

Linhas orientadoras de Controlo de Qualidade do Comité de Garantia de Qualidade e *Standards* de Laboratórios da ASVCP (Sociedade Americana de Patologia Clínica Veterinária): ÂMBITO

Perspectiva Histórica

O Comité de Garantia de Qualidade e *Standards* de Laboratórios da ASVCP foi criado em 1996 em resposta a preocupações da ASVCP acerca da garantia de qualidade e controlo de qualidade em laboratórios que realizam análises veterinárias, um tópico com uma importância reconhecida desde há algum tempo e que já tinha sido considerado por outros comités no passado.

O Comité foi encarregue: “de encorajar e promover o estabelecimento de *standards* para a execução de procedimentos laboratoriais” em amostras veterinárias.

A garantia de qualidade e *standards* em laboratórios veterinários constitui vasta matéria contendo ampla informação. Tendo em conta que somos uma organização de patologistas clínicos e de indivíduos interessados em patologia clínica, estamos numa posição única para providenciar liderança e orientação no que toca a diagnóstico laboratorial em Medicina Veterinária. Apesar da legislação governamental controlar muitos aspectos dos laboratórios clínicos humanos, a ausência de tal legislação para laboratórios veterinários exige que demonstremos um compromisso com auto-monitorização e regulamentos gerados dentro da própria disciplina. Ao providenciar orientação nesta área, esperamos melhorar a qualidade da medicina laboratorial veterinária e assim melhorar a saúde dos pacientes veterinários.

Estas linhas orientadoras não têm a intenção de abranger todos os aspectos do controlo de qualidade. Este é um documento dinâmico que será sujeito a revisões e modificações adicionais periódicas, levadas a cabo ao longo do tempo, sendo possível a introdução de novos tópicos. Os tópicos considerados até a data neste documento incluem áreas essenciais, bem como áreas que reflectem os interesses e especialidades de vários profissionais de patologia clínica que são membros do Comité. Com o objectivo de facilitar revisões de secções específicas das linhas orientadoras e a introdução de novos tópicos sem rever todo o documento, as linhas orientadoras foram divididas em subsecções (por exemplo: hematologia, citologia, urianálise, etc.) dentro das secções pré-analítica e analítica.

Estas linhas orientadoras foram extensivamente revistas e sujeitas a comentários por membros do Comité e da ASVCP de modo a que a informação seja um reflexo de todos os membros da sociedade. A ASVCP é uma organização científica sem fins lucrativos que se dedica à promoção do avanço científico, educação e *standards* em Medicina Laboratorial Veterinária.

Objectivo

Estas linhas orientadoras providenciam **linhas orientadoras mínimas para a garantia de qualidade e controlo de qualidade** em laboratórios veterinários. São usadas as definições dos “Clinical Laboratory Improvement Amendments” para estes termos. Uma linha orientadora é um documento desenvolvido através do consenso que descreve critérios para um procedimento geral ou material para uso voluntário. Uma linha orientadora pode ser usada na sua versão original ou modificada pelo

utilizador para acomodar necessidades específicas, sendo por isso, ligeiramente diferente e mais flexível que um *standard*. Um *standard* é um documento desenvolvido através do consenso que claramente identifica requisitos específicos e essenciais no que respeita a material, métodos e práticas para uso na sua versão original. Adicionalmente, um *standard* pode conter elementos reguladores, os quais são claramente identificados.

Espera-se que estas linhas orientadoras sirvam como base para os laboratórios avaliarem as suas práticas actuais, determinem áreas a melhorar e/ou direccionem melhoramentos contínuos ou esforços de formação/educação contínua.

A quem se dirigem estas linhas orientadoras

Estes *standards* são aplicáveis a qualquer laboratório que teste amostras veterinárias (incluindo laboratórios dentro de clínicas veterinárias), mas recomendações específicas para o controlo de qualidade estatístico, tal como descritas neste documento, são apropriadas para laboratórios universitários, de referência ou comerciais. Este documento não pretende abranger actividades em laboratórios farmacêuticos/toxicológicos, uma vez que estes são regulamentados pela “Good Laboratory Practice” (GLP), mas contem áreas comuns a estas regulamentações.

Até recentemente, o desempenho de instrumentos usados dentro das clínicas veterinárias não estava bem caracterizado de modo a permitir a elaboração de recomendações específicas para a garantia de qualidade e controlo de qualidade para laboratórios dentro de clínicas. Estes aspectos estão a ser objecto de consideração por um subcomité dentro deste comité e deverão ser publicadas no final de 2010.

Directivas da ASVCP para o Controlo da Qualidade – reformatadas e revistas

Princípios de Garantia da Qualidade e Normas para a Patologia Clínica Veterinária

Índice

1. Factores pré-analíticos importantes em patologia clínica veterinária
 - 1.1. Gerais, incluindo hematologia, endocrinologia, química e serologia
 - 1.2. Hematologia manual de espécies não-mamíferas
 - 1.3. Urinálise
 - 1.4. Citologia/microbiologia
 - 1.5. Testes de hemóstase (coagulação)
 - 1.6. Prova cruzada (Crossmatch)
 - 1.7. Radioimunoensaio (sem texto)

2. Factores analíticos importantes em patologia clínica veterinária
 - 2.1. Geral
 - 2.1.1. Monitorização
 - 2.1.2. Validação do método
 - 2.1.3. Instrumentação
 - 2.1.4. Conhecimentos do pessoal
 - 2.1.5. Controlo da qualidade
 - 2.1.6. Manual de procedimentos
 - 2.1.7. Comparação de resultados de testes
 - 2.1.8. Identificação de testes realizados em laboratórios externos
 - 2.2. Química Clínica
 - 2.3. Hematologia
 - 2.4. Hematologia manual para espécies não-mamíferas
 - 2.5. Urinálise
 - 2.6. Citologia
 - 2.7. Testes de hemóstase
 - 2.8. Prova cruzada (Crossmatch)
 - 2.9. Radioimunoensaio

3. Factores pós-analíticos importantes em patologia clínica veterinária

1. Factores Pré-analíticos Importantes em Patologia Clínica Veterinária

1.1. Geral, incluindo hematologia, endocrinologia, química e serologia

1.1.1. Colheita de amostras, manuseamento e transporte para o laboratório.

A informação relativa aos requisitos da amostra, à sua colheita apropriada, ao seu manuseamento e aos procedimentos de entrega ou envio para qualquer ensaio realizado no laboratório deve estar disponível aos clientes num formato electrónico, em materiais escritos (como o manual de serviços do laboratório, folhas de informação especial, artigos de revistas científicas ou de boletins informativos) ou por conversação telefónica. As amostras devem ser colhidas de acordo com práticas padronizadas. Os folhetos informativos dos fabricantes de instrumentos têm descrições detalhadas das amostras apropriadas, incluindo os tubos de colheita a usar e as condições de manuseamento. As especificações para entrega de amostras devem ser disponibilizadas ao cliente por cada laboratório. As amostras devem ser manuseadas cuidadosamente e transportadas para o laboratório atempadamente, sob condições adequadas para o tipo de amostra e respectiva estabilidade. O tipo de amostra (e.g. sangue total, soro, plasma, urina) deve ser claramente especificado no rótulo da amostra. Desvios dos protocolos recomendados podem afectar negativamente os resultados dos testes. Contactar os fabricantes para detalhes específicos.

a. Hematologia

- i.** Os esfregaços de sangue feitos na clínica não devem ser refrigerados e devem ser protegidos de condensação e congelamento durante o transporte para o laboratório.
- ii.** Amostras com anticoagulante para hematologia que contenham coágulos passíveis de serem encontrados após inspecção visual produzirão resultados variavelmente erróneos. A clínica deve ser contactada por escrito ou por telefone e informada que a amostra produzirá resultados erróneos. Dado que o grau variável de inexactidão é imprevisível, as amostras com coágulos são impróprias para análise e não é recomendado que estas amostras sejam analisadas. Se amostras de qualidade questionável ou abaixo dos padrões requeridos forem analisadas, quaisquer procedimentos e possíveis inexactidões devem ser documentadas por escrito pelo laboratório. Adicionalmente, quaisquer resultados possivelmente inexactos devem ter comentários bem visíveis no relatório para o clínico declarando claramente que os valores podem ser inexactos e enganadores.

1.1.2. Identificação da amostra. As amostras devem ser identificadas com informação pertinente conforme determinada pelo laboratório, tal como nome do dono, espécie, raça, sexo e idade do animal, nome da clínica ou do médico, morada, números de telefone e de fax, endereço de correio electrónico, local de onde foi colhida a amostra, etc. Identificadores únicos e correspondentes devem ser colocados na ficha de requisição de análises e no(s) recipiente(s) (da(s) amostra(s)).

1.1.3. Identificação do(s) teste(s). O(s) teste(s) requisitado(s) deve(m) ser claramente assinalado(s) ou descrito(s) na ficha de requisição de análises.

1.1.4. Registo laboratorial da Amostra. A informação e identificação da amostra e os testes requisitados devem ser correctamente inseridos no sistema de informação do laboratório (laboratory information system – LIS). A informação introduzida no LIS pode ser usada para rastrear a localização e a conservação apropriada da amostra, por ex.: secção de imunologia vs. hematologia ou congelada vs. refrigerada. A alíquotagem da amostra e entrega à secção apropriada dentro do laboratório ou entre vários departamentos devem ser coordenadas. Quaisquer problemas com a qualidade da amostra, incluindo mas não limitados a hemólise, lipemia, gelificação da amostra, ou outros problemas analiticamente significativos, devem ser registados e comunicados aos clientes e ao pessoal do laboratório. Se o grau de inexactidão associado à qualidade da amostra for presumivelmente significativo, a análise não deverá ser realizada na amostra em questão e/ou os resultados não deverão ser comunicados. Os problemas com os resultados transmitidos ou não transmitidos ao cliente devem-lhe ser comunicados e, se possível, obtida uma nova amostra.

1.1.5. Comunicação e educação do cliente. A comunicação entre o pessoal do laboratório e os clientes (internos e externos) deve ser atempada e cordial relativamente a factores pré-analíticos que influenciam os resultados dos testes laboratoriais (e.g., fichas de requisição incompletas, amostra ou manuseamento da amostra inapropriadas, má qualidade da amostra). Os clientes devem ser informados do tempo esperado para a recepção dos relatórios preliminares e finais. De igual modo, o *feedback* dos clientes para o laboratório deve ser encorajado. Todas as reclamações/*feedback*/sugestões verbais ou escritas devem ser documentadas e direccionadas para o sector apropriado da administração. As reuniões de administração, etc, têm que ser documentadas e revisões organizacionais devem ser conduzidas para assegurar o acompanhamento atempado e apropriado das acções correctivas.

1.1.6. Segurança do pessoal. As condições devem ser confortáveis e apropriadas para o registo de informação no computador, transcrição de dados, manuseamento e eliminação de amostras e para todas as outras tarefas. Deve ser dada atenção especial ao trabalho repetitivo. O equipamento de protecção pessoal deve ser apropriado para o manuseamento de amostras e para trabalhar com o equipamento em todas as áreas do laboratório clínico. Os procedimentos de segurança para a eliminação de todas as amostras, desperdícios e outros elementos devem ser apropriados ao tipo de material. O pessoal de laboratório deve receber formação sobre segurança e risco biológico relativos à exposição a químicos potencialmente perigosos ou agentes infecciosos presentes em materiais biológicos. A documentação da formação ambiental, de saúde e de segurança deve estar disponível e facilmente acessível a cada membro do pessoal. A formação deve incluir prevenção básica de contaminação bacteriana assim como informação sobre zoonoses. Toda a formação deve ser documentada.

1.1.7. Ambiente do laboratório. O ambiente do laboratório deve satisfazer os requisitos padrão necessários para um desempenho seguro, rápido, eficiente e eficaz. A área de trabalho deve ser bem iluminada e organizada de maneira a promover eficiência e segurança. O equipamento e a instrumentação devem estar em boas condições de funcionamento. Os protocolos actualizados dos procedimentos devem ser facilmente acessíveis para referência quando necessária. As instalações e funcionamento do laboratório devem estar em conformidade com as agências governamentais relevantes.

1.1.8. Requisitos do pessoal. O pessoal deve satisfazer requisitos de formação conforme os indicados para áreas específicas do laboratório. A formação, educação contínua e recertificação para tarefas especializadas devem ser regularmente agendadas e documentadas. O laboratório deve dotar-se adequadamente de pessoal para atender ao volume de trabalho.

1.1.9. Sistema de informação do laboratório (LIS). O LIS tem como objectivo melhorar o fluxo de trabalho e a eficiência do laboratório. Antes da sua implementação, o LIS deve ser avaliado cuidadosamente e a sua capacidade de manter registos exactos deve ser verificada. Um LIS ineficiente e pesado deve ser actualizado ou melhorado de acordo com as necessidades do laboratório. O LIS deve cumprir todos os regulamentos legais governamentais para arquivo de registos médicos. Problemas com o registo informático das amostras ou com o arquivamento de dados devem ser corrigidos imediatamente.

1.1.10. Identificação de testes feitos em laboratórios externos. Os clientes devem ser informados sobre os testes enviados para outros laboratórios.

1.2. Hematologia manual de espécies não-mamíferas.

1.2.1. Colheita de amostras, manuseamento e transporte para o laboratório. Os tempos de transporte aceitáveis para sangue de aves são mais curtos que para sangues de mamíferos e répteis. Estudos controlados demonstraram que sangue de aves refrigerado se deteriora em 12 horas independentemente do anticoagulante (Harr et al, 2005). O tempo de transporte aceitável para esfregaços sanguíneos de aves em lâminas de vidro é semelhante ao de esfregaços sanguíneos de répteis e mamíferos. Evidência de agregação de leucócitos/trombócitos no hemocítmetro deve ser registada para indicar que a contagem total de leucócitos e contagem celular diferencial são erradas. As amostras para hematologia de espécies de tubarões devem ser processadas até 5 horas após a colheita (Arnold, 2005). O uso de EDTA (7.5% ou 1-2 mg/ml de sangue) é aceitável para a maioria das espécies animais, mas não é apropriado para todas. O sangue de raias da família Dasyatidae, de alguns peixes ósseos e de algumas espécies de aves reage atipicamente em tubos de EDTA preparados comercialmente. O sangue de elasmobrânquios (tubarão e raias) deve ser colhido para um tubo com anticoagulante seco devido aos valores de

osmolalidade plasmática elevados (~1000 mmol/kg). Anticoagulantes líquidos podem ser utilizados se a sua osmolalidade for ajustada.

1.2.2. Requisitos do pessoal. O pessoal do laboratório deve ter formação específica em manuseamento e preparação de amostras de espécies exóticas. A formação deve incluir prevenção básica de contaminação bacteriana assim como informação sobre zoonoses incluindo Chlamydia, Vírus West Nile, Salmonella, Gripe das Aves e Giardia. A documentação relativa à formação, à educação contínua e às avaliações periódicas das competências deve ficar ao critério do director do laboratório.

1.3. Urinálise

1.3.1. Colheita de amostras, manuseamento e transporte para o laboratório.

A identificação do método de colheita de urina é importante para a interpretação da presença e da concentração de potenciais contaminantes, incluindo sangue e bactérias. O requerente da análise deve especificar o método pelo qual a urina foi obtida, tal como micção espontânea (no início, a meio ou próximo do fim da micção), algiação ou cistocentese, ou do chão ou da caixa metabólica. Recipientes transparentes para amostra podem ser usados para facilitar o exame macroscópico se a urina for examinada até 30 minutos após a colheita. No entanto, se a urinálise for atrasada, a urina deve ser protegida da exposição a radiação ultravioleta para prevenir a degradação de constituintes da urina (ex. bilirrubina). As tampas devem ser seguras para prevenir a evaporação e/ou volatilização dos constituintes da urina (ex. corpos cetónicos).

1.3.2. Conservação das amostras de urina. Em circunstâncias ideais, a urina deve ser examinada até 30 minutos após a colheita. Se o exame imediato não for possível, a urina deverá ser armazenada a temperaturas de refrigeração para minimizar alterações na sua composição física e química e para inibir o crescimento bacteriano. Recomendações rigorosas sobre o tempo de armazenamento refrigerado não podem ser feitas porque este depende de componentes específicos da urina (Rabinovitch, 2009). O armazenamento máximo de 24 horas no frigorífico é geralmente recomendada (Osborne cautelosamente sugere 6-8 horas), mas a urina pode ser estável por períodos mais curtos ou mais longos dependendo da sua composição inicial. Os componentes químicos que são particularmente instáveis incluem bilirrubina e glucose, e pH se houver bactérias presentes (Rabinovitch, 2009; Osborne, 1999). A estabilidade de elementos formados depende do pH e concentração da urina. Podem formar-se cristais *in vitro* durante a conservação às temperaturas ambiente ou de refrigeração (Albasan, 2003; Sturgess, 2001). Se a cristalúria for uma preocupação clínica, uma colheita de urina fresca deverá ser examinada imediatamente. As amostras refrigeradas devem estar à temperatura ambiente antes de serem analisadas. Uma vez que os resultados da urinálise podem ser afectados pela duração e temperatura de conservação, o momento da colheita de urina, a hora a que chegou ao laboratório e o método de conservação devem ser registados. Existem métodos alternativos de preservação para estabilização dos elementos

químicos da urina, inibição do crescimento bacteriano e preservação dos elementos formados. As alegações dos fabricantes devem ser seguidas relativamente ao uso previsto de determinado conservante e duração de armazenamento.

1.3.3. Cultura microbiológica. As técnicas quantitativas de cultura microbiológica são recomendadas para determinar a presença de bacteriúria significativa. As amostras de urina colhidas por cistocentese são preferíveis, mas as amostras colhidas adequadamente por algáliação e micção são aceitáveis se os métodos de cultura quantitativos forem usados. A urina deve ser submetida para cultura microbiológica antes do procedimento de urianálise para evitar contaminação da amostra. Alternativamente, uma alíquota estéril pode ser reservada para possível cultura microbiológica após o procedimento de urianálise. Amostras de urina refrigeradas são aceitáveis para cultura microbiológica por pelo menos 6 horas, e frequentemente até 24 horas. A refrigeração de amostras de urina por 24 horas pode dar origem a resultados de cultura falsamente negativos (Padilla, 1981). Se se usar um meio de transporte bacteriostático, as amostras de urina não necessitarão de ser refrigeradas.

1.4. Citologia/Microbiologia

1.4.1. Colheita de amostras, manuseamento e transporte para o laboratório.

Informação referente ao envio de amostras para citologia/microbiologia deve ser providenciada ao cliente num manual de serviços do laboratório, folha de informação especial, artigo de revista científica ou de boletim informativo, material escrito ou instruções verbais. As instruções devem cobrir tópicos tais como técnicas de colheita, recipientes apropriados (com ou sem anticoagulantes), preparação de esfregaços e fixação das amostras, se relevante. A colheita apropriada de amostras citológicas/microbiológicas aumentará a probabilidade de uma interpretação significativa.

1.4.2. As amostras citológicas não fixadas e os esfregaços citológicos secos ao ar e não corados devem ser protegidos da exposição à formalina e aos seus fumos, os quais interferem com a coloração posterior, através do transporte em recipientes firmemente selados ou transportando-os separadamente das amostras para biópsia fixados em formalina.

1.4.3. A identificação da localização anatómica, do método e hora da colheita é de grande importância para determinar a preparação ideal da amostra e para a sua interpretação. O citologista ou citopatologista veterinário deve saber os efeitos dos diferentes métodos de colheita, preparação atrasada e manuseamento inadequado das amostras citológicas, em especial de amostras de fluidos, no que respeita às características citológicas esperadas e respectiva interpretação. Para as amostras de fluidos, um ou mais esfregaços devem ser feitos antes de quaisquer procedimentos de concentração ou fixação. O(s) esfregaço(s) pode(m) ser corado(s) ou deixado(s) sem coloração e deve(m) ser entregue(s) com a amostra de fluido. Isto permitirá uma estimativa da contagem celular e das proporções dos vários tipos de células. Esta pode fornecer informação valiosa que influencia a interpretação citológica e propicia controlo de qualidade (CQ) adicional ao permitir que o

citologista/citopatologista assegure que as contagens celulares correspondem razoavelmente às estimativas feitas neste(s) esfregaço(s). Evita-se também a situação em que uma densidade celular extrema de amostras concentradas impede uma avaliação citológica ideal.

1.5. Testes hemostáticos (coagulação)

1.5.1. Colheita de amostras, manuseamento e transporte para o laboratório. A conformidade com os requisitos de colheita e conservação de amostras para testes de coagulação é obrigatório para resultados exactos. O sangue total deve ser colhido para um tubo com anticoagulante de tipo citrato trisódico numa proporção de 9:1 e cuidadosamente misturado. O mesmo é tipicamente obtido enchendo o tubo de sangue apropriado até à marca indicada. As amostras que não obedecem a esta diluição devem ser rejeitadas (Adcock, 1998). O volume de citrato pode ter de ser ajustado para amostras de animais muito anémicos ou policitémicos (Stockham and Scott, 2008, p. 277). Para testes que requerem plasma, o tubo com citrato é centrifugado e refrigerado a 2-8°C. O plasma deve ser separado das células sanguíneas e transferido para um tubo de plástico (não vidro). (Fiebig, 2005; Kratz, 2006) A estabilidade das amostras a temperatura ambiente ou refrigerada (2-8°C) é de 4 horas e de 24 horas para a aPTT e a PT, respectivamente. Se as análises não forem realizadas nestes intervalos de tempo, as amostras devem ser congeladas a -20°C (Adcock, 1998). Sangue total fresco e citratado destinado a testes da função plaquetária ou outras análises de coagulação deve ser idealmente mantido por menos de 1 hora (Giger, comunicação pessoal). Se as amostras forem enviadas por correio para um laboratório versus transporte directo, o plasma deve ser colocado num tubo de plástico e depois congelado, acondicionado em gelo e enviado de modo a chegar congelado em 24 horas.

1.5.2. Ver boletim de informação do laboratório 1 1.5.1.A Foi acrescentada informação adicional uma vez que mais de 90% dos erros em resultados de ensaios hemostáticos podem ser atribuídos a factores pré-analíticos de transporte e manuseamento (Lippi, 2006; Valenstein, 2009; Bonini, 2002; Dale, 2002).

1.6. Prova cruzada (Crossmatch)

1.6.1. Colheita de amostras, manuseamento e transporte para o laboratório. Podem ser usados soro ou plasma para o teste de crossmatch. No entanto, a espécie do animal e as particularidades do procedimento podem influenciar esta escolha. Soro fresco pode ser usado como fonte de complemento para uso na detecção de hemólise em cães e gatos, mas isto geralmente não é feito. As amostras para crossmatch maior incluem soro (tubo sem aditivo) ou plasma (EDTA ou citrato) do receptor e sangue total anticoagulado (EDTA, ACD ou citrato) ou amostra de concentrado de eritrócitos do(s) dador(es). As amostras para crossmatch menor incluem sangue total anticoagulado do receptor e soro ou plasma do(s) dador(es). As amostras do paciente e do(s) dador(es) devem ter menos de 24 horas, quando possível; as amostras do(s) dador(es) podem ser tão antigas quanto a unidade de sangue a ser cruzado. As amostras devem ser conservadas a 4°C se não forem usadas imediatamente. Para alguns procedimentos é usado sangue total enquanto que outros requerem uma suspensão de eritrócitos lavados em PBS. As recomendações

gerais para a colheita, manuseamento e transporte de amostras hematológicas devem ser seguidas.

1.6.2. Identificação das amostras. As amostras do paciente e do(s) dador(es) devem ser claramente rotuladas como paciente/dador e com a data e hora para identificação das amostras enviadas (paciente e cada um dos dadores). Deve considerar-se a elaboração de requisições específicas para a entrega destas amostras de modo a assegurar exactidão na designação de pacientes e dadores.

1.7. Radioimunoensaio (secção deixada intencionalmente em branco nesta altura)

É favor ver Hegstad-Davies, 2006 para uma revisão de alguma da bibliografia.

2. Factores analíticos importantes em patologia clínica veterinária

2.1. Geral

2.1.1. Monitorização

a. Monitorização interna. É recomendada a monitorização interna de todo o equipamento no que se refere à segurança electrónica, calibração, manutenção e desempenho do equipamento. Um registo de desempenho do instrumento é recomendado para cada instrumento, incluindo informação acerca de quaisquer problemas encontrados e a sua investigação e resolução. O uso de materiais de controlo de qualidade com a finalidade de monitorizar o desempenho interno é descrito em detalhe na secção 2.1.5 Controlo de Qualidade. Os resultados acumulados do controlo de qualidade devem ser revistos sistematicamente e numa periodicidade regular através do uso de gráficos de Levey-Jennings e acções apropriadas devem ser tomadas quando os resultados do controlo de qualidade excederem os limites ou demonstrarem tendências indesejáveis (Westgard, 2006).

b. Monitorização externa (Teste de proficiência). A monitorização externa deve incluir a participação num programa de proficiência externo e específico para laboratórios de diagnóstico veterinário. Uma descrição mais completa da avaliação de proficiência pode ser encontrada em Bellamy e Olexson (Bellamy, 2000).

- i. Todos os laboratórios participantes devem analisar os mesmos materiais.
- ii. Os resultados devem ser tabulados regularmente (mensalmente, trimestralmente ou anualmente) e distribuídos pelos participantes com sumários estatísticos que expressem a proximidade dos resultados individuais do laboratório à média do grupo.

- iii. As médias devem ser calculadas e analisadas com base no método (os mesmos métodos comparados).
- iv. Cada laboratório deve avaliar cuidadosamente a validade do seu desempenho. Um desvio marcado da média do grupo deve instigar uma investigação.

2.1.2. Validação do método. Antes de adoptar um novo teste ou introduzir um novo instrumento, a validação do método ou instrumento deve ser efectuada para assegurar que o procedimento é realizado de acordo com as normas do laboratório e com as informações do fabricante. Os estudos de validação do método ou do instrumento devem avaliar linearidade, precisão, exactidão, intervalo analítico, limite inferior de detecção (LLD)/limite biológico de detecção (BLD)/sensibilidade funcional (FS) do método e examinar o efeito de substâncias interferentes. Os intervalos de referência e os procedimentos de controlo de qualidade para o novo método devem ser determinados antes de serem iniciadas as análises de amostras de pacientes. Se a disponibilidade de dados para a determinação dos intervalos de referência for limitada, esta deve ser explicada numa adenda ao teste e as bases para a interpretação dos resultados devem ser explicadas (Linnet, 2006). Os requisitos de qualidade analítica, tal como o erro total permitido (TE_a) ou os limites de decisão clínica, devem ser estabelecidos para cada teste antes de iniciar os estudos de validação do método ou do instrumento. (Westgard, 1974) Estes requisitos servem como uma referência para o desempenho do teste. O erro total inerente ao novo método ou instrumento, como determinado durante os estudos de validação, deve estar dentro destes requisitos ou o método novo deverá ser rejeitado (Westgard, 2006b).

Os procedimentos de validação do método ou instrumento são enumerados na ordem pela qual são feitos. Estão disponíveis numerosos programas comerciais de software que facilitam a análise estatística dos resultados recolhidos durante os estudos de validação do método. Informação adicional e ferramentas gráficas para a validação do método podem ser encontradas em www.westgard.com.

- a. **Estudo de linearidade:** determinação do intervalo analítico do método
 - i. São recomendados cinco níveis de soluções que podem ser preparadas como indicado abaixo. Soluções com matrizes que se aproximam a amostras reais são preferíveis a diluições com água ou soro fisiológico (Westgard, 2008a).
 - Nível 1: próximo do limite de detecção do ensaio (concentrado baixo)
 - Nível 2: 3 partes concentrado baixo e 1 parte concentrado alto
 - Nível 3: 2 partes concentrado baixo e 2 partes concentrado alto
 - Nível 4: 1 parte concentrado baixo e 3 partes concentrado alto
 - Nível 5: excedendo o limite máximo esperado do ensaio (concentrado alto)
 - i. São recomendadas três a quatro medições em replicado de cada solução (Westgard, 2008a)
 - ii. O valor médio para cada solução é representado no eixo dos yy (das ordenadas) e o valor esperado no eixo dos xx (das abcissas) (Westgard, 2008a)

- iii. O gráfico resultante é visualmente inspeccionado para detectar outliers, linearidade e a recta que melhor se ajusta aos pontos (Westgard, 2008a)
 - iv. Se o ensaio não for linear dentro do intervalo de trabalho recomendado pelo fabricante, o método deve ser rejeitado. Alternativamente, o intervalo de valores pode ser mudado para posicionar-se na região linear.
- b. **Estudo de replicação de curta duração** (repetibilidade ou intra-série): estimativa do erro aleatório (RE - random error) ou imprecisão do método durante um intervalo de tempo curto. As amostras são analisadas durante um único turno de 8 horas ou durante uma única série analítica. (Westgard, 2008c)
- i. Podem ser usadas soluções padrão, materiais de controlo comerciais ou misturas de amostras frescas de pacientes.
 - ii. O nível do analito deve aproximar-se de níveis importantes de decisão clínica. É recomendado um mínimo de dois níveis (normal e alto) se o analito é medicamente significativo quando aumentado. Pelo menos três níveis são recomendados (baixo, normal e alto) se o analito é medicamente significativo quando diminuído ou aumentado.
 - iii. É recomendado um mínimo de 20 replicados durante o intervalo de tempo de interesse.
 - iv. A presença de distribuição Gaussiana (normal) é determinada pela representação dos dados num histograma ou gráfico normal. Se aquela não estiver presente, os dados devem ser analisados para detectar *outliers*. A causa dos *outliers* deve ser determinada e corrigida se possível. Se a distribuição Gaussiana não for possível após a eliminação de possíveis *outliers*, a transformação dos dados pode ser necessária para análises estatísticas adicionais.
 - v. A análise dos dados inclui o cálculo da média, desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV).
 - vi. Comparar o SD e o CV, como medidas do erro aleatório, ao padrão do laboratório (TE_a ou limite de decisão clínica). Se o SD ou o CV excederem este padrão, o método deve ser rejeitado. Para esta avaliação inicial, o bias (tendência, erro sistemático) é considerado ser zero. Análises adicionais, incluindo o bias (determinado a partir do estudo da comparação de métodos), devem ser realizadas depois de esta informação estar disponível.
- c. **Estudo de replicação de longa duração** (reprodutibilidade ou entre-série): estimativa do erro aleatório (RE), ou imprecisão, do método durante um intervalo de tempo mais longo que se aproxima às condições de trabalho reais. Um mínimo de 20 amostras é analisado durante diferentes turnos (e séries) num mínimo de 20 dias. A selecção das amostras e a análise dos dados são idênticos às experiências de replicação de curta duração.
- d. **Comparação de métodos**: estimativa do bias, ou erro sistemático (SE – systematic error), do novo método quando comparado com o método de comparação, se este existe.
- i. Escolher o método de comparação/referência tendo em conta a sua exactidão e qualidade. O método de comparação pode ser um método definitivo, um método de referência ou um outro método de campo

- como definido por Tietz. [Tietz 1979] A comparação com dados de testes de proficiência é outra possibilidade, mas recomenda-se particular atenção em relação à exactidão conhecida de tais dados.
- ii. Recomenda-se um mínimo de 40 amostras de pacientes testadas por ambos os métodos. (Jensen, 2006; Westgard, 2008d)
 - iii. As amostras devem representar o espectro de resultados esperados na aplicação clínica do método e englobar todo o intervalo de trabalho com um número adequado de amostras nos limites do intervalo. (Jensen, 2006)
 - iv. Medições em duplicado para cada método são desejáveis, mas medições únicas são aceitáveis. (Jensen, 2006) Os resultados devem ser examinados no momento em que são obtidos. Se for detectada uma diferença significativa nos valores obtidos pelos dois métodos, deverá efectuar-se imediatamente uma repetição das medições para determinar se a discrepância é repetível ou se ocorreu um erro.
 - v. As amostras devem ser analisadas com um intervalo máximo de 2 horas entre elas (ou mais cedo, dependendo da estabilidade do analito) pelos métodos, o novo e o de comparação. O manuseamento das amostras deve ser definido para evitar variações não relacionadas com os métodos. Se as amostras forem analisadas em laboratórios diferentes (mais de 2 horas de intervalo entre os testes), a estabilidade das amostras tem de ser considerada.
 - vi. O estudo deve ser levado a cabo durante 5 a 20 dias com preferência pelo período de tempo mais longo; e.g., 2-5 amostras por dia durante 20 dias
 - vii. Análise dos dados:
 1. Um gráfico de comparação é recomendado para inspecção visual com o novo método e o método de comparação representados no eixo dos yy e no eixo dos xx, respectivamente. Os *outliers* devem ser re-analisados se as amostras forem frescas. A recta que melhor se ajustar aos pontos (recta de regressão linear) pode ser desenhada com base na apreciação visual dos dados. (Jensen, 2006)
 2. O cálculo do coeficiente de correlação (r) é usado para determinar qual a equação estatística a usar para calcular o SE (bias), mas não é aceitável como medida de concordância. Para os analitos que variam num intervalo amplo são geralmente usadas estatísticas de regressão para determinar o SE (bias). (Jensen 2006; Westgard, 2008d) Para os analitos que variam num intervalo reduzido (por exemplo: electrólitos) são usadas estatísticas com o teste t para determinar o SE (bias). Westgard 2008d)
 - Se $r \geq 0.99$ para dados de um intervalo amplo ou $r > 0.975$ para dados de um intervalo reduzido, podem ser usadas estatísticas de regressão linear *standard* para estimar o SE (bias) a concentrações de decisão médica. (Jensen, 2006; Westgard 2008d; Stockl, 1998) O SE (bias) num nível de decisão particular (X_c) pode ser determinado calculando o respectivo valor y (Y_c) a partir da linha de regressão.

$$Y_c = a(\text{declive})X_c + b(\text{intersecção no eixo dos yy})$$

$$SE(\text{bias}) = Y_c - X_c$$

- Se $r < 0.99$ (ou < 0.975), os dados podem ser melhorados reunindo mais pontos experimentais ou diminuindo a variância fazendo medições em replicado, ou deverá ser usada estatística com o teste t emparelhado para estimar o SE (bias) como a diferença entre as médias dos resultados obtidos pelos dois métodos. (Jensen, 2006; Westgard 2008d) No entanto, o teste t emparelhado não é aplicável na presença de erro proporcional. Como alternativa, podem ser usadas as análises de regressão de Passing-Bablok ou de Deming. A subdivisão dos resultados em grupos (abaixo, dentro ou acima do intervalo de referência) pode ser usada para proporcionar uma avaliação adicional das médias em intervalos que são clinicamente significativos. (Jensen, 2006)
- viii. A criação de um gráfico de Bland-Altman (da diferença) é também recomendada. A diferença entre o novo método e o método de comparação é colocada no eixo dos yy e a média de ambos os métodos é colocada no eixo dos xx. A linha da diferença identifica o SE (bias). No caso de testes sem bias, os pontos estão distribuídos à volta da linha de diferença zero, com aproximadamente $\frac{1}{2}$ acima e $\frac{1}{2}$ abaixo desta linha. (Bland, 1986; Jensen, 2006; Hyloft, 1997)
- ix. Os critérios de desempenho aceitável dependem do TE_a para o teste, conforme determinado por cada laboratório. O erro total calculado (TE_{calc}) inclui o SE (bias), estabelecido pelo ensaio de comparação, e o RE (S), estabelecido pelo ensaio de replicação (de longa duração). $TE_{calc} = Bias_{medi} + 3S_{medi}$. O desempenho é considerado aceitável se $TE_{calc} < TE_a$. Também se pode usar um Gráfico de Decisão da Avaliação do Método (Method Evaluation Decision Chart), o qual leva em conta o TE_a , o SE e o RE, para determinar a aceitabilidade do método. (Westgard, 2008b)
- e. **Estudo de interferência:** estimativa do erro sistemático causado por substâncias na amostra a ser analisada. Estes erros são tipicamente constantes e o tamanho do erro é proporcional à concentração do material interferente. (Westgard, 2008f) As substâncias interferentes mais usuais incluem hemólise, lipemia e bilirrubina. (Bellamy, 2000) Podem ser feitas comparações adicionais entre plasma heparinizado vs. soro e amostras de soro colhidas em tubos com gel vs. tubos simples ou entre outros possíveis interferentes, conforme indicado pelo teste ou instrumento de interesse.
- i. Podem ser usadas soluções padrão, amostras de pacientes ou mistura de amostras de pacientes. As duas últimas são preferíveis devido à sua disponibilidade rápida e à matriz complexa. (Westgard, 2008f) Devem ser escolhidas amostras com diferentes níveis do analito que cubram pelo menos o intervalo clínico. (Westgard, 2006)
 - ii. Quantidades definidas de hemoglobina (de eritrócitos lisados), lípidos (soluções comercialmente disponíveis) e bilirrubina (soluções comerciais standard) são adicionadas às amostras de modo a atingir

- uma concentração superior à esperada em amostras de pacientes. (Westgard, 2008f)
- iii. O volume de interferente adicionado deve ser minimizado para evitar mudanças na matriz da amostra. (Westgard, 2008f) Recomendam-se medições em duplicado em todas as amostras. Pequenas diferenças no analito medido causadas pelo interferente podem ser mascaradas pelo erro aleatório inerente ao método. Medições em duplicado ajudarão a prevenir este problema. (Westgard, 2008f)
 - iv. As medições devem ser efectuadas em ambos os métodos, o novo e o de comparação, se este existir. Se ambos os métodos demonstrarem um SE (bias) similar devido ao interferente, a presença de bias por si só pode não ser suficiente para rejeitar o método novo. (Westgard, 2008f)
 - v. Cálculo do bias devido ao interferente: (Westgard, 2008f)
 1. Determinar a média dos duplicados da amostra que contém o interferente e do controlo
 2. Calcular a diferença (bias) entre a amostra contendo o interferente e o seu controlo. Repetir para todos os pares de amostras.
 3. Calcular a diferença média (bias) para todas as amostras com uma dada concentração de interferente
 - vi. Um teste t emparelhado é recomendado para comparar os resultados da amostra com interferente e do controlo inalterado. Estatísticas de regressão não são aplicáveis. Um teste t de 2 é usado como um “cut-off” padrão. O teste t estima o número de desvios padrão em que a amostra alterada difere da amostra inalterada. (Westgard, 2008f)
 - vii. O critério para desempenho aceitável é $SE_{\text{medi}} < TE_a$. Se $SE_{\text{medi}} > TE_a$, o laboratório deve decidir se as amostras que provavelmente contêm substâncias de interferência podem ser facilmente identificadas e se as amostras com potenciais interferentes devem ser rejeitadas ou se o seu efeito pode ser quantificado ou semi-quantificado baseado em estudos adicionais.
- f. **Estudo de recuperação:** estimativa do erro sistemático (SE) proporcional. O SE proporcional ocorre quando uma substância na matriz da amostra reage com o analito e compete pelo reagente analítico. A magnitude do SE aumenta à medida que a concentração do analito aumenta. O SE proporcional é determinado calculando a percentagem recuperada de uma quantidade de analito padrão adicionada a uma amostra de paciente (Westgard, 2008f)
- i. Soluções padrão de alta concentração são muitas vezes usadas porque podem ser adicionadas em pequenas quantidades de forma a minimizar a diluição da amostra, mas ainda assim conseguir uma mudança reconhecível e significativa na concentração do analito. A diluição da amostra original não deverá exceder 10%.
 - ii. A quantidade de analito adicionada deve resultar numa amostra que alcança o nível seguinte de decisão médica para esse analito. Tal como no ensaio de interferência, pequenas adições serão mais afectadas pela imprecisão inerente ao método do que grandes adições.
 - iii. Recomendam-se medições em replicado de ambas as amostras, a adulterada e a de controlo. As amostras de recuperação devem ser analisadas pelo novo método e pelo de comparação. O número de amostras de pacientes a serem testadas dependerá do número e tipo de reacções que se suspeita produziram um erro sistemático.

- iv. Quando um estudo de recuperação está a ser feito como parte da avaliação de um método novo, aquele deve ser idealmente realizado usando ambos os métodos novo e comparativo, se este existe.
- v. Cálculo dos dados (para um exemplo do cálculo dos dados envolvido num estudo de recuperação, ver Westgard, 2008f ou <http://www.westgard.com/lesson27.htm#4> acessado a 10 Novembro, 2009)
 - 1. Calcular a quantidade de analito adicionada:
$$\text{Conc. padrão adicionada} \times [\text{ml padrão adicionada} / (\text{ml padrão adicionada} + \text{ml amostra})]$$
 - 2. Calcular a média das medições em replicado para todas as amostras.
 - 3. Calcular a diferença entre a amostra adulterada e o controlo.
 - 4. Calcular a recuperação dividindo a diferença pela quantidade adicionada.
 - 5. Calcular a média das recuperações de todos os pares testados.
 - 6. Calcular o SE proporcional como $100\% - \% \text{recuperação}$
- vi. O critério para desempenho aceitável é $SE_{\text{medi}} < TE_a$. Pequenas quantidades de erro sistemático proporcional podem ser aceitáveis; no entanto, o método deve ser rejeitado se são observados grandes erros sistemáticos proporcionais que são maiores que o erro total permitido.

g. **Intervalo de referência para o novo método/instrumento:** a criação de um intervalo de referência novo ou a validação de um intervalo de referência previamente existente é necessária para a tomada de decisões clínicas.

Ver as novas linhas de orientação da ASVCP para a criação e a manutenção de intervalo(s) de referência e limiar(es) de decisão

- h. **Estudo do limite de detecção:** estimativa da menor concentração mensurável de um analito. A verificação do limite de detecção é recomendada para todos os ensaios onde um valor baixo pode ter significado clínico, por exemplo, testes forensicos, níveis de drogas terapêuticas, TSH, imunoensaios e marcadores cancerígenos. (Westgard, 2008g)
 - i. Usam-se uma amostra “branca” que não contém o analito de interesse e uma amostra “fortificada” que contém uma concentração baixa do mesmo analito. Podem ser necessárias várias amostras fortificadas contendo o analito na concentração de detecção invocada pelo fabricante.
 - ii. Recomendam-se 20 medições em replicado para cada uma das amostras.
 - iii. As medições da solução branca podem ser feitas “intra-série” ou “inter-série” no mesmo dia. No entanto, a amostra fortificada deve ser analisada durante um período de tempo mais longo para ter em conta a variação entre dias e entre-séries. Um mínimo de 5 dias é geralmente usado. (Westgard, 2008g)
 - iv. Estimativas quantitativas podem ser expressas como:
 - 1. Limite inferior de detecção (LLD)/Limite de quantificação (LoQ) - média do branco + 2-3 x SD do branco.
 - 2. Limite biológico de detecção - média do branco + 2-3 SD da amostra fortificada.
 - 3. Sensibilidade funcional - média da amostra fortificada que tem CV de 20%. Isto representa o limite mais baixo em que a informação

quantitativa é de confiança. Várias amostras fortificadas têm de ser estudadas de forma a determinar a amostra fortificada com 20% de CV.

i. Seleção de regras de CQ para a monitorização estatística do desempenho do método (Validação do CQ)

- i. A validação do CQ pode ser feita manualmente usando gráficos OpSpecs normalizados, o calculador EZRUNS (www.westgard.com) ou outros programas de garantia de qualidade. (Friedrichs, 2005)
- ii. A validação do CQ utiliza o requisito de TE_a (ou intervalo de decisão clínica) para o teste, juntamente com o CV (RE) e o bias (SE) determinados pelos ensaios de replicação e comparação dos métodos, para determinar as regras de controlo que podem ser aplicadas no CQ estatístico. (Westgard, 2006)
- iii. Para a maioria dos métodos automáticos, uma probabilidade de detecção de erro de 90% e uma probabilidade de falsa rejeição menor de 5% são suficientes. Para ensaios extremamente estáveis, com poucos problemas previstos, uma probabilidade de detecção de erro tão baixa quanto 50% pode ser aceitável. (QP15 Frequently Asked Questions About Quality Planning/Perguntas Frequentes sobre Planeamento da Qualidade. Disponível em: www.westgard.com. Acedido a 10 de Novembro de 2009.)
- iv. Diferentes regras de CQ podem ser necessárias para diferentes níveis do mesmo analito (CQ multinível). Por exemplo, um CQ mais rigoroso e de regras múltiplas pode ser necessário para detectar erro a níveis baixos do analito do que a níveis altos.
- v. A adopção de um novo método ou a calibração/manutenção de um método podem necessitar de regras de CQ diferentes (mais rigorosas) das usadas durante o uso rotineiro de um método. Isto é referido como CQ multifásico.

2.1.3. Instrumentação

a. Desempenho do instrumento: A instrumentação e as metodologias usadas devem ser capazes de providenciar resultados dentro das características de desempenho estabelecidas pelo laboratório. (Linnet, 2006) Estas incluem:

- i. Intervalo analítico incluindo limite de detecção e linearidade
- ii. Precisão
- iii. Exactidão
- iv. Especificidade Analítica – Medição do composto alvo. Deve dar uma estimativa e definir claramente quaisquer substâncias interferentes. Uma vez que as interferências não podem ser sempre evitadas, deve considerar-se a criação de gráficos de interferência (*interferographs*) que examinem os efeitos da adição de lípido, bilirrubina e hemoglobina nos resultados do ensaio. As interferências são específicas de cada espécie e em circunstâncias ideais devem criar-se gráficos de interferência para cada analito e espécie testados
- v. Sensibilidade Analítica
- vi. Pontos adicionais a considerar:

1. A conformidade dos instrumentos com parâmetros ajustáveis para diferentes substâncias e/ou espécies deve ser cuidadosamente verificada
2. As características de desempenho definidas pelo laboratório e fabricante devem ser comparadas e ajustamentos feitos conforme necessário.
3. Assegurar que certas diferenças entre as espécies estão estabelecidas; geralmente, os representantes técnicos do fabricante do instrumento dão assistência nesta parte da qualificação e configuração do instrumento.

b. Verificações funcionais

- i. Verificações funcionais apropriadas das características operacionais críticas devem ser efectuadas em todos os instrumentos. (i.e., luz difusa, ajustar a zero, níveis eléctricos, alinhamento óptico, verificações do *background*, etc.)
- ii. Previamente à análise das amostras, o pessoal do laboratório deve efectuar o CQ e/ou calibrar cada instrumento, diariamente ou uma vez por turno. Os instrumentos devem ser manipulados segundo as instruções do fabricante

c. Calibração

- i. Os instrumentos devem ser calibrados, pelo menos, cada 6 meses. Calibrações mais frequentes podem ocorrer: (Westgard, 2008a)
 1. De acordo com a recomendação do fabricante.
 2. Após uma reparação/revisão importante.
 3. Quando os valores do CQ estiverem fora dos limites ou a resolução de problemas indicar essa necessidade.
 4. Quando o volume de trabalho, o desempenho do equipamento ou a estabilidade do reagente apontarem para a necessidade de uma calibração mais frequente.
- ii. Após a calibração, os controlos devem ser testados conforme o POP.

2.1.4. Conhecimentos do Pessoal. O pessoal do laboratório deve ter um conhecimento aprofundado do funcionamento do equipamento e do seu uso, incluindo, mas não limitado, aos seguintes tópicos.

- a. Diferenças de linearidade entre amostras animais e humanas
- b. Efeitos da hemólise, lipemia, icterícia, pigmentos carotenóides (especialmente em grandes animais) e diferentes anticoagulantes em cada ensaio
- c. Intervalos de valores passíveis de serem transmitidos
- d. Intervalos de valores passíveis de serem transmitidos e intervalos de referência específicos da espécie ou da estirpe
- e. Intervalos fisiológicos esperados. Podem estabelecer-se critérios de repetição da análise da amostra. Os critérios para repetir um teste devem incluir quaisquer mensagens ou sinais de erro gerados pelo equipamento, assim como resultados grosseiramente fora do intervalo fisiológico normal. Neste último caso, considerar usar “valores de pânico” pré-

programados no sistema operativo do analisador de bioquímica. A reanálise para confirmação de um valor anormal deve ser comunicada ao cliente como parte do relatório.

- f. Problemas comuns encontrados em amostras veterinárias e passos apropriados a dar com várias mensagens ou sinais de erro
- g. Plano regular de manutenção do instrumento (diária, semanal, mensal e conforme necessária).
- h. Substituição do equipamento inadequado ou defeituoso
- i. Procedimentos para a resolução de problemas (*troubleshooting*)
- j. Uso apropriado de comentários e de critérios específicos da espécie. Os comentários e os critérios específicos da espécie podem ajudar os clientes na interpretação dos resultados. A comunicação directa com os clientes deve ser limitada aqueles na organização que são qualificados para interpretar os dados no contexto da história clínica e dos tratamentos anteriores.

2.1.5. Controlo da Qualidade. Os calibradores e os controlos devem ser identificados apropriadamente e o seu uso e frequência devem ser documentados como parte do plano de qualidade para assegurar a exactidão dos resultados. (Westgard, 1998) A documentação e a determinação de acções apropriadas devem seguir regras e políticas estabelecidas para analisar parâmetros de CQ. Estas podem incluir confirmação de resultados, uso apropriado de gráficos e diagramas e introdução correcta de dados, conforme determinado pelo laboratório para cada departamento e/ou tipo de equipamento. Deve haver uma estrutura de comunicação para informar a administração de assuntos relacionados com o CQ e os problemas que necessitam de atenção devem ser enviados para os locais apropriados dentro da organização. Devem estar implementados controlos das medidas correctivas para avaliar a eficiência.

a. Selecção de regras de CQ para a monitorização estatística do desempenho do método (Validação do CQ)

- i. A validação do CQ pode ser feita manualmente usando os gráficos OpSpecs (Operational Specifications Charts) normalizados, o calculador EZRUNS (www.westgard.com) ou outros programas de garantia de qualidade.
- ii. A validação do CQ utiliza o requisito TE_a (ou intervalo de decisão clínica) para o teste com o CV (RE) e o bias (SE), determinados através dos ensaios de replicação e de comparação de métodos, para determinar as regras de controlo que podem ser usadas no CQ estatístico.
- iii. Para a maioria dos métodos automáticos, uma probabilidade de detecção de erro de 90% e uma probabilidade de falsa rejeição menor de 5% são suficientes. Para ensaios extremamente estáveis com poucos problemas esperados, uma probabilidade de detecção de erro tão baixa quanto 50% pode ser aceitável.
- iv. Diferentes regras de CQ podem ser necessárias para diferentes níveis do mesmo analito (CQ multinível). Por exemplo, pode ser

necessário CQ de regras múltiplas, mais rigoroso, para detectar erro a níveis baixos do analito do que a níveis altos.

- v. Regras de CQ diferentes das necessárias durante o uso habitual de um método estabelecido (CQ multifásico) podem ser desejadas durante a adopção de um novo método ou após calibração e manutenção,. No primeiro caso, as regras de CQ são tipicamente mais rigorosas que no segundo caso.

- b. **Reagentes e materiais** usados nos procedimentos devem ser etiquetados com a data de recepção e de abertura e armazenados de acordo com as recomendações do fabricante, quando aplicáveis. Os prazos de validade devem ser respeitados. Os reagentes fora de validade devem ser eliminados apropriadamente. Frequentemente, as concentrações do analito em materiais de controlo representam resultados baixos e altos relativos a anomalias patológicas humanas para além de concentrações humanas normais. Se as concentrações patológicas de espécies animais forem significativamente diferentes destes níveis, poderá ser necessário incluir materiais de controlo adicionais com níveis de analito semelhantes às concentrações ou actividades patológicas em animais.
- c. **A selecção do número de controlos** dependerá, em parte, do desempenho do equipamento e é parte do processo de validação do CQ. Tradicionalmente, 2 a 3 materiais de controlo são habitualmente usados, mas dados adicionais de CQ podem ser necessários de forma a assegurar uma alta probabilidade de detecção de erro e uma baixa probabilidade de falsa rejeição nalguns ensaios.
- d. **Recomenda-se uma duração máxima de 24 horas para cada série** , excepto se o fabricante do instrumento recomendar controlos mais frequentes.
- e. **A verificação da estabilidade do reagente** no decorrer da série deve ser efectuada durante a validação do método analisando materiais de controlo múltiplas vezes durante uma série inteira e comparando a média e SD resultantes com os resultados das experiências de precisão “intra-série”.
- f. **Estabelecer a frequência do CQ com as considerações seguintes**
 - i. Frequência do teste e número de testes efectuados durante cada série ou cada dia
 - ii. Grau em que o método e os requisitos de qualidade do teste dependem do desempenho técnico preciso
 - iii. Estabilidade do analito ou reagente
 - iv. Frequência das falhas de CQ
 - v. Treino e experiência do pessoal
 - vi. Custo do CQ (aumento da frequência aumenta o custo por teste)

- g. **Parâmetros de controlo da qualidade:**
 - i. Os laboratórios devem estabelecer critérios ou verificar os critérios do fabricante para um intervalo de desempenho aceitável dos materiais de CQ. A média, SD e CV devem ser calculados com um mínimo de 20 medições. Recomenda-se que os materiais de controlo sejam do mesmo número de lote.
 - ii. Os controlos devem ser analisados da mesma forma que as amostras de pacientes.

- iii. Pelo menos 1 nível de material de controlo deve ser testado após a mudança do lote de um reagente.
- iv. Deve estar implementado um mecanismo para determinar se o pessoal encarregue dos testes segue políticas e procedimentos correctamente.
- v. Recomenda-se o uso de procedimentos de regras múltiplas ou de outras regras de Westgard baseadas na validação do CQ.
- vi. Os resultados acumulados do controlo de qualidade devem ser revistos sistematicamente e de acordo com uma calendarização regular, por exemplo através do uso de gráficos de Levey-Jennings, e devem ser tomadas acções apropriadas quando os resultados do controlo de qualidade excedem os limites ou demonstram tendências indesejáveis.
- vii. As políticas e os procedimentos devem ser mantidos num manual de procedimentos. A revisão anual (ou mais frequente) da política e procedimentos pelo pessoal deve ser documentada.
- viii. Os registos de CQ devem ser revistos frequentemente para assegurar que a acção adequada é tomada quando os resultados do CQ não satisfazem os critérios de aceitabilidade. A acção correctiva deve ser sumarizada para o pessoal do laboratório.
- ix. Os produtos de controlo, preferencialmente do mesmo número de lote, devem ser comercialmente adquiridos. Se se usarem calibradores como controlos, usar lotes diferentes para cada função. Se forem usadas misturas de amostras de pacientes, estabelecer o valor médio de todos os analitos (mínimo $n = 10$ para estabelecer uma média).
- x. Monitorizar os resultados de amostras clínicas para várias fontes de erro usando parâmetros tais como o *anion gap*, comparando resultados dos testes com requisições anteriores do mesmo paciente (*delta checks* - verificações delta/) e investigando resultados marcadamente anormais (*limit checks* - verificações de limite).
- xi. Devem ser seguidas as instruções do fabricante para a manutenção (diária, semanal, mensal) e a calibração de rotina, salvo se os laboratórios as modificarem para uso próprio e documentarem as instruções apropriadas. Um registo da manutenção, calibração ou reparação do instrumento deve ser mantido no laboratório ou por uma unidade de metrologia.

2.1.6. Manual de Procedimentos. Ver Westgard e Klee para um resumo do conteúdo recomendado do manual de procedimentos. (Westgard, 2006) Os protocolos podem estar organizados como cópias guardadas em manuais e/ou gravados em computadores. Todos os procedimentos em uso no momento devem ser incluídos num Manual de Procedimentos de fácil acesso a todo o pessoal que executa o ensaio. A edição deve ser feita por indivíduo(s) identificado(s). A organização do(s) manual(ais) variará com o tamanho, necessidades e requisitos do estabelecimento. Certas organizações de acreditação podem ter requisitos específicos e são recomendados Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) específicos. A maioria dos procedimentos laboratoriais deve ser adequadamente

abrangida pela presente lista de categorias. Após a conclusão do treino de novo pessoal, uma lista de verificação deve ser implementada para documentar a competência na realização do ensaio e o conhecimento de aspectos relacionados com o ensaio. Quando o documento de procedimentos é revisto, recomenda-se uma revisão com o pessoal relevante para assegurar que todos estão familiarizados com os procedimentos revistos.

a. **Índice**

b. **Informação geral**

- i. Políticas e Procedimentos Gerais
- ii. Informação da Garantia de Qualidade
- iii. Tempo de conservação e eliminação das amostras
- iv. Armazenamento e eliminação de dados brutos
- v. Envio rotineiro de informação
 1. Informação sobre as instalações para ensaios
 2. Requisitos da Amostra
 3. Directivas para transporte/envio
 4. Tempo de Resposta

c. **Procedimentos Operacionais Padrão (POP) para cada procedimento**

A quantidade de informação contida num POP pode variar, mas os seguintes tópicos são recomendados. (Westgard, 2006)

- i. Título (incluir a data ou o número da versão)
- ii. Objectivo e âmbito de aplicação do procedimento
- iii. Princípios do ensaio
- iv. Gestão da amostra
 1. Preparação do paciente (por exemplo: informação específica relativa à espécie)
 2. Colheita, processamento e manuseamento da amostra (por exemplo: volume mínimo)
 3. Critérios para rejeição de amostras
- v. Precauções e limitações operacionais
 1. Perigosidade
 2. Interferências com o método em uso
 - Hemólise, icterícia, lipemia
 - Anticoagulantes
 - Drogas, etc.
 3. Intervalo analítico
 4. Sensibilidade e especificidade, se aplicáveis
- vi. Reagentes
 1. Localização e condições de armazenamento
 2. Preparação
 3. Prazo de validade após abertura
 4. Fabricante (por exemplo: conteúdos)
- vii. Equipamento e materiais/produtos
 1. Equipamento ou ferramentas necessárias para completar o procedimento
 2. Localização dos materiais/produtos

3. Acções a tomar quando o sistema está avariado (remeter à secção de Envio de Informação ou providenciar informação adicional)
- viii. Procedimentos de calibração e de controlo de qualidade
 1. Materiais
 2. Frequência
 3. Interpretação (quando verificar, repetir, resolver problemas, etc.)
- ix. Procedimento (instruções passo-a-passo)
- x. Intervalos de referência apropriados a cada espécie
- xi. Interpretação e apresentação do relatório: valores críticos (acções recomendadas)
 1. Cadeia de comunicação
 - Pessoal do laboratório
 - Informação dos representantes técnicos
 2. Passos para a resolução de problemas
 - Verificação do CQ
 - Repetição
 - Diluições (diluyente apropriado)
- xii. Referências bibliográficas
- xiii. Documentação
 1. Nome, data e assinatura do redactor (data de implementação se diferente da de criação)
 2. Nome, data e assinatura do revisor (se aplicável)
 3. Registo do treino
- xiv. Anexos
 1. Registos ou folhas de trabalho
 - Registo de observação e resolução de problemas
 - Registo de resultados
 2. Folhetos informativos dos produtos (muita da informação acima pode ser obtida directamente do folheto informativo e, nesse caso, o POP pode mencionar secções aplicáveis do folheto.)
 3. “Cábulas”
 - Guias de referência rápida
 - Título e versão do procedimento

2.1.7. Comparação de Resultados de Testes. Se o laboratório efectuar o mesmo teste através de mais de 1 método, em mais de 1 local ou por um laboratório de referência, devem ser feitas comparações pelo menos anualmente para definir as relações entre métodos e locais. As directivas actuais para Comparação do Método estão a ser desenvolvidas. É favor visitar o *website* da ASVCP. Os seguintes passos devem ser incluídos:

- a. Comparar um mínimo de 20 amostras que abranjam o intervalo analítico.
 - i. Marcar os dados num gráfico de comparação x-y
 - ii. Calcular o declive e a intercepção com o eixo dos yy pelo método de mínimos quadrados
 - iii. O uso de um pacote de software estatístico de patologia clínica, como o EP Evaluator, permite a comparação do método usando intervalos analíticos estabelecidos e metas de desempenho aceitáveis pela CLIA.

- b. O director do laboratório ou pessoal qualificado deve definir os limites de desempenho aceitáveis.
- c. Se os resultados de testes individuais efectuados no mesmo paciente ou material não se correlacionam uns com os outros (por exemplo: BUN/creatinina, electrólitos), a causa deve ser investigada, a situação documentada e a medida correctiva tomada.
- d. A verificação de enzimas deve ser comparada entre analisadores no mínimo cada 6 meses (bianualmente) e após qualquer serviço técnico significativo ou outros problemas. A verificação de enzimas completa-se efectuando um estudo de linearidade e comparando resultados entre analisadores por regressão linear.

2.2. Química Clínica

2.2.1. Monitorização

- a. A monitorização interna deve incluir o seguinte:
 - i. Qualidade da água (conforme especificado pela instrumentação e ensaios)
 - ii. Estabilidade da corrente eléctrica (conforme especificado pela instrumentação)
 - iii. Temperaturas dos banhos de água, frigoríficos e congeladores (recomendado diariamente). Os equipamentos de grandes dimensões podem ser munidos de um sistema de alarme que alerte os utilizadores quando as temperaturas estiverem fora de limites específicos.
 - iv. Calibração regular de balanças analíticas e pipetas (recomendado anualmente).
 - v. Manutenção de manuais actualizados de POPs com as datas da implementação inicial e o número da revisão claramente especificado. Deve estar implementado um sistema em que apenas cópias actualizadas são usadas e as versões obsoletas são arquivadas, mas indisponíveis para uso e circulação inadvertidos.
 - vi. Armazenamento, manuseamento e manutenção adequados do inventário.
 - vii. Manutenção de um registo contendo mudanças de procedimentos, problemas com métodos ou instrumentos e acções tomadas para a resolução dos problemas. Todas as entradas devem ser claramente datadas e assinadas por pessoal do laboratório. Esta função pode ser efectuada por uma unidade de metrologia e mantida electronicamente para fácil acesso durante uma inspecção regulamentar ou de garantia de qualidade.
- b. Monitorização externa – ver Recomendações gerais
 - i. Validação do Método – ver Recomendações gerais
 - ii. Instrumentação – ver Recomendações gerais
 - iii. Conhecimentos do Pessoal – ver Recomendações gerais
 - iv. Controlo da Qualidade – ver Recomendações gerais
 - v. Manual de Procedimentos – ver Recomendações gerais
 - vi. Comparação de Testes – ver Recomendações gerais
 - vii. Identificação de Testes Realizados em Laboratórios Externos – ver Recomendações gerais

2.3. Hematologia

2.3.1. Monitorização – ver Recomendações gerais

2.3.2. Validação do Método – ver Recomendações gerais. Nem todos os ensaios para validação do método listados na secção 2.1.2. podem ser aplicados na avaliação de analisadores hematológicos automáticos. Ensaios para a validação do método devem ser seleccionados ou modificados conforme necessário para assegurar que os novos métodos/analisadores estão a funcionar de modo a cumprir os requisitos do laboratório e as especificações do fabricante.

2.3.3. Instrumentação – ver Recomendações gerais

2.3.4. Conhecimentos do Pessoal – ver Recomendações gerais

2.3.5. Controlo da Qualidade para a Hematologia – ver também Recomendações gerais

a. Ensaios automáticos, índices calculados e microscopia

- i. Contagem dos eritrócitos
- ii. Concentração de hemoglobina
- iii. Hematócrito
- iv. Morfologia eritrocitária incluindo RDW, HDW, VGM (MCV), MCH/*CH, e MCHC/*CHCM (*medição directa por laser pelo analisador de hematologia ADVIA)
- v. Contagem total de (WBC)
- vi. Contagem diferencial de leucócitos (microscópica ou automática)
- vii. Morfologia dos eritrócitos e dos leucócitos (microscópica)
- viii. Contagem das plaquetas
- ix. Índices plaquetários incluindo VPM (MPV) e PCT
- x. Contagem de reticulócitos (microscópica e automática)
- xi. Os esfregaços sanguíneos devem ser preparados, corados e reservados para análise microscópica à descrição do patologista clínico

b. Recomendações

- i. As contagens diferenciais automáticas devem ser verificadas por avaliação manual (microscópica) dos esfregaços sanguíneos. Estabelecer critérios para situações que requerem exame microscópico do esfregaço sanguíneo para verificar as contagens do instrumento (por exemplo: contagem total de leucócitos superior a 20000/ μ L)
- ii. Contagens celulares manuais: as contagens celulares efectuadas manualmente usando um hemocítmetro têm de ser feitas em duplicado. Se existir uma diferença superior a 10% entre as contagens obtidas, as câmaras devem ser novamente preenchidas e contadas mais uma vez em duplicado. Se se usar um controlo para a contagem manual de leucócitos, eritrócitos ou plaquetas, um nível de material testado ou de controlo processual (definido

seguidamente) deve ser analisado cada vez que este método é usado ou uma vez em cada turno.

- i. Um controlo processual é definido como um dos seguintes:
 - a. Diluições em duplicado de um controlo testado ou de uma amostra de paciente previamente testada. Os resultados podem ser comparados com limites aceitáveis para diferenças entre duplicados previamente definidos. (Este é o único controlo processual aceitável para a contagem manual de eritrócitos).
 - b. As contagens de leucócitos e de plaquetas podem ser comparadas com um valor estimado a partir de um esfregaço sanguíneo.
- iii. Esfregaços corados com novo azul-de-metileno podem ser avaliados para uma contagem microscópica de reticulócitos. Se as contagens forem feitas em duplicado (dois esfregaços), os resultados não deverão diferir por mais de 10%.
- iv. As contagens automáticas de reticulócitos devem correlacionar-se com a proporção de eritrócitos policromatófilos observados num esfregaço de sangue corado.
- v. Os hematócitos por centrifugação (PCV) devem aproximar-se do hematócrito (Hct) calculado por um analisador automático usando o VGM e o número de eritrócitos. O laboratório deve estabelecer a diferença máxima aceitável, a qual pode variar com a espécie.
- vi. A concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) pode exceder o limite superior do intervalo de referência numa amostra hemolisada (patológica ou *in vitro*), lipemia e na presença de corpos de Heinz. Na ausência destas condições, um MCHC alto pode indicar erro do instrumento.

2.3.6. Manual de Procedimentos - ver Recomendações gerais

2.3.7. Comparação de Testes – ver Recomendações gerais

2.3.8. Identificação de Testes Realizados em Laboratórios Externos – ver Recomendações gerais

2.4. Hematologia Manual para Espécies Não Mamíferas

2.4.1. Monitorização. A monitorização interna deve incluir o seguinte: monitorizar a preparação do reagente para o diluente da contagem celular (água de grau reagente, verificação da qualidade de um novo lote em comparação com a de lotes anteriores).

2.4.2. Validação do Método – Ver também Recomendações gerais. Os analistas devem ser competentes em hematologia de animais exóticos, mas de todas as formas realizarão testes padrão de validação do método. Nem todos os ensaios para validação do método listados na secção 2.1.2. podem ser aplicados na avaliação de métodos hematológicos manuais para animais exóticos. Os ensaios para validação do método devem ser seleccionados ou modificados conforme necessário de modo a assegurar que os novos métodos/analísadores funcionam satisfatoriamente para cumprir os requisitos do laboratório e as especificações do fabricante.

- 2.4.3. Instrumentação** – ver também Recomendações gerais. O equipamento (por exemplo: hemocitómetro, lamelas próprias para hemocitómetro, contadores manuais, pipetas calibradas, contadores para contagens celulares diferenciais) usado para procedimentos hematológicos deve estar em boas condições de trabalho. A monitorização de rotina e a manutenção regular de cada peça de equipamento (por exemplo: calibração anual de pipetas e balanças) devem ser efectuadas e documentadas. Devem ser mantidos registos da manutenção, do mau funcionamento e das reparações. A Abbott Diagnostics, Inc. (Abbott Park, Illinois) validou e dá suporte a contagens celulares automáticas para algumas espécies não mamíferas usando analisadores hematológicos automáticos, o Cell-Dyne 3500 ou superiores. A validação foi feita nos Sea World Laboratories.
- 2.4.4. Conhecimentos do Pessoal.** Os analistas de laboratório devem ser competentes na identificação das células nos testes de cada espécie. É importante ter um conhecimento vasto da variação entre espécies quando se usa citometria de fluxo para perceber quando é necessária uma verificação por métodos manuais.
- 2.4.5. Controlo da qualidade.** A contagem manual de leucócitos com um hemocitómetro é imprecisa e tem coeficientes de variação de 20 a 40% (Schalm, Harr et al, 2005); desta forma, a implementação do controlo da qualidade e a análise estatística podem surtir significância ou uma ausência de significância que não é relevante para as operações diárias. Estudos de validação de métodos para espécies de tubarões conduzidos por J. Arnold (2005) mostraram coeficientes de variação comparáveis à contagem manual de leucócitos em humanos, conforme referido no folheto informativo B-D para Unopette 365855, quando a amostra foi processada até 5 horas após a colheita.
- a. **Reagentes e Materiais.** Os protocolos documentados para contagens celulares incluem a contagem directa usando Violeta de Metilo (Natt & Herrick, 1952) para determinar o número total de leucócitos, eritrócitos e trombócitos e a contagem directa sem corante (Hawkey, 1988) ou um método indirecto usando o corante Floxina B (Campbell, 1988) apenas para leucócitos totais. Neste último método, só as células que contêm grânulos eosinófilos são coradas e os leucócitos totais são calculados com base na percentagem de heterófilos e eosinófilos do diferencial. Os resultados dos estudos de validação do método entre as técnicas directas e indirectas são contraditórios (Dein, 1994; Arnold, 1995) e requerem mais investigação, de preferência seguindo as directivas de Westgard para Validação do Método, e com um número mais representativo de espécies animais. A disparidade dos resultados pode ser devida à imprecisão de cada método. O diluente descrito por Natt and Herrick pode ser preparado no laboratório e é apropriado para todas as espécies vertebradas não mamíferas, mas, no entanto, quando este diluente é usado para algumas espécies de quelónios (tartaruga) e elasmobrânquios (tubarões e raias), são necessários sais adicionais para ajustar a osmolalidade da solução de *stock* (Arnold, 2005). A técnica de Hawkey utilizou a Unopette para leucócitos (WBC Unopette) da Becton Dickinson. O método de Campbell utilizando diluente de Floxina B já não está disponível como Unopette para eosinófilos 5877 (Eosinophil

Unopette 5877), mas um diluente semelhante pode ser preparado pelo utilizador.

b. Actualmente, não estão disponíveis materiais de controlo preparados comercialmente para contagens de células sanguíneas de espécies não mamíferas. Controlos processuais incluem:

- i. Diluições em duplicado de uma amostra de paciente efectuadas dentro dos limites aceitáveis de tempo para a estabilidade da amostra.
 - ii. Estimativa de leucócitos a partir do esfregaço sanguíneo. Cada instituição deve documentar um protocolo de modo a alcançar um método fidedigno de avaliação da exactidão das contagens por hemocitómetro. Os valores estimados de leucócitos totais podem ser difíceis de obter devido à morfologia similar de linfócitos e trombócitos quando vistos a ampliações baixas, as quais são tipicamente usadas para estimativas leucocitárias em mamíferos.
- c. Testes de proficiência para tecnologistas** devem ser documentados anualmente, ou mais frequentemente, conforme determinado pela instituição. Os testes devem incluir contagens comparativas da mesma amostra de sangue para as contagens totais de células e para os diferenciais leucocitários. A selecção da amostra deve ser representativa da população do paciente (ave, réptil, teleósteo, elasmobrânquio, etc.). Entre técnicos, as contagens pelo hemocitómetro não devem diferir em mais de 15% e os resultados percentuais dos diferenciais para cada tipo de célula devem estar dentro de um intervalo de confiança de 95%.

Método de Contagem Celular Directa — Erro do Trombócito/Linfócito. Pode ser difícil diferenciar trombócitos e linfócitos no hemocitómetro para tecnologistas treinados recentemente ou para tecnologistas experientes aquando da contagem em determinadas espécies animais. A contagem de todos os não-eritrócitos nos nove quadrados grandes da câmara e o cálculo do número total (este não é o valor real e tem que ser corrigido a partir do diferencial) é uma boa verificação de controlo de qualidade. Efectuar o diferencial duas vezes – incluir os trombócitos no primeiro diferencial e excluí-los no segundo. O último é transmitido como o resultado real do diferencial. Usar a percentagem de trombócitos do primeiro diferencial, calcular o valor absoluto e subtrai-lo ao número total para determinar os leucócitos totais. Exemplo: contagem (com contador manual) a partir de um hemocitómetro com uma diluição de 1:1000 = 750 células não-eritrócitos; $750 \times 1.1 \times 100 = 82500/\mu\text{L}$ para a contagem total de não-eritrócitos. O primeiro diferencial = Monócitos (1%), Linfócitos (9%), Heterófilos (8%) e Trombócitos (82%). Portanto, o valor absoluto de trombócitos = $0.82 \times 82500 = 67650$. Os leucócitos totais = $82500 - 67650 = 14850/\mu\text{L}$.

2.4.6. Manual de Procedimentos – ver Recomendações gerais

2.4.7. Comparação de Testes – ver Recomendações gerais

2.4.8. Identificação de testes realizados em laboratórios externos – ver Recomendações gerais

2.5. Urinálise

2.5.1. Monitorização – ver Recomendações gerais

2.5.2. Validação do Método – ver Recomendações gerais. Nem todos os ensaios para validação do método listados na secção 2.1.2. podem ser aplicados para avaliação da urinálise. Os ensaios para validação do método devem ser seleccionados ou modificados conforme necessário de modo a assegurar que os novos métodos/analísadores estão a funcionar satisfatoriamente para cumprir os requisitos do laboratório e as especificações do fabricante. Os procedimentos apropriados para a validação do método podem incluir, mas não estão limitados a, comparação de métodos, testes de interferência (em particular o efeito da cor da urina na capacidade de ler resultados de tiras visualmente ou por métodos automáticos) e possivelmente limites de detecção.

2.5.3. Instrumentação – ver Recomendações gerais. A instrumentação usada em urinálise é limitada, mas pode incluir leitores automáticos de tiras. Os leitores automáticos de tiras devem ser mantidos e usados de acordo com as especificações do fabricante. As verificações relevantes de funcionamento devem ser feitas conforme necessário para assegurar o desempenho correcto do instrumento.

2.5.4. Conhecimentos do Pessoal.

- a. Compreender os efeitos das condições da amostra nos parâmetros dos testes, por exemplo: efeito da hemoglobinúria na determinação da proteína.
- b. Conhecer a cristalúria específica das espécies e os achados esperados.
- c. Conhecer os problemas frequentemente comuns encontrados em amostras veterinárias de urina que podem levar a resultados erróneos, por exemplo: efeito de conservantes nos resultados dos testes, amostra de urina incorrectamente analisada numa configuração para soro.
- d. Conhecer a metodologia das tiras reactivas para análise de urina (dipsticks) usadas no laboratório e interferências comuns para aquele método.
- e. Uso apropriado do critério para reanalisar: estabelecido pelo laboratório e baseado no significado clínico dos valores do teste, por exemplo: identificação de cristais, confirmação de proteína por semi-quantificação ou quantificação analítica e confirmação de glucose. Os métodos de pastilhas podem ser necessários quando a pigmentação intensa da urina interfere com a capacidade de ler as tiras reactivas. Incluir documentação da repetição da análise na folha de trabalho e referir ou corrigir os relatórios (se necessário).

2.5.5. Controlo da Qualidade – ver também Recomendações gerais

a. Ensaios

- i. Testes físicos (aparência [cor, transparência], densidade [estimativa por refractometria])
- ii. Testes Químicos
 1. Testes com tiras reactivas

2. Testes de confirmação (glucose [pastilhas], bilirrubina [pastilhas], corpos cetónicos [pó ou pastilhas], precipitação de ácido sulfasalicílico para proteína)
- b. **Procedimentos de controlo da qualidade para testes com tiras reactivas e densidade urinária.** Existem materiais de controlo de urianálise para urina humana que testam a exactidão das tiras reactivas. A frequência do controlo da qualidade nos testes com tiras reactivas depende do número de procedimentos realizados pelo laboratório e pode variar desde o CQ diário até um CQ efectuado cada vez que um novo frasco de tiras reactivas é usado. A precisão dos refractómetros deve ser monitorizada em intervalos regulares usando água destilada. (SG 1.000). (George, 2001)
- c. **Análise microscópica do sedimento: padronização do procedimento**
- i. A análise microscópica do sedimento de amostras veterinárias de urina requer treino. Livros, quadros e *posters* de elementos formados na urina de uma variedade de espécies devem estar acessíveis ao analista. Os detalhes para a sua realização e os resultados a serem transmitidos podem ser sumarizados ou detalhados num procedimento operacional padrão (POP) do laboratório.
 - ii. Um volume padrão de urina é usado para preparar o sedimento urinário (por exemplo: 5 ou 10 ml), dependendo da espécie e dos testes requisitados. Os tubos de centrifugação cónicos devem ser centrifugados a uma baixa RPM, por exemplo 400-500 g durante 5 minutos. Uma RCF (força centrífuga relativa) alta e um tempo excessivo de centrifugação destroem cilindros urinários e elementos celulares. $RCF = 1.118 \times 10^{-5} \times \text{barra radial (cm)} \times \text{rotações/min}$.
 - iii. O sobrenadante é removido por decantação ou pipetagem de forma a que um volume constante de sobrenadante persista com o *pellet* (volume preferido 0.5ml). Os elementos celulares são depois ressuspensos por mistura suave.
 - iv. Pode ser adicionado corante ao sedimento resuspenso para facilitar a identificação dos elementos do sedimento. Um número consistente de gotas deve ser adicionado seguido de mistura suave. A diluição adicional dos elementos celulares pelo volume do corante deverá ser considerada nos resultados finais. Alternativamente, um volume constante de sedimento pode ser mantido substituindo parte do volume de sobrenadante pelo corante.
 - v. Uma pipeta é usada para transferir uma ou duas gotas de sedimento para uma lâmina, dependendo das dimensões da lamela. É importante que o volume de sedimento, o número de gotas de sedimento e o tamanho da lamela usada sejam constantes num laboratório.
 - vi. Existem métodos alternativos de padronização do sedimento urinário (e.g. grelhas de contagem volumétrica, métodos automáticos), mas estes não são frequentemente usados em medicina veterinária. A adopção de qualquer nova metodologia deve ser precedida de estudos de validação do método.

d. Examinação microscópica do sedimento: enumeração de elementos

- i. Os conteúdos do sedimento são examinados a baixa ampliação (x100 ou LPF) seguida de alta-seca ampliação (x400 ou HPF) e raramente ampliação com óleo de imersão (x1000 ou óleo). Vários formatos foram usados para transmitir níveis ou quantidades dos elementos formados. Os números absolutos têm muitas vantagens. As pequenas e grandes quantidades de cada elemento observado em 10 campos, ou a média, são transmitidos. Alternativamente, um sistema de classificação de 0 a 3+ ou de 0 a 4+ pode ser usado, se um critério claro estiver escrito para uso dos tecnologistas. Esta informação também deve ser dada aos clínicos ou clientes. O POP para o sedimento urinário deve descrever claramente os procedimentos para exame e a comunicação dos conteúdos do sedimento.
- ii. O campo de baixa ampliação (LPF) é usado para a enumeração dos cilindros urinários. Os cilindros presentes são mencionados por tipo e número por LPF. O LPF também pode ser usado para uma apreciação geral da distribuição dos cristais, células epiteliais e conteúdos de fundo (muco, espermatozóides, gordura, leveduras, etc.).
- iii. O campo de alta ampliação (HPF) é usado para transmitir o número de eritrócitos, leucócitos e possivelmente cristais, células epiteliais e bactérias quando em grandes números.
- iv. A ampliação com óleo de imersão pode ser usada para informar sobre a concentração e morfologia de bactérias ou outros elementos celulares.
- v. A observação de microorganismos (por exemplo: bacilos ou cocos, leveduras) em montagens húmidas (wet mounts) não coradas ou coradas deve ser confirmada com uma coloração rápida ou coloração de Gram de uma lâmina seca ao ar feita de urina pura ou urina concentrada do sedimento.

2.5.6. Manual de procedimentos – ver Recomendações gerais

2.5.7. Comparação de testes – ver Recomendações gerais

2.5.8. Identificação de testes realizados em laboratórios externos – ver Recomendações gerais

2.6. Citologia

2.6.1. Monitorização. Os equipamentos e reagentes usados para a preparação e análise de amostras citológicas devem ser conservados de uma maneira consistente com as boas práticas de laboratório, conforme detalhado nas secções de química clínica e hematologia destas Directivas.

2.6.2. Validação do Método – ver Recomendações gerais. Nem todos os ensaios para validação do método listados na secção 2.1.2. podem ser aplicados para avaliação de métodos citológicos. Os ensaios para validação do método devem ser seleccionados ou modificadas conforme necessário para assegurar que os novos métodos/analísadores estão a funcionar satisfatoriamente para cumprir os requisitos do laboratório e as especificações do fabricante.

2.6.3. Instrumentação – ver Recomendações gerais

2.6.4. Conhecimentos do Pessoal do Laboratório

- a. O pessoal técnico do laboratório deve ser competente a examinar amostras macroscopicamente (por exemplo: cor e transparência de um fluido) e a realizar todos os testes relevantes (de rotina ou especiais, por exemplo: teste do coágulo de mucina).
- b. O pessoal de laboratório deve conhecer os problemas habitualmente encontrados na preparação das amostras e ter a capacidade de identificar e resolver problemas no decorrer dos procedimentos.
- c. O indivíduo que interpreta as amostras veterinárias, preferencialmente um patologista veterinário, deve ter treino citopatológico documentado e ter conhecimento dos achados citológicos de todas as espécies e dos tipos de amostra citológica que se esperam ser avaliados pelo laboratório.
- d. Devem existir vias apropriadas para uma segunda opinião e revisão adicional ou consulta por um citopatologista, se necessário ou pedido.
- e. Devem ser feitos esforços para averiguar a exactidão diagnóstica das interpretações citológicas. Estas podem incluir, mas não estão limitadas a:
 - i. Correlação dos achados com amostras histológicas ou amostras citológicas adicionais.
 - ii. Acompanhamento do caso com informação sobre a condição do animal e/ou resposta à terapia.
 - iii. Revisão em parceria de amostras citológicas seleccionadas por outro citologista/citopatologista para determinar se há particularidades que não foram notadas, interpretadas com uma importância excessiva ou com pouca relevância.
 - iv. Correlação com outros meios de diagnóstico, por exemplo: radiografia, ecografia, cultura microbiológica, etc.
 1. O citopatologista deve ser conhecedor dos procedimentos suplementares.
 2. O citopatologista deve rever aspectos técnicos de manuseamento e processamento de amostras com o pessoal do laboratório e providenciar orientação conforme necessário.
 3. O citopatologista deve poder comunicar com os clientes sobre factores pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos importantes. Estes podem incluir:
 - v. Informação sobre adequação da amostra
 - vi. Sugestão de modificação de técnicas
 - vii. Opções de testes adicionais
 - viii. Diagnósticos ou diagnósticos diferenciais
 - ix. Prognóstico ou monitorização
 - x. Recomendações de tratamento a um nível baseado na experiência ou conhecimento. Se o citologista/citopatologista não tem experiência em opções de tratamento, deve instruir o cliente a consultar um especialista.

2.6.5. Controlo da Qualidade. Ver também Recomendações gerais. Os citopatologistas são críticos para o controlo da qualidade, visto que vêem a maioria ou todas as amostras e preparações citológicas do laboratório e dependem da fiabilidade dos produtos para as suas interpretações e recomendações. Por essa razão, a relação de trabalho entre o pessoal do laboratório e os citopatologistas é crucial. O controlo de qualidade deve ser apropriado para o tipo de amostras, corantes e procedimentos incluídos na preparação e análise das citologias. Estes podem variar com cada

laboratório, tipo de preparação citológica e preferências do citopatologista. A contagem total de células nucleadas por analisadores automáticos ou por método manual (hemocítmetro) deve ser correlacionada com a densidade celular na lâmina se forem feitos esfregaços directos. O equipamento utilizado para determinar a contagem total de células nucleadas deve ser monitorizado da mesma forma que para as análises hematológicas (ver secção de Hematologia).

- 2.6.6. Manual de Procedimentos – ver Recomendações gerais
- 2.6.7. Comparação de Testes – ver Recomendações gerais
- 2.6.8. Identificação de testes realizados em laboratórios externos – ver Recomendações gerais

2.7. Testes de Hemostase

- 2.7.1. Monitorização – ver Recomendações gerais
- 2.7.2. Validação do método – ver Recomendações gerais. Nem todos os ensaios para validação do método listados na secção 2.1.2. podem ser aplicados para avaliação de analisadores de coagulação. Os ensaios para validação do método devem ser seleccionados ou modificadas conforme necessário para assegurar que os novos métodos/analisadores estão a funcionar satisfatoriamente para cumprir os requisitos do laboratório e as especificações do fabricante.
- 2.7.3. Instrumentação – ver Recomendações gerais
- 2.7.4. Conhecimentos do Pessoal – ver Recomendações gerais
- 2.7.5. **Controlo da Qualidade para a Coagulação** – ver também Recomendações gerais
 - a. Ensaios
 - i. Contagem e estimativa plaquetária
 - ii. Morfologia plaquetária
 - iii. Testes de função plaquetária (adesão, agregação, secreção, PFA100, tempo de sangramento da mucosa bucal, testes de ADN)
 - iv. Testes de anticorpos anti-plaquetas
 - v. Tempo de tromboplastina parcial activada (aPTT)
 - vi. Tempo de protrombina (PT)
 - vii. Tempo de trombina (TT) e tempo de coagulação da trombina (TCT)
 - viii. Concentração de fibrinogénio
 - ix. Teste de factor de coagulação (funcional, ADN)
 - x. Testes de factor de von Willebrand (ELISA quantitativa, CBA qualitativa, análise de multímeros, tempo de sangramento da mucosa bucal, ensaios relacionados da função plaquetária, mutação-específica de ADN)
 - xi. Concentração de produtos de degradação da fibrina/fibrinogénio (PDFs) e D-dímeros
 - xii. Actividade da antitrombina
 - xiii. Testes das proteínas C e S
 - xiv. Tromboelastografia
 - xv. Teste de geração de trombina
 - xvi. Testes de fibrinólise
 - b. Recomendações

- i. Cada laboratório deve definir horas de actividade e/ou turnos de forma a acomodar os ensaios de coagulação. Os estudos de tromboelastografia devem ser combinados antes da análise.
- ii. Os instrumentos portáteis devem ser calibrados regularmente de acordo com as recomendações do fabricante. Se o CQ electrónico estiver disponível, este deve ser executado como recomendado pelo fabricante. O CQ externo é recomendado quando há uma mudança do número de lote do reagente, de rotor, etc., uma mudança ou dano da instrumentação ou qualquer preocupação clínica. Para instrumentos de bancada, pelo menos um nível de material de controlo deve ser analisado em cada turno se for pedido um perfil de coagulação. Isto pode ser feito antes ou simultaneamente com a análise das amostras de pacientes.
- iii. As amostras de pacientes e de controlo podem ser testadas em duplicado.
- iv. Dados expressos em percentagem de uma mistura de amostras de pacientes. Os intervalos são muitas vezes fornecidos e é usada uma percentagem derivada de um controlo.

2.7.6. Manual de Procedimentos – ver Recomendações gerais

2.7.7. Comparação de testes – ver Recomendações gerais

2.7.8. Testes Realizados em Laboratórios Externos – ver Recomendações gerais

2.8. Prova cruzada (Crossmatch)

2.8.1. Monitorização – ver Recomendações gerais

2.8.2. Validação do Método – ver Recomendações gerais. Nem todos os ensaios para validação do método listados na secção 2.1.2. podem ser aplicados para avaliação dos métodos de crossmatch. As provas para validação do método devem ser seleccionadas ou modificadas conforme necessário para assegurar que os novos métodos/instrumentos estão a funcionar satisfatoriamente para cumprir os requisitos do laboratório e as especificações dos fabricantes.

2.8.3. Instrumentação – ver Recomendações gerais

2.8.4. Conhecimentos do pessoal – ver Recomendações gerais

2.8.5. Controlo da Qualidade – ver Recomendações gerais

a. Ensaios

- i. Um crossmatch maior consiste em testar o soro/plasma de um paciente com uma suspensão de eritrócitos do dador em cloreto de sodio isotónico.
- ii. Um crossmatch menor, possível quando for providenciado sangue total do dador, consiste em testar uma suspensão de hemácias do paciente em cloreto de sodio isotónico com o soro/plasma do dador.

b. Recomendações

- i. Se for usado soro para o crossmatch, este deve ser separado dos eritrócitos o mais cedo possível após a coagulação da amostra. As amostras devem ser examinadas para hemólise e classificadas como hemólise 1+ se for leve e hemólise 4+ se for severa. As amostras de soro (ou plasma) com hemólise 3+ ou 4+ devem ser

rejeitadas, embora um critério de rejeição mais rigoroso de hemólise 1+ possa ser usado. Soro/plasma hemolisado pode mascarar uma reacção hemolítica incompatível. (Lippi, 2006; Giger, Comunicação pessoal).

- ii. Fazer autocontrolos do paciente e do dador para assegurar que os reagentes, como por exemplo o diluente, e o equipamento estão a funcionar correctamente. Os autocontrolos devem ser manuseados em paralelo e idênticos às amostras de crossmatch maior e menor.
 1. O autocontrolo do paciente consiste em soro/plasma do paciente e uma suspensão em cloreto de sódio isotónico de eritrócitos lavados do paciente
 2. Quando for entregue sangue total do dador, o autocontrolo do dador consistirá em soro/plasma do dador e uma suspensão em cloreto de sódio isotónico de eritrócitos lavados do dador.
- iii. Evitar agitação e batimento excessivos que podem resultar em falsos negativos por desfazer aglutinados frágeis.
- iv. Rouleaux pronunciados podem simular aglutinação. A diluição da amostra em soro fisiológico pode ser usada para dispersar o rouleaux.
- v. Falsos positivos podem ocorrer devido a lavagem inadequada.
- vi. Falsos positivos também podem ocorrer quando se realizam reacções de crossmatch com plasma porque este pode conter coágulos minúsculos de fibrina que podem resultar em pseudo-aglutinação.
- vii. Falsos negativos podem ocorrer devido a excessiva diluição ou concentração de suspensões de eritrócitos.

2.8.6. Manual de Procedimentos – ver Recomendações gerais. Os procedimentos para crossmatch variam entre laboratórios e espécies. As recomendações específicas para protocolos estão para além do âmbito destas directivas. Recomenda-se estabelecer procedimentos para crossmatch ou adoptá-los a partir de outro laboratório de confiança.

2.8.7. Comparação de testes - ver Recomendações gerais

2.8.8. Identificação dos Testes Realizados em Laboratórios Externos – ver Recomendações gerais

2.9. Radioimunoensaio (RIA)

2.9.1. Regulamentos governamentais para o RIA. Os regulamentos governamentais e os requisitos para a licença podem variar com a cidade, estado, província e país. Geralmente são indicados requisitos mínimos para manuseamento seguro de radioisótopos. Os requisitos incluem treino para segurança do pessoal, monitorização de isótopos radioactivos, eliminação apropriada de radioisótopos e inspecção periódica. É necessária uma licença para aquisição de isótopos radioactivos. Um laboratório que considera fazer RIAs deve em primeiro lugar determinar se satisfaz estes critérios e obter a licença antes de estabelecer os procedimentos.

2.9.2. Monitorização – ver Recomendações Gerais

2.9.3. Validação do Método. Qualquer radioimunoensaio deve ser validado para as espécies nas quais será usado. A validação deve incluir um dos métodos resumidos em baixo.

- a. Devem ser revistos artigos de revistas veterinárias de referência para o teste em particular (se disponíveis). Não é boa prática confiar apenas nos testes do fabricante. O teste deve ser validado de forma independente.
- b. Se o teste não puder ser fundamentado através de validação independente, então a seguinte avaliação mínima é necessária:
 - i. Precisão série-para-série – um mínimo de 10 pontos experimentais. 20 Pontos experimentais podem melhorar a exactidão da estimativa.
 - ii. Precisão intra-série – um mínimo de 10 pontos experimentais. 20 Pontos experimentais podem melhorar a exactidão da estimativa.
 - iii. Procedimentos de recuperação – Usar uma substância natural purificada para cada espécie, quando possível. A recuperação deve ser efectuada usando amostras de alta e de baixa concentração.
 - iv. Avaliação de substâncias interferentes como hemólise, lipemia, bilirrubinemia, interações medicamentosas, etc.
 - v. Paralelismo – diluições e detalhes de linearidade.
 - vi. Devem ser criados e mantidos intervalos de referência para cada teste. É favor remeter para as Directivas da ASVCP para Intervalo de Referência e Limiares de Decisão
 - vii. São necessárias curvas padrão para cada teste. Alguns contadores gama podem armazenar curvas. Se implementado em testes de rotina, a validação do procedimento deve estar presente.

2.9.4. Instrumentação - Ver Recomendações Gerais

2.9.5. Conhecimentos do pessoal - ver Recomendações Gerais

2.9.6. Controlo da Qualidade

- a. Um mínimo de 3 materiais de controlo devem ser analisados em cada teste. Aqueles podem incluir controlos comerciais para valores altos, normais e baixos ou amostras desenvolvidas internamente.
- b. A interpretação de resultados de RIA depende muitas vezes da metodologia e dos valores de referência estabelecidos internamente, fazendo com que seja difícil usar determinados sistemas externos de controlo. Recomenda-se que quando se usarem materiais externos de controlo também sejam analisados materiais internos e a interpretação seja comparada
- c. Os controlos externos devem ser usados e representados graficamente pelo menos trimestralmente.
- d. Todos os resultados dos materiais de controlo devem ser registados e os gráficos e valores devem estar prontamente acessíveis ao pessoal que executa os testes. Os gráficos Levey-Jennings são aceitáveis.
- e. Deve existir um plano de acção que detalhe a aceitação ou a rejeição dos resultados dos testes de pacientes com base nos valores dos controlos.
- f. Se o procedimento, conforme detalhado pelo fabricante ou por artigos publicados, for modificado (por exemplo: só um tubo por paciente), deverá estar disponível documentação que demonstre que a precisão e a exactidão do teste permanecem aceitáveis após a(s) modificação (ões).

2.9.7. Manual de Procedimentos – ver Recomendações Gerais

2.9.8. Comparação de resultados de testes – ver Recomendações Gerais

2.9.9. Identificação dos testes realizados em laboratórios externos - ver Recomendações gerais

3. Factores Pós-Analíticos Importantes em Patologia Clínica Veterinária

- 3.1. **Revisão dos dados.** O laboratório deve estabelecer um procedimento de revisão apropriada de amostras e/ou resultados por 2 técnicos, pelo supervisor e/ou patologista. A revisão pode ser específica para testes problemáticos, parâmetros das amostras e/ou significância clínica dos resultados dos testes.
- 3.2. **Entrada de dados e apresentação de resultados.** Os relatórios devem ser precisos, quer sejam criados manualmente ou electronicamente numa base de dados. Os dados devem ser apresentados num formato padrão conforme estabelecido pelo laboratório. Se uma inexactidão clinicamente significativa estiver presente, os resultados devem claramente definir o erro ou não deverão ser apresentados.
- 3.3. **Criação dos relatórios.** Os relatórios devem ter um formato legível e de fácil compreensão e com referências ou explicações apropriadas, conforme necessário. Deverão ser criados atempadamente tendo em conta os componentes pré-analíticos e analíticos. O laboratório deve guardar uma cópia de todos os relatórios assim como de qualquer folha de trabalho anexa. Os relatórios devem ser datados e ter as iniciais do técnico ou patologista envolvido na execução ou interpretação de qualquer etapa do processo.
 - 3.3.1. **Identificação de testes realizados em laboratórios externos:** Os clientes devem ser informados dos testes que são reenviados para outros laboratórios.
 - 3.3.2. Qualquer resultado possivelmente inexacto deve ter comentários claros e facilmente visíveis para o clínico e estes devem afirmar de forma clara que os resultados poderão ser inexactos e enganadores, assim como detalhar a razão.
- 3.4. **Entrega do relatório.** A entrega do relatório deve ser atempada, ao cliente correcto e de uma maneira acordada entre o cliente e o laboratório.
- 3.5. **Conservação das amostras.** As amostras devem ser guardadas sob condições apropriadas por um período pré-estabelecido, o qual é determinado pela estabilidade da amostra, pela política do laboratório e/ou pelos requisitos de certificação/acreditação. As lâminas de microscópio coradas podem ser mantidas indefinidamente, enquanto que amostras como por exemplo de urina, sangue total ou fluido cavitário têm tempos de armazenamento limitados. Em geral, as amostras hematológicas de aves não devem ser conservadas (incluindo transporte) por mais de doze horas enquanto que as amostras de répteis podem ser conservadas por 24 horas. As amostras de sangue total podem ser congeladas a -20°C para análise de ADN e a -70°C para análise de ARN. As amostras em congeladores “frost-free” podem degradar-se devido a ciclos repetidos de congelação-descongelação.
- 3.6. **Eliminação de amostras.** Os laboratórios devem eliminar materiais e amostras perigosas e não perigosas apropriadamente e de forma segura. Deve incluir-se o esvaziamento atempado de todos os contentores e recipientes para o lixo.
- 3.7. **Segurança do pessoal** - ver Recomendações pré-analíticas

- 3.8. Ambiente laboratorial.** Após a conclusão de um procedimento, a área do laboratório deve ser limpa, organizada e preparada para os procedimentos seguintes. O equipamento deve ser bem conservado de forma a estar sempre pronto para uso. Ver a secção Pré-analítica para recomendações adicionais.
- 3.9. Requisitos do pessoal.** Ver secção Pré-analítica.
- 3.10. Diversos.** Assim que as análises no laboratório estiverem completas, o inventário dos reagentes e materiais deve ser avaliado e os itens vazios requisitados. Um sistema de inventário bem preservado e uma lista de fornecedores aprovados asseguram que materiais de qualidade estão sempre disponíveis.

Bibliografia

Links

www.aacc.org Associação Americana para a Química Clínica; também se encontra a DACC – Divisão de Química Clínica Animal
www.aavld.org Associação Americana de Diagnosticadores de Laboratórios Veterinários
www.acvim.org Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária
www.acvp.org Colégio Americano de Patologistas Veterinários
www.asvcp.org Sociedade Americana de Patologia Clínica Veterinária
www.avma.org Associação Americana de Medicina Veterinária
www.bloodgas.org
www.clsi.org Instituto the Normas Clínicas e Laboratoriais; previamente conhecido como NCCLS
www.esvcp.com Colégio/Sociedade Europeia de Patologia Clínica Veterinária
www.isacp.org Sociedade Internacional para a Patologia Clínica Animal
www.labtestsonline.org
www.scireg.com Consultores em Ciência e Regulamentos
www.sqa.org Sociedade de Garantia da Qualidade
www.toxpath.org Sociedade de Patologia Toxicológica
www.westgard.com Controlo da Qualidade Westgard

Agências reguladoras

www.fda.gov US Food and Drug Administration
www.cdc.gov/clia Clinical Laboratory Improvement Amendments (Correcções de Aperfeiçoamento em Laboratórios Clínicos)
<http://wwwn.cdc.gov/clia/regs/toc.aspx> Regulamentos actuais da CLIA (2004)
http://wwwn.cdc.gov/clia/pdf/42cfr493_2004.pdf Parte 493 para os Requisitos Laboratoriais
<http://www.gpoaccess.gov/cfr/index.html> site alternativo para a parte 493 (CFR)

Publicações

1. Good Laboratory Practice Regulations for Nonclinical Laboratory Studies Guidelines (Regulamentos de Boas Práticas Laboratoriais para as Directivas de Estudos Laboratoriais Não Clínicos). Title 21 Code of Federal Register, subchapter A, part 58 (Título 21 Código do Registo Federal, subcapítulo A, parte 58). Federal Drug Administration (FDA), US Dept. of Health and Human Services (USHHS)
<http://www.nal.usda.gov/awic/legislat/21cfr97.htm>
2. Environmental Protection Agency, Good Laboratory Practice Standards (Agência de Protecção Ambiental, Normas de Boas Práticas Laboratoriais): 40 CFR part 792 (Toxic Substance Control Act/Lei do Controlo de Substâncias Tóxicas)
<http://law.justia.com/us/cfr/title40/40-31.0.1.1.3.html>
3. Environmental Protection Agency, Expert in Laboratory Management; Quality Assurance/Control (Agência de Protecção Ambiental, Especialista em Gestão Laboratorial; Garantia/Controlo da Qualidade): 40 CFR part 160 (Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act/Lei Federal para Insecticidas, Fungicidas e Rodenticidas)

- <http://www.intota.com/expert-consultant.asp?bioID=605165&perID=717458>
4. Guidance for Industry, E6 Good Clinical Practice (Orientação para a Indústria, E6 Boas Práticas Clínicas): Consolidated Guidance (Orientação Consolidada). USHHSFDA. Covering recent topics such as Immunotoxicology Evaluation of Investigational New Drugs, General Principles of Software Validation, Bioanalytical Method Validation, and Part 11, Electronic Records; Electronic Signatures -- Scope and Application (Cobre tópicos recentes como Avaliação Imunotoxicológica de Novas Drogas Experimentais, Princípios Gerais de Validação de Software, Validação do Método Bioanalítico, e parte 11, Registos Electrónicos; Assinaturas Electrónicas – Âmbito e Aplicação).
<http://www.fda.gov/cder/guidance/959fnl.pdf>
 5. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório). US Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, NIH Publication No. 86- 23, Revised 1996.
http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=5140
 6. Office of Laboratory Animal Welfare website/site do Gabinete de Bem-Estar dos Animais de Laboratório
<http://grants.nih.gov/grants/olaw/references/phspol.htm>

Artigos de Referência

1. Adcock D, Kressin D, Marlar RA. 1998. The effect of time and temperature variables on routine coagulation tests. *Blood Coagul Fibrinolysis* 9:463–470.
2. Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA. 1998. Minimum specimen volume requirements for routine coagulation testing: dependence of citrate concentration. *Am J Clin Pathol* 09:595–599.
3. Albasan H, Lulich JP, Osborne CA, et al. Effects of storage time and temperature on pH, specific gravity, and crystal formation in urine samples from dogs and cats. *J Amer Vet Med Assoc* 2003;222:176-179.
4. Allen TA, Jones RL, Purvance J. Microbiologic evaluation of canine urine: direct microscopic examination and preservation of specimen quality for culture.
5. Arnold, J. Hematology of the Sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*: standardization of complete blood count techniques for elasmobranchs. *J Vet Clin Path*; 2005; 34:115-123.
6. Arnold, J. White blood cell count discrepancies in Atlantic loggerhead sea turtles: Natt- Herrick vs. Eosinophil Unopette®. *Proc Assoc Zoo Vet Tech Conf.* 1994:15-26.
7. Arnold, J., Gargan, C, Belovarac, J. Method Validation Study for Total White Blood Cell Counts: Natt-Herrick versus Eosinophil Unopette ® Methods. *Proc Assoc Zoo Vet Tech Conf.* 2007: 49.
8. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; i:307-310.
9. Bonini P, Plebani M, Ceriotti F, Rubboli F. 2002. Errors in laboratory medicine. *Clin Chem* 48:691–698.
10. Boral L, JB Henry. The Crossmatch. In: *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods.* Bernard and Henry, 18th ed. 1991.
11. Carter JM, Klausner JS, Osborne CA, Bates FY. Comparison of collection techniques for quantitative urine culture in dogs. *J Amer Vet Med Assoc* 1978;173(3):296-8.

12. Dale JC, Novis DA. 2002. Outpatient phlebotomy success and reasons for specimen rejection. *Arch Pathol Lab Med* 126:416–419.
13. Dein, FJ, Avian Leukocyte Counting Using the Hemacytometer, *J Zoo Wild Anim Med*; 1994; 25:3.
14. Fiebig EW, Etzell JE, Ng VL. 2005 Clinically relevant differences in prothrombin time and INR values related to blood sample collection in plastic vs glass tubes. *Am J Clin Pathol* 124:902–909.
15. Friedrichs KR, Young KM. Using an independent quality control software program, EZ Runs, to monitor quality control procedures for a bench-top coagulation analyzer. *Veterinary Clinical Pathology* 2005; 34(3):218-223
16. George JW. Refractometers in veterinary laboratory medicine: an historical and technical review. *Vet Clin Pathol* 2001;30:201-210.
17. Glick, M., Ryder, K., & Glick, S. *Interferographs: User's Guide to Interferences in Clinical Chemistry Instruments*. 1991. Indianapolis, IN: Science Enterprises, Inc.
18. Goulden BE. Assessment of the usefulness of the examination of a gram smear of fresh uncentrifuged urine in the determination of significant bacteriuria in dogs. *N Z Vet J* 1968;16(1-2):1-2.
19. Harr KE, Raskin R, Heard DJ. 2005. Temporal Hematologic and Biochemical Effects of Three Commonly Used Anticoagulants on Macaw (*Ara sp.*) and Burmese Python (*Python molurus bivittatus*) Blood. *Vet Clin Pathol.* 34(4):383-388.
20. Hegstad-Davies, RL. 2006. A review of sample handling considerations for reproductive and thyroid hormone measurement in serum or plasma. *Theriogenology.* 66(3):592-598.
21. Hyloft-Peterson P, Stöckl D, Blaabjerg O, Petersen B, Birkemose E, Thenpont L, Flensted Lassen J, Kjeldsen J. Graphical interpretation of analytical data from comparison of a field method with a reference method by use of difference plots (opinion). *Clinical Chemistry.* 1997; 43:2039-2046.
22. Jensen AL, Kjelgaard-Hansen M. Method comparison in the clinical laboratory. *Veterinary Clinical Pathology* 2006; 35(3):276-286.
23. Kratz A, Stanganelli N, Van Cott EM. 2006. A comparison of glass and plastic blood collection tubes for routine and specialized coagulation assays: a comprehensive study. *Arch Pathol Lab Med* 130:39–44.
24. Lippi, G, Franchini, Montagnana, M, et al., 2006. Quality and reliability of routine coagulation testing: can we trust that sample? *Blood Coagula Fibrinolysis* 17:1-7.
25. Natt MP, Herrick, CA. New blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poult Sci.* 1952; 31:735-738.
26. Osborne CA, Stevens JB. *Urinalysis: A clinical guide to compassionate patient care.* Shawnee Mission, KS: Bayer Corporation;1999:17-24, 51-62, and 125-131.
27. Padilla J, Osborne CA, Ward GE. Effects of storage time and temperature on quantitative culture of canine urine. *J Amer Vet Med Assoc* 1981;178(10):1077-81.
28. Rabinovitch A, Arzoumanian L, Curcio KM, Dougherty B, Halim A. *Urinalysis – approved guideline*, 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute document GP16- A3, 2009.
29. Raskin RE, Murray KA, Levy JK. Comparison of home monitoring methods for feline urine pH measurement. *Vet Clin Path* 2002;31:51-55.
30. Stöckl D, Dewitte K, Thienpont M. Validity of linear regression in method comparison studies: limited by the statistical model of the quality of the analytical data? *Clinical Chemistry.* 1998; 44(11):2340-2346

31. Sturgess, CP, Hesford A, Owen H and Privett R. An investigation into the effects of storage on the diagnosis of crystalluria in cats. *J Fel Med Surg* 2001;3:81-85.
32. Swenson CL, Boisvert AM, Kruger JM, gibbons-Burgener SN. Evaluation of modified Wright-staining of urine sediment as a method for accurate detection of bacteriuria in dogs. *J Amer Vet Med Assoc* 2004;224(8):1282-9.
33. Tietz NW. A model for a comprehensive measurement system in clinical chemistry. *Clinical Chemistry*. 1979; 25(6):833-839.
34. Valenstein PN, Sirota RL. 2004. Identification errors in pathology and laboratory medicine. *Clin Lab Med* 24:979–996. of the analytical data? *Clinical*
35. Westgard JO, Cary RN, Sold S. Criteria for judging precision and accuracy in method development and evaluation. *Clinical Chemistry*. 1974; 20(7):825-833.

Livros/Capítulos

- 1) Belford, C. and Lumsden, J.H. Cytopathology. In: *Manual of Small Animal Clinical Pathology*. Davidson, M, Else, R.E. and Lumsden, J. (eds). British Small Animal Veterinary Association, Cheltenham, 2998.
- 2) Bellamy JEC, Olexson DW. *Quality Assurance Handbook for Veterinary Laboratories*. Ames, IA. Iowa State University Press, 2000:101 pages total.
- 3) Burtis CA, Ashwood ER, Bruns D, eds. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 4th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company; 2005.
- 4) Campbell, TW. Avian Hematology. In: *Avian Hematology and Cytology*. Ames, IA: Iowa State University Press; 1988:6-13.
- 5) Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH and DeNicola D. *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat*, 3rd ed. St. Louis, MO: Mosby, Inc.; 2007.
- 6) Day M, Mackin A, Littlewood J, eds. *Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*. Quedgeley, Gloucester, UK: British Small Animal Veterinary Association; 2000.
- 7) Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, ed. *Schalm's Veterinary Hematology* 5th ed. Malden, MA; Blackwell; 2000.
- 8) Freeman, K.P. *Veterinary Cytology: Dog, Cat, Horse and Cow*. Manson Publishing/The Veterinary Press, London; 2008.
- 9) Fudge AM, ed. *Laboratory Medicine: Avian and exotic pets*. Philadelphia, PA: WB Saunders Company; 2000.
- 10) Harvey JW. *Atlas of Veterinary Hematology: Blood and bone marrow of domestic animals*. Philadelphia, PA: WB Saunders Company; 2001.
- 11) Hawkey, C. M, *Clinical Laboratory Medicine: The value of clinical hematology in exotic birds*, *Exotic Animals*, Jacobson, Kollias, Churchill Livingstone; 1988.
- 12) Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, eds. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* 6th ed. San Diego, CA: Academic Press; 2008.
- 13) Latimer KS, Mahaffey EA, Prasse KW. *Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology* 4th ed. Malden, MA; Wiley-Blackwell; 2003.
- 14) Linnet K, Boyd JC. Selection and analytical evaluation of methods—with statistical techniques. In Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE (eds.) *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 4th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Inc.; 2006:353- 407
- 15) Loeb WF, Quimby FW, eds. *The Clinical Chemistry of Laboratory Animals* 2nd ed. Philadelphia, PA: Taylor & Francis; 1999.

- 16) Meyer DJ, Harvey JW. *Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation & diagnosis*. 2nd. ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company; 1998.
- 17) Osborne CA, Stevens JB. *Urinalysis: A Clinical Guide to Compassionate Patient Care*. Shawnee Mission, KS: Bayer Corporation, Agricultural Division, Animal Health; 1999.
- 18) Raskin RE, Meyer DJ. *Atlas of Canine and Feline Cytology*. Philadelphia, PA: WB Saunders Company; 2001.
- 19) Reagan WJ, DeNicola DB, Irizarry Rovira A. *Veterinary Hematology: Atlas of common domestic species*, 2nd ed. Malden, MA: Blackwell Publishing; 2008.
- 20) Stockham SL, Scott MA. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*, 2nd ed. Walden, MA: Wiley-Blackwell; 2008.
- 21) Thrall, MA et al. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
- 22) Westgard JO. *Basic QC Practices Training in Statistical Quality Control for Healthcare Laboratories*. 2nd ed. Madison, WI: Westgard QC, Inc.; 2002.
- 23) Westgard, JO. Method validation: the experimental plan. In: Westgard. JO, ed. *Basic Method Validation*, Madison, WI: Westgard QC; 1999:48-55.
- 24) Westgard JO, Klee GC. Quality management. In Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE (eds.) *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 4th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Inc.; 2006:485-529.
- 25) (a) Westgard JO, Quam E. Method validation: the linearity or reportable range experiment. In Westgard JO (ed.) *Basic Method Validation*, 3rd ed. Madison, WI: Westgard QC, Inc.; 2008:102-112.
 (b) Westgard JO. Method validation: the decision on method performance. In Westgard JO (ed.) *Basic Method Validation*. 3rd edition. Madison, WI: Westgard QC, Inc.; 2008:188-196.
 (c) Westgard JO. Method validation: the replication experiment. In Westgard JO (ed.) *Basic Method Validation*. 3rd ed. Madison, WI: Westgard QC, Inc.; 2008:114-122.
 (d) Westgard JO. Method validation: the comparison of methods experiment. In Westgard JO (ed.) *Basic Method Validation*. 3rd ed. Madison, WI: Westgard QC, Inc.; 2008:124-136.
 (e) Westgard JO. Method validation: statistical sense, sensitivity, and significance. In Westgard JO (ed.) *Basic Method Validation*. 3rd ed. Madison WI: Westgard QC, Inc.; 2008:138-152.
 (f) Westgard JO. Method validation: the interference and recovery experiments. In *Basic Method Validation*. 3rd ed. Madison, WI: Westgard QC, Inc.; 2008:154-166.
 (g) Westgard JO. Method validation: the detection limit experiment. In Westgard JO (ed.) *Basic Method Validation*. 3rd ed. Madison, WI: Westgard QC, Inc.; 2008:168-176.
- 26) Westgard JO. What are control materials and what characteristics are important? In Westgard JO (ed.) *Basic QC Practices*. 1st ed. Madison, WI: Westgard QC, Inc.; 1998:33-46.
- 27) Wied, G. L., Bibbo, M. and Keebler, C.M. Diagnostic Quality Assurance in C Cytopathology. In: *Comprehensive Cytopathology*, 2nd ed. Bibbo, M. (ed). W.B. Saunders Co, London, 1997.

Revistas – bibliografia geral que frequentemente contém informação relevante sobre garantia da qualidade.

- 1) Clinical Chemistry, publicação oficial da Associação Americana de Química Clínica
- 2) Journal of Feline Medicine and Surgery
- 3) Journal of the American Veterinary Medical Association
- 4) Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, publicação oficial da Associação Americana de Diagnosticadores de Laboratórios Veterinários
- 5) New Zealand Veterinary Journal
- 6) Toxicologic Pathology, publicação oficial da Sociedade de Patologia Toxicológica
- 7) Veterinary Clinical Pathology, publicação oficial das Associações Americana e Europeia para a Patologia Clínica Veterinária
- 8) Veterinary Pathology, publicação oficial do Colégio Americano de Patologistas Veterinários

Pessoas que contribuíram para as directivas originais e membros antigos e actuais do Comité de Garantia da Qualidade e de Normas

Dr. Jim Bellamy
Pat Benson
Karen Curd
Dr. Jean Dodds
Dr. Ellen Evans
Dr. Susan Friend
Sue Gallagher
Karen Getzy
Julie Gruenwaldt
Dr. James Klaassen
Dr. Sally Lester
Dr. Peter Lording
Dr. John Lumsden
Mike Mahoney
Dr. Larry McGill
Dr. Joanne Messick
Pam Miller
Dr. Scott Moroff
Dr. Fran Moore
Loretta Moore
Dr. Karen Russel
Dr. Carolyn Sink
Dr. Linda Vap
Dr. Gail Walter
Dr. Ellen Ziemer

Membros actuais e antigos que contribuíram para as revisões e aditamentos destas Directivas, 2008

Jill Arnold
Kirstin Barnhart
Julia Blanco

Rebecca Davies
Deborah Davis
Bente Flatland
Kathy Freeman
Kristen Friedrichs
Rebekah Gunn-Christie
Kendal Harr
Helen Kocmarek
David Korcal
Jim Matthews
Joanne Messick
Renee Pearson
Shannon Pedersen
Connie Peterson
Kristiina Ruotsala
Lynne Shanahan
Balazs Szladovits
Linda Vap

The Portuguese translation was kindly provided by
Margarida Canela Domingos (DNAtech, Lisbon, Portugal)
Helena Ferreira (AXIOM, Newton Abbot, UK)