. Todas as amostras encaminhadas ao laboratório devem ser imediatamente registradas e receber um código de identificação único que as acompanhará em todas as fases da análise. Normalmente, nomes não são suficientes para prevenir confusões e erros de identificação. O sistema de identificação de amostras deve ser capaz de distinguir indivíduos da mesma família ou diferentes amostras colhidas de um mesmo indivíduo.
- 4.2. Todas as amostras devem ser acompanhadas de um formulário de requisição de exames, que deve conter o máximo de informações possíveis, dentre as listadas abaixo:
- a) Nome do paciente
 - b) Código de registro do laboratório
 - c) Data de nascimento / idade
 - d) Sexo do paciente
 - e) Informações sobre etnia, se necessário
 - f) Data e hora da colheita
 - g) Tipo de amostra (sangue periférico, líquido amniótico, medula óssea, DNA extraído etc)
 - h) Profissional que solicitou a realização do exame
 - i) Indicação para realização do exame
 - j) Informações clínicas pertinentes à realização do exame
 - k) História familiar, se necessário
 - l) Profissional que procedeu à colheita do material, quando pertinente

5. Rejeição de amostras

Todo laboratório deve ter critérios bem estabelecidos para aceitação/rejeição de amostras e manter um registro escrito desses critérios. As amostras deverão ser rejeitadas quando não estiverem de acordo com esses critérios, incluindo aqueles relacionados com as condições ideais para colheita, acondicionamento, transporte e armazenamento. Exemplos de critérios de rejeição são apresentação da amostra com dados de identificação do paciente e informações clínicas incompletos, volume insuficiente de amostra, quantidade insuficiente de DNA, ausência de integridade dos ácidos nucléicos etc. Naqueles casos em que uma nova colheita não é possível ou a realização do exame solicitado não é adequada em função da suspeita clínica, o profissional solicitante deve ser informado.

6. Critérios de armazenamento/arquivamento de amostras

Em virtude da ausência de legislação específica no país sobre armazenamento/arquivamento de amostras biológicas ou de seus produtos, como ácidos nucléicos ou proteínas, cabe ao laboratório definir quais são os períodos mais adequados de armazenamento e retenção desses materiais. Estas definições devem levar em consideração as normas gerais da legislação brasileira para laboratórios e têm o objetivo de melhor atender às necessidades dos pacientes, bem como à segurança e à conveniência dos profissionais envolvidos.

7. Documentação de procedimentos

É imprescindível que cada laboratório possua um registro próprio documentando todos os procedimentos utilizados em sua rotina (Ex.: Procedimentos Operacionais Padrão/POPs), de forma que qualquer profissional recém-admitido e em fase de treinamento tenha condições de executar os procedimentos exatamente da mesma maneira que seus colegas mais experientes. Esse registro deve ser datado, revisado e atualizado periodicamente e deve conter:

- 7.1. Descrição detalhada de cada um dos protocolos utilizados no laboratório.
- 7.2. Descrição detalhada dos procedimentos de preparo de cada um dos reagentes ou soluções utilizados em cada etapa do procedimento.
- 7.3. Indicações sobre marca, fabricante, número de catálogo e validade dos produtos utilizados no preparo de cada reagente ou solução.
- 7.4. Instruções especiais de segurança a serem seguidas durante a execução de cada procedimento (por exemplo, a utilização de luvas, máscara e óculos) e em caso de contaminação e/ou dano ao meio ambiente e/ou ao profissional.
- 7.5. Descrição detalhada dos procedimentos para utilização de cada um dos aparelhos ou instrumentos do laboratório.
- 7.6. Documentação sobre manutenção de equipamentos e sobre controles de qualidade.

8. Registro de exames

- 8.1. Deve ser estabelecido e mantido o registro de todos os exames realizados no laboratório e dos resultados obtidos. Todos os registros devem utilizar o código de identificação da amostra e incluir informações como:
 - a) Quantidade e qualidade da amostra recebida e utilizada.
 - b) Procedimentos aos quais a amostra foi submetida.
 - c) Descrição dos resultados observados.
 - d) Documentação dos resultados.
- 8.2. Os resultados devem estar sob a forma de fotos, filmes de raio-X, imagens digitalizadas impressas e/ou em disquetes e serem de fácil acesso.
- 8.3. O tempo adequado de retenção e disposição dos registros deve ser definido pelo laboratório, considerando as leis vigentes.

9. Validação de testes

Todo teste novo deve ser VALIDADO antes de sua introdução na rotina do laboratório. São etapas deste processo de validação do teste.

- 9.1. Revisão da literatura pertinente sobre a aplicação do teste.
- 9.2. Estudos clínicos e analíticos com o objetivo de:
 - a) Caracterizar o loco e a mutação que serão testados.
 - b) Estabelecer os índices de desempenho do teste escolhido e sua capacidade de oferecer resultados consistentes e confiáveis. Para isto, deve ser consultada bibliografia especializada sobre cálculo dos parâmetros de SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE dos testes. Estes parâmetros devem ser definidos nos diferentes tipos de amostras que serão analisadas (sangue, líquido amniótico, vilosidade coriônica etc)

- c) Estabelecer a utilidade clínica do teste (contribuição significativa para o diagnóstico da doença ou para o estabelecimento do status genético do indivíduo).
- d) Definir as etapas dos procedimentos que são consideradas mais críticas e sujeitas a erro e definir estratégias para minimizar a possibilidade de erro e manter constante o desempenho do teste (por exemplo, introdução de indivíduos controles em cada bateria de exames, introdução de fragmentos controles de amplificação e digestão).
- e) Definir as limitações do teste.

Uma implicação imediata dos procedimentos de validação do teste é a necessidade de amostras com genótipos previamente determinados, capazes de verificar se o teste em questão detecta a mutação de interesse. Isto significa, na prática, a necessidade de intercâmbio de amostras entre diferentes laboratórios.

ESTA COMISSÃO ESTÁ BUSCANDO ESTRATÉGIAS QUE FACILITEM ESTE PROCEDIMENTO, EM MOLDES ESTRITAMENTE ÉTICOS E DE CONFIDENCIALIDADE.

10. Confeção de laudos

Acompanhando o avanço tecnológico da Genética no País, o vocabulário técnico referente ao assunto tornou-se igualmente sofisticado e muitas vezes inacessível ao profissional da área de saúde, não especialista no assunto. Por isso, recomenda-se que na confecção de um laudo sejam contempladas as seguintes partes:

- a) Nome do indivíduo.
- b) Data do nascimento.
- c) Data da colheita da amostra.
- d) Tipo de amostra.
- e) Código de identificação do caso no laboratório.
- f) Nome do profissional ou do laboratório que solicitou o exame.
- g) Resumo da indicação do exame, quando possível.
- h) Nome do exame realizado, incluindo mutações testadas.
- i) Descrição resumida da metodologia acompanhada, se possível, da referência bibliográfica correspondente.
- j) Descrição dos resultados.
- k) Interpretação do resultado do exame e, quando pertinente, indicações sobre aconselhamento genético ou exames complementares. Nos casos de teste de triagem, não diagnóstico, ou de teste preditivo, incluir uma avaliação quantitativa do valor preditivo do teste. A interpretação deve ser compreensível a um profissional não geneticista.
- l) Data do laudo.
- m) Assinatura, nome e registro no respectivo conselho profissional do responsável técnico pelo exame (ou laboratório).
- n) Nome, endereço e telefone do laboratório.
- o) Nome do laboratório de apoio, nos casos pertinentes.
- p) Genealogia do paciente, se pertinente.

11 - Nomenclatura para descrição de resultados

Não há ainda um padrão universal para a descrição de mutações. No entanto, já existem algumas sugestões na literatura especializada sobre o assunto e alguns grupos estão tentando desenvolver um conjunto de recomendações. Um trabalho importante contendo recomendações sobre a descrição de mutações é o de Antonarakis e col., *Human Mutation* 11: 1-3, 1998.

11.1. Seqüências de Referência: As descrições da posição das mutações no DNA e das alterações dos aminoácidos nas proteínas devem ser feitas com base em seqüências de referência já publicadas na literatura. O ideal é que exista apenas uma seqüência de referência para um determinado gene ou produto gênico. Essas seqüências são encontradas em alguns bancos de dados do *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Entre eles está o banco **LOCUSLINK:** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/>).

- a) Caso não exista nenhuma seqüência de referência para o produto gênico, ou seja, o polipeptídeo, as posições dos aminoácidos devem ser numeradas e o aminoácido correspondente ao códon de iniciação receberá o número 1.
- b) Caso a seqüência genômica inteira não tenha sido determinada com todos os seus íntrons e exons, o primeiro nucleotídeo do DNAC deve ser o nucleotídeo número +1 da numeração.
- c) O primeiro nucleotídeo acima do +1 receberá o número -1, não existindo nucleotídeo zero.

11.2. O trabalho de Antonarakis e col (1998) tem sido adotado como referência na descrição de mutações na maioria dos bancos de dados e revistas internacionais. A recomendação geral contida nesse trabalho é a de que as mutações sejam descritas no nível do DNA e, se isso implicar em alguma mudança na proteína, essa também deve ser descrita e discutida nos comentários do laudo. É importante que na interpretação fique claro se a alteração genética encontrada possui ou não relação com o fenótipo. Devem ser evitados termos como “resultado positivo” ou resultado “negativo”, pois podem gerar confusão. Para descrever resultados sem alterações, pode ser referido “não se detectaram alterações nas regiões examinadas” .

11.3. Algumas mutações já descritas na literatura, ou seja, mutações freqüentes e conhecidas há muito tempo, possuem nomes que não são compatíveis com a nomenclatura sugerida acima. Neste caso, é recomendado que seja utilizado o nome já publicado da mutação, o que não oferecerá problemas se esse nome for comum na literatura sobre a doença que está sendo investigada.

12. Confidencialidade de resultados

12.1. Tendo em vista a possibilidade de discriminação individual que os resultados de exames genéticos podem acarretar, os laboratórios devem implantar procedimentos seguros sobre o armazenamento físico ou eletrônico de resultados, que impeçam seu acesso a pessoas não autorizadas. A

confidencialidade desses dados é de suma importância e todos os membros do laboratório com acesso às informações confidenciais dos pacientes devem obedecer a normas de sigilo e discrição.

- 12.2. Os resultados devem ser entregues ao médico solicitante, ao aconselhador genético ou ao paciente.
- 12.3. Critérios rígidos devem ser estabelecidos quando o resultado for transmitido por telefone. Esse tipo de comunicação é aceitável quando for reconhecida a necessidade de comunicação imediata com o paciente ou com o médico responsável. O mesmo se aplica aos resultados emitidos por FAX.
- 12.4. Na transferência eletrônica de dados, deve-se assegurar que o sistema oferece garantia de privacidade e integridade dos resultados.