

NORMAS DE COLHEITA

Manual de apoio a colheitas | Anatomia Patológica



UNI-ANP-M-004 v0.00



Alterações à última edição

Biópsia de rim para execução de Imunofluorescência e Microscopia eletrónica



Índice

Alterações à última edição.....	2
Índice	2
1. Introdução.....	2
2. Identificação da amostra e preenchimento da requisição do exame	2
3. Amostras não conforme	2
4. Marcação de exames per-operatórios	2
5. Citologia Ginecológica.....	2
5.1 Citologia ginecológica convencional	2
5.2 Citologia Líquida.....	2
6. Citologia Anal	2
7. Biologia Molecular na Citologia Ginecológica.....	2
8. Colheita para GBS (streptococcus grupo B)	2
9. Citologia Não-ginecológica.....	2
9.1 Citologia por agulha fina Biópsia Aspirativa e Não Aspirativa	2
9.2. Citometria de Fluxo	2
9.3 Citologia exfoliativa Secreções - Escorrência mamilar	2
9.4 Citologia exfoliativa Secreções - Expetoração	2
9.5 Citologia exfoliativa Líquidos (ascítico, pleural, pericárdico, LCR, lavado brônquico e bronquioloalveolar)	2
9.6 Citologia exfoliativa Líquido das cavidades serosas - Urina.....	2
9.7 Citologia de escovado Escovado brônquico	2
9.8 Citologia de escovado Escovado das vias biliares	2
9.9 Biologia Molecular na Citologia não Ginecológica	2
10. Histológicos	2
10.1 Biópsias e Peças Operatórias	2
10.2 Biologia Molecular na Histologia.....	2
10.3 Biópsia de rim para execução de Imunofluorencência e Microscopia eletrónica 2	
11. Patologia Fetal	2
12. Anexo I – lista de lubrificantes	2



1. Introdução

O objetivo deste manual é partilhar com os Clínicos e demais Profissionais de Saúde os corretos procedimentos de colheita, acondicionamento e envio de amostras biológicas para o laboratório. As colheitas não estão a cargo do LAP, limitando-se este a receber as mesmas, já que são resultantes dos atos médicos dos prescritores.

O LAP baseou estas normas no Manual de Boas Práticas Laboratoriais em Anatomia Patológica (Diário da República, 2.ª série - N.º 4 - 7 de Janeiro de 2009). Assegurar uma boa colheita e fixação das amostras biológicas vai permitir um diagnóstico anátomo-patológico mais assertivo, com uma melhor preservação da arquitetura tecidual e com a ausência de autólise e artefactos de fixação.

2. Identificação da amostra e preenchimento da requisição do exame

As **requisições** de “exames ginecológicos” e de “exames anátomo-patológicos” estão disponíveis para *download* no **site** da **Unilabs** - <https://www.unilabs.pt/pt/servicos/especialidades/anatomia-patologica/requisicoes>

Pede-se que estas sejam preenchidas de forma cuidada de forma a responder às mais importantes questões:

- Identificação do paciente (nome, género, data de nascimento, NIF, morada, contacto telefónico, *e-mail* e subsistema se aplicável);
- Nome da entidade e médico (com o número mecanográfico);
- Natureza da amostra, topografia da lesão e qual é o exame requerido;
- Informações clínicas relevantes (diagnóstico clínico, exames e lesões prévias, tratamentos ou exames complementares, ...).

A amostra deverá estar identificada com o nome completo do paciente (conforme exigido pelo Manual de Boas Práticas da Anatomia Patológica)



3. Amostras não conforme

O LAP considera “**amostras não conforme**” amostras não identificadas, com informação discordante entre amostra e requisição, sem requisição ou sem dados essenciais como a natureza da amostra ou tipo de exame a realizar.

Estas situações impedem o processamento das amostras, isto irá atrasar ou até mesmo impossibilitar o diagnóstico do seu doente.

4. Marcação de exames per-operatórios

Os **exames per-operatórios** devem ser requeridos com um prazo mínimo de 24 horas, através de preenchimento de formulário disponível no site da Unilabs - https://unilabs.pt/pt/servicos/especialidades/anatomia-patologica/exames-extemporaneos?_gl=1*1ejxou0*_ga*NjkxMzM4NzA4LjE2NDI2OTUxNzY.*_ga_5ENH2W83Y5*MTY4MTk4MTUyOC43MjcuMS4xNjgxOTgxNTMxLjU3LjAuMA

O agendamento do exame extemporâneo só poderá ser confirmado via email após a receção dos dados solicitados no referido formulário.

Qualquer alteração ao horário previamente estabelecido deve ser comunicada o mais rapidamente possível. Nestes casos por favor contactar o laboratório através do número **+351 223 321 079**



5. Citologia Ginecológica

Visualização do colo

- **Não utilizar espéculos lubrificados**, caso seja mesmo necessária a utilização de lubrificante optar por um lubrificante hidrossolúvel (ver o **Anexo I** - listagem de lubrificantes recomendados). Não usar luvas com talco já que este também obscurece o esfregaço.
- Se a mulher apresentar um quadro infeccioso intenso é recomendável o tratamento antes de efetuar a colheita.
- A mulher não deve usar cremes, óvulos ou efetuar duches vaginais nas 48/72 horas anteriores.
- Não deve ser utilizado o ácido acético antes da colheita de citologia.

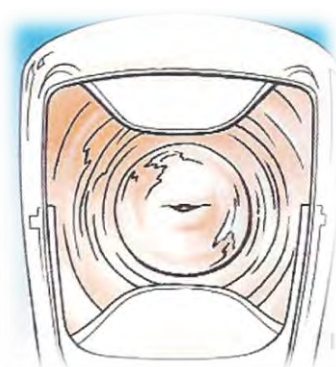


Figura 1: Visualização do colo com o auxílio do espéculo para expor o colo uterino.

Informação clínica relevante a indicar na requisição de citologia ginecológica:

- Idade;
- Data da última menstruação;
- Método contraceutivo;
- Queixas referidas pela utente;
- Corrimento anormal;
- Hemorragias (intermenstruais, pós-coito, pós menopausa);
- Hormonoterapia;



- Intervenções cirúrgicas prévias (conização, histerectomia);
- Teste de HPV anterior;
- Lesões diagnosticadas anteriormente.

5.1 Citologia ginecológica convencional

A qualidade da colheita é essencial para a obtenção de uma amostra de qualidade da zona de transição colo/endocolo.

Para atingir esse objetivo é importante utilizarem-se os meios adequados:

- Utilizar lâminas de **canto fosco**.
- **Identificar** a lâmina com as iniciais da utente, utilizando um lápiz comum (nunca utilizar caneta ou marcador pois a tinta é dissolvida nos reagentes utilizados, ou etiquetas que serão deterioradas ao longo do processamento da lâmina no laboratório).
- **Cervex-brush®** – é a escova com que obtém os melhores resultados (em casos excecionais pode ser necessário recorrer ao *cyto-brush*).
- Efetuar **apenas uma lâmina** obtida com duas passagens da escova segundo as instruções descritas no ponto da técnica de colheita.

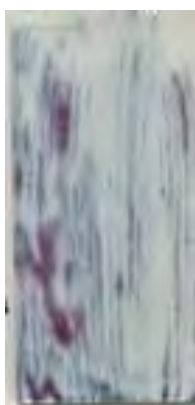


Figura 2: Lâmina de citologia ginecológica convencional corada por Papanicolaou. Apenas uma lâmina com um esfregaço bem executado é suficiente para diagnóstico.

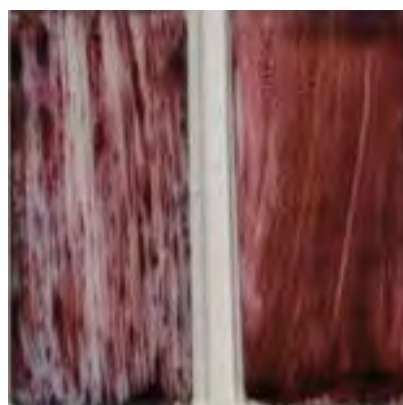


Figura 3: Duas lâminas de citologia ginecológica convencional coradas por Papanicolaou. Não é necessário a duplicação a amostra para um bom diagnóstico



Técnica de colheita de citologia ginecológica convencional

A colheita deve ser efetuada com *cervex-brush*®, de modo a abranger o exocolo, zona de transição (ZT) e endocolo, de acordo com as seguintes instruções:

1. Inserir os filamentos centrais (mais longos) do *cervex-brush*® no canal endocervical e exercer pressão sobre os filamentos laterais (mais curtos), promovendo o seu contacto com o exocolo;
2. Exercendo pressão suficiente para manter os filamentos laterais sob tensão, segurar o cabo entre o polegar e o indicador e rodar a escova cinco vezes na direção dos ponteiros do relógio.

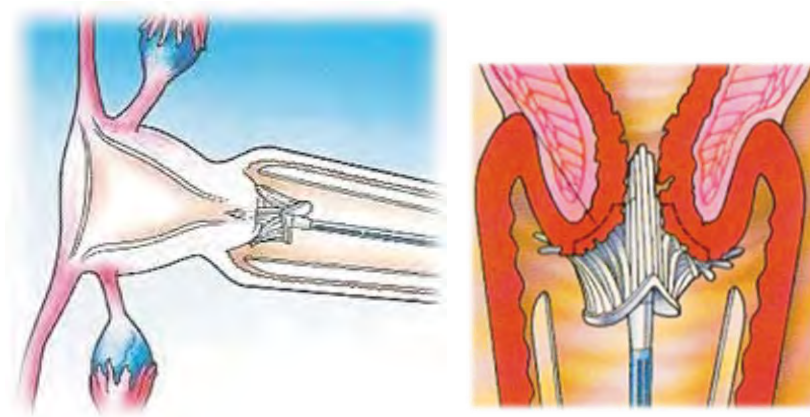


Figura 4 - Exemplificação da colheita com *cervex-brush*®

Execução do esfregaço

1. Estender o material em lâmina (previamente desengordurada com álcool) de modo uniforme e numa só direção, efetuando um esfregaço que não seja demasiado espesso (pois provoca sobreposição celular que impede a visualização da morfologia celular) ou demasiado fino;
2. Não exercer demasiada força de modo a não provocar artefactos por esmagamento celular;
3. Não colocar material no canto fosco, é uma área exclusivamente usada para identificação da lâmina;
4. Não efetuar movimentos circulares, provocam distorção e estiramento celular que dificultam a interpretação.



5. Executar o esfregaço num só lado da lâmina, usando um e outro lado do *cervex-brush*® ao longo da lâmina com um movimento uniforme. Iniciar numa das extremidades da lâmina e terminando na outra;



Figura 5 - Correta execução de esfregaço com *cervex-brush*®.

Técnica de Fixação

1. Fixar de **imediato** com *spray* fixador ou laca, respeitando uma distância de 15 a 20 cm entre a origem do *spray* e a lâmina;
2. Manter uma angulação de cerca de 45°;



Figura 6 - Fixar a lâmina de imediato com *spray* fixador a uma distância de cerca de 15cm de forma a evitar arrastamento de material

3. Deixar secar o fixador durante uns segundos antes de fechar o porta-lâminas;
4. A temperatura ambiente é a adequada para o transporte e armazenamento.



5. Armazenar num recipiente adequado.

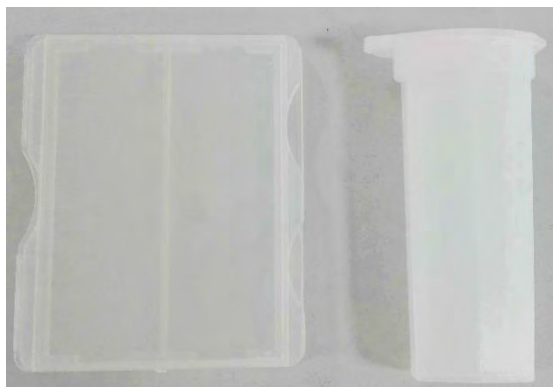


Figura 7: Porta-lâminas adequados ao transporte de lâminas de citologia convencional.

6. Não é possível realizar testes de Biologia Molecular nas lâminas convencionais.

5.2 Citologia Líquida

Técnica de Colheita de citologia líquida

A colheita deve ser efetuada com *cervex-brush*®, de modo a abranger o exocolo, zona de transição (ZT) e endocolo, de acordo com as seguintes instruções:

1. Inserir os filamentos centrais (mais longos) do *cervex-brush*® no canal endocervical e exercer pressão sobre os filamentos laterais (mais curtos), promovendo o seu contacto com o exocolo;
2. Exercendo pressão suficiente para manter os filamentos laterais sob tensão, segure o cabo entre o polegar e o indicador e rode a escova cinco vezes na direção dos ponteiros do relógio;



Figura 8 - Exemplificação da colheita com *cervex-brush*®



3. Após colheita, o mergulhar imediatamente a escova no frasco ThinPrep®;
Não deixar a escova dentro do frasco;



Figura 9 - Após a colheita mergulhar rapidamente a escova no frasco de forma a não deixar secar o material na escova. Não deixar a escova dentro do frasco. Fechar o frasco devidamente.

4. **Identificar frasco** com o nome do paciente. O frasco pode ser conservado à temperatura ambiente.



Figura 10 - Frasco de ThinPrep®. Atualmente existem muitos meios líquidos diferentes. Assegure-se que utiliza um dos meios aprovados (alguns frascos podem ser muito semelhantes).



6. Citologia Anal

É aconselhado efetuar a citologia anal nas mulheres imunodeprimidas, mulheres com diagnóstico de VIN e com risco aumentado de neoplasia anal.

É também indicado fazer citologia anal nos homens que tem sexo com homens (HSH).

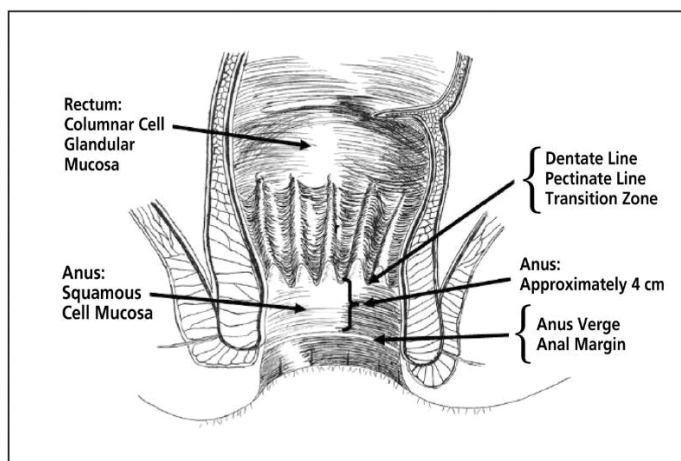


Figura 11 Representação da zona de transformação anal/rectal e escova apropriada para citologia anal – (Anal Cancer and Screening Guidelines for Human Papillomavirus in Men -Richard A. Ortoski, DO; Christine S. Kell, PhD)

A colheita deve ser efetuada com uma escova endocervical (se necessário humedecê-la com soro fisiológico) introduzindo a escova no canal até cerca de 5cm com o cuidado de obter células da zona de transformação anal/rectal.

Os restantes passos da colheita são semelhantes aos da colheita cérvico-vaginal seja através do método convencional ou (idealmente) ThinPrep®.



7. Biologia Molecular na Citologia Ginecológica

Na área de Biologia Molecular do LAP são efetuados os seguintes testes/pesquisas em amostras de ginecologia:

- **Teste de HPV (COBAS HPV)** - Deteta **14 tipos de hr-HPV** (HPV de alto risco) identificando em separado o **HPV 16 e 18**. Possui **marcação CE-IVD**, (obrigatório em Portugal ao abrigo de decreto-lei Dec189/2000) e é **aprovado pela FDA** para utilização nos EUA. Pode também ser requerido o **co-Teste**, que é a associação da citologia líquida (ThinPrep®) com o teste de HPV (Roche COBAS® HPV), este pedido gera um relatório conjunto para as duas análises e uma interpretação baseada nas *guidelines* de consenso da ASCCP (2012).
- **Genotipagem do HPV** – identifica vírus de HPV de alto e baixo risco. Possui marcação CE-IVD.
- **HPV Rápido (GeneXpert)** – Deteta **14 tipos de hr-HPV** (HPV de alto risco) executando uma genotipagem parcial do **HPV 16 e HPV 18/45**. O controlo interno da amostra garante a fiabilidade do resultado. Os resultados em 60 minutos permitem ao clínico a gestão do caso no próprio dia.
- **CT/NG (*Chlamydia Trachomatis/ Neisseria gonorrhoeae*)** – utiliza tecnologia de PCR (Polymerase Chain Reaction) em tempo real de forma a identificar estes microorganismos com elevada sensibilidade.
- ***Mycoplasma genitalium*** - utiliza a tecnologia PCR para identificar a presença do DNA do *Mycoplasma genitalium* e assim obtém grande sensibilidade na pesquisa deste agente infeccioso.
- ***Ureaplasma urealyticum*** - utiliza a tecnologia PCR para identificar a presença do DNA do *Ureaplasma* e assim obtém grande sensibilidade na pesquisa deste agente infeccioso.
- **HSV-1 e HSV-2** - A tecnologia PCR em tempo real, utilizada pelo LAP, permite detetar este agente com bastante sensibilidade.
- **CMV** - A tecnologia PCR em tempo real, utilizada pelo LAP, permite detetar este agente com bastante sensibilidade.

O método de colheita para estes testes de **Biologia Molecular** é igual ao de uma citologia líquida. **Se já tiver sido efetuada colheita** para a citologia líquida, **não é necessária uma colheita adicional** para qualquer um dos parâmetros requisitados.



Contacte o LAP para saber se existe ainda **volume residual da amostra** para efetuar estes testes. O prazo para efetuar estes pedidos adicionais é de **2 meses**, após este período a amostra é descartada.

Existe atualmente no mercado uma grande variedade de meios líquidos para citologia. O LAP **recomenda** o uso do meio **ThinPrep®** para uma melhor preservação de ácidos nucleicos e para resultados dentro do *cut-off* definido pelos fabricantes dos testes. Pode também ser utilizado o **tubo Copan**, adequado especialmente nas colheitas genitais e perianais de homens.



8. Colheita para GBS (streptococcus grupo B)

Técnica Colheita

1. Limpar com soro quantidades excessivas de secreções ou corrimento.
2. Retirar as **duas zaragatoas** do tubo de transporte.
3. Inserir cuidadosamente as duas zaragatoas no canal vaginal da paciente. Colher secreções da mucosa do **terço inferior da vagina**, rodando as zaragatoas três vezes para assegurar a uniformidade da amostra nas duas zaragatoas.
4. Usando as mesmas duas zaragatoas marcadas, insira-as aproximadamente 2,5 cm para além do esfíncter anal e rode-as suavemente para recolher amostras das **criptas anais**.
5. Coloque as duas zaragatoas marcadas no contentor de transporte.
6. Se as amostras vão ser processadas nas 24 horas seguintes, conserve-as à temperatura ambiente. Se as amostras não vão ser testadas nas 24 horas seguintes, refrigere-as até ao momento do teste.

As amostras conservadas a 2 – 8 °C são estáveis até seis dias.



Figura 12 - Tubo Copan com duas zaragatoas, específico para colheitas de GBS.



9. Citologia Não-ginecológica

9.1 Citologia por agulha fina | Biópsia Aspirativa e Não Aspirativa

A biópsia por agulha fina poderá ser realizada com ou sem aspiração (por capilaridade).

Tireoide

Indicações:

1. Nódulos com mais de 10mm ecograficamente muito suspeitos ou de suspeição intermédia
2. Nódulos com mais de 15mm ecograficamente pouco suspeitos
3. Nódulos com dimensão inferior a 10mm em crianças e se ecograficamente muito suspeitos ou de suspeição intermédia.

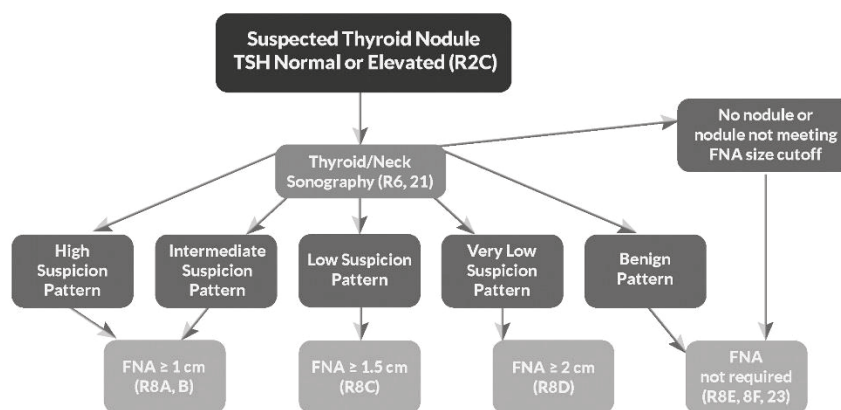


Figura 13 – Haugen Bryan R., Alexander Erik K., Bible Keith C., Doherty Gerard M., Mandel Susan J., Nikiforov Yuri E., Pacini Furio, Randolph Gregory W., Sawka Anna M., Schlumberger Martin, Schuff Kathryn G., Sherman Steven I., Sosa Julie Ann, Steward David L., Tuttle R. Michael, and Wartofsky Leonard. 2015 **American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer** The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. January 2016, 26 (1): 1-133

Objetivo: obter material representativo com o mínimo de contaminação hemática sem artefactos de estiramento, formação de fibrina ou secagem do material (artefactos que dificultam a interpretação anátomo-patológica).



Material necessário: preparar todo o material antes de iniciar a colheita.

1. Recipiente com álcool a 96º
2. Agulhas de biópsia (25 Gauge) agulha de bisel, ponta Quincke 053x88mm



Figura 14 - Exemplo de agulha fina ponta em bisel.

3. Seringa para retirar o material da agulha
4. Lâminas (cerca de 4) identificadas a lápis, com as iniciais do doente e nº da colheita.

Procedimentos:

1. Identificação do exame e recolha de informação clínica adequada. Na requisição deve vir a descrição da lesão, topografia, dimensão do nódulo a biopsar e se possível o grau de suspeição TI-RADS ⁽¹⁾.
2. Preparação da região a biopsar: desinfetar a pele do paciente com álcool ou *spray* alcoólico, não utilizar Betadine®. Se se tratar de uma biópsia guiada por ecografia, colocar o gel de ecografia na sonda e envolver a sonda na película protetora. **Não utilizar gel de ecografia em contacto com a pele.** O gel precipita nos esfregaços impedindo a visualização das células. A sonda deslizará e a transmissão das ondas será realizada molhando a pele do paciente, sempre que necessário, com a solução de desinfecção utilizada.
3. Localizar o nódulo com a sonda
4. Introduzir a agulha no nódulo e retirar o mandril
 - a. **Sem aspiração** – fazer movimentos rápidos e amplos de vaivém dentro do nódulo (cerca de 6 a 10 movimentos) e retirar a agulha sem esperar que o material chegue ao canhão da agulha.



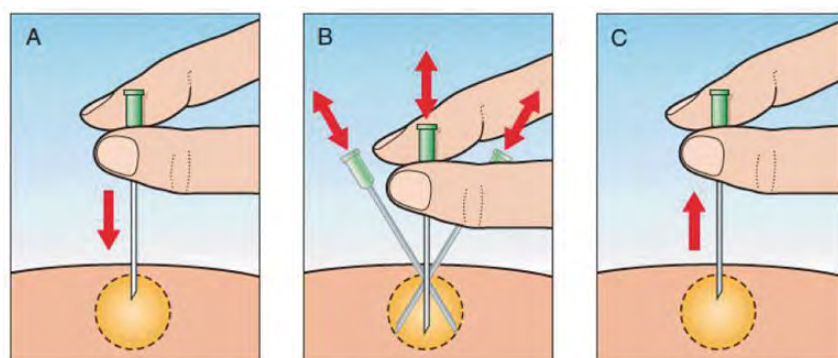


Figura 15 – Exemplo dos corretos movimentos a efetuar durante a biópsia não aspirativa.

- b. **Com aspiração** – Uma vez inserida a agulha no nódulo e retirado o mandril, **puxar o êmbolo rapidamente** para a posição máxima de aspiração (um erro frequente é puxar lentamente, ou pouco). Nesta posição fazer os movimentos rápidos e amplos de vaivém dentro do nódulo (cerca de 6 a 10 movimentos). Soltar totalmente o êmbolo da seringa e só depois retirar agulha sem esperar que o material chegue ao canhão da agulha



Figura 16 – Exemplo que uma biópsia guiada com ecografo.

5. Colocar, gota a gota, o produto nas lâminas, efetuar o esfregaço à medida que se coloca a gota na lâmina.



6. Fixar as primeiras 2 lâminas ao ar e as seguintes 2 lâminas em álcool 96º rapidamente.

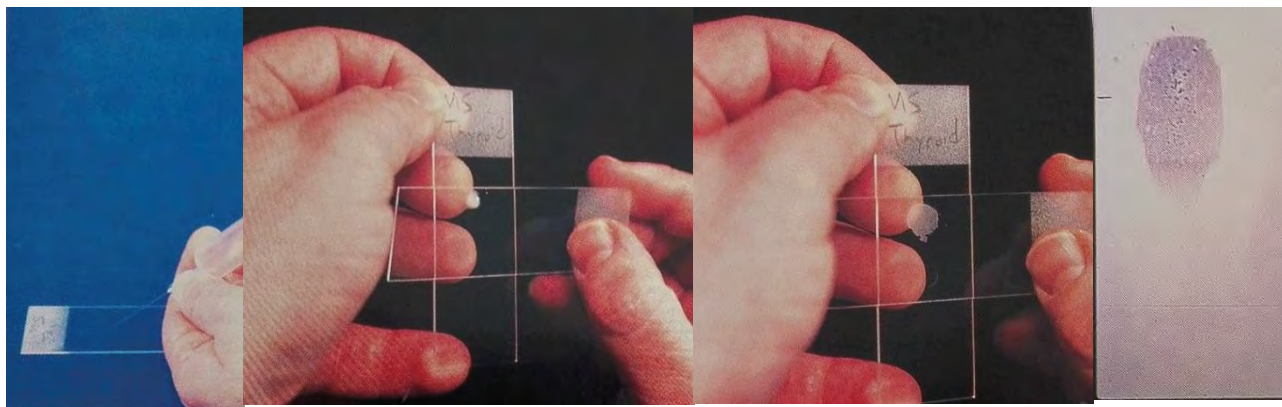


Figura 17 - Demonstração das diferentes etapas da execução do esfregaço de biópsia aspirativa. E exemplo de uma lâmina corada com um esfregaço feito por este método

7. Sempre que forem colhidas, mais do que uma amostra da mesma lesão ou de diversas lesões é necessário referenciar as lâminas.
8. **Identificar lâminas** com lápis (nome da utente e nº do exame);
9. Acondicionar num recipiente adequado.



Figura 18 - Fixação em álcool a 96º para coloração Papanicolaou

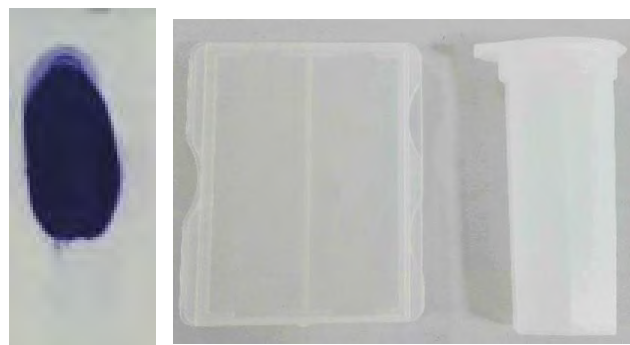


Figura 19 - Lâmina seca ao ar para coloração Giemsa.



No caso de um conteúdo líquido, vertê-lo para um recipiente adequado e conservar em álcool a 50% (1/2 de álcool e 1/2 de produto)



Figura 20 - Exemplo de frasco adequado para conservação e transporte de conteúdos císticos.

Nota: Os produtos conservados em álcool a 50% deverão ser entregues no laboratório preferencialmente nas primeiras 24h após a colheita. Não sendo possível, colocar o frasco no frigorífico.

Gânglio Linfático, Glândulas Salivares e Outras Topografias

Todo o procedimento é semelhante ao procedimento descrito nas biópsias de tireoide, à exceção dos movimentos executados na colheita. Estes movimentos de vaivém devem ser amplos mas **mais lentos** evitando assim hemorragias.

No caso de **biópsias ganglionares** o procedimento deve englobar colheita em lâmina e também o envio de uma suspensão em **TransFix®** (ver ponto 9.2). A amostra em **TransFix®** só será processada após observação em laboratório dos esfregaços, mas previne a necessidade de uma colheita.

Procedimento alternativo em gânglios palpáveis

Estas biópsias também podem ser **efetuadas no LAP**, mediante **marcação** através do número de telefone **+351 223 321 079**.



9.2. Citometria de Fluxo

9.2.1 Amostra citológica:

O exame citológico de gânglio linfático ou de lesão suspeita de processo linfoproliferativo deverá ser sempre complementada pela caracterização imunofenotípica da população linfoide, idealmente por citometria de fluxo.

A colheita para citometria de fluxo deve ser **preferencialmente não aspirativa** com uma agulha de 25G.

Os movimentos de vaivém devem ser executados muito lentamente para minimizar a contaminação por sangue.

Devem ser colhidas **duas amostras**:

- **Colheita 1:** realizar um esfregaço seco ao ar tal como referido no ponto 9.1 e lavar a agulha com o restante material num **tubo eppendorf® contendo 1ml de soro fisiológico e 200µl de TransFix®** (fornecido pelo LAP).
- **Colheita 2:** realizar um esfregaço fixado em álcool a 96º, tal como referido no ponto 9.1 e lavar a agulha com o restante material para o **mesmo tubo eppendorf® contendo 1ml de soro fisiológico e 200µl de TransFix®** (fornecido pelo LAP).

Devem ser evitadas colheitas em vésperas de feriados, sextas-feiras e sábados.

Transporte

O envio destas amostras deve ser articulado com o laboratório, de forma a garantir:

- Que o intervalo entre a colheita e a chegada ao laboratório não exceda as **12 horas**.
- Às **5ª feiras e ante-véspera de feriados** as amostras devem dar entrada no laboratório até às 15h.

A amostra em Transfix deverá ser individualizada e separada das restantes amostras colhidas no local, para que possa ser facilmente identificada ao chegar ao laboratório.

A colheita deve ser mantida à **temperatura ambiente** até à chegada do nosso estafeta.

Nunca congelar estas amostras.

Faturação

A citometria de fluxo pedida para Anatomia Patológica encaixa-se no grupo de exames de imunocitoquímica. A colheita para citometria deverá, portanto, ser acompanhada de



9.2.2 Amostra Histológica:

Em caso de realização de biopsia excisional de gânglio linfático para realização de estudo histológico com exame por citometria de fluxo adicional:

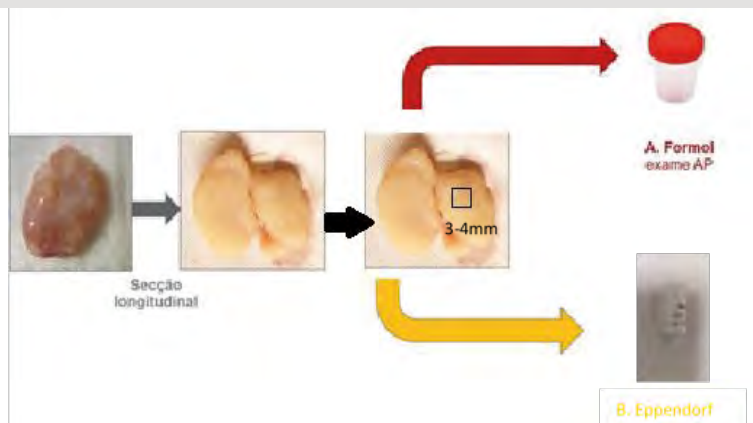
1. Contacto prévio com o laboratório de Anatomia Patológica (LAP) para calendarização do procedimento;
2. Preenchimento de 2 requisições:
 - A. Requisição para estudo anatomo-patológico com informação clínica e laboratorial detalhada;
 - B. Requisição para citometria de fluxo, com o pedido “citometria de fluxo”. Se este não fizer parte da lista de códigos, colocar o pedido “imuno-histoquímica (6 soros)”, acrescentando “citometria de fluxo” de forma manuscrita;
- 3. No momento da realização da exérese do gânglio, seccionar o gânglio linfático longitudinalmente. Selecionar 3-4mm³ do gânglio e colocar num **tubo eppendorf®** contendo 1ml de soro fisiológico e 200µl de TransFix® (fornecido pelo LAP), o restante colocar em formol para estudo anatomo-patológico (ver esquema anexo);

Em resumo, envio de dois recipientes e **duas** requisições:

A – requisição para estudo anatomo-patológico + amostra de gânglio em recipiente com formol;

B – requisição para citometria de fluxo + amostra de 3-4mm³ do gânglio em Transfix, no eppendorf previamente fornecido pelo laboratório;

Enviar para o laboratório o mais breve (intervalo máximo de tempo entre a exérese do gânglio e chegada ao laboratório: 12 horas). Chegada ao laboratório até às 14h (de 2ª a 5ª feira). Nunca enviar à sexta-feira;



9.3 Citologia exfoliativa | Secreções - Escorrência mamilar

1. Identificar o tipo de exame e recolher a informação clínica adequada;
2. **Identificar** as lâminas (nome da utente e nº do exame);
3. Pressionar o mamilo suavemente entre o dedo polegar e o indicador até expulsão de um líquido;
4. Recolher o produto para uma lâmina;
5. Efetuar os esfregaços finos e homogêneos;
6. Lâminas secas ao ar ou em *spray* fixador ou em álcool a 96%;
7. Acondicionar num recipiente adequado.

9.4 Citologia exfoliativa | Secreções - Expetoração

1. Identificar o tipo de exame e recolher a informação clínica adequada;
2. **Identificar** frasco;
3. Antes de fazer a expetoração o doente deve **lavar a boca** pelo menos com água de forma a evitar a presença de alimentos no produto a analisar;
4. Recolher a expetoração para um frasco adequado;
5. Conservar em álcool a 50%.



Figura 21 - Exemplo de frasco adequado para conservação e transporte de expetorações.

Nota: Os produtos conservados em álcool a 50% deverão ser entregues no laboratório preferencialmente nas primeiras 24h após a colheita. Não sendo possível, colocar o frasco no frigorífico.



9.5 Citologia exfoliativa | Líquidos (ascítico, pleural, pericárdico, LCR, lavado brônquico e bronquioloalveolar)

1. Identificar o tipo de exame e recolher a informação clínica adequada;
2. **Identificar** frasco;
3. Recolher o produto para um recipiente adequado;
4. Conservar em álcool a 50%.



Figura 22 - Exemplo de frasco adequado para conservação e transporte de líquidos ascíticos, pleurais etc.

Nota: Os produtos conservados em álcool a 50% deverão ser entregues no laboratório preferencialmente nas primeiras 24h após a colheita. Não sendo possível, colocar o frasco no frigorífico.

9.6 Citologia exfoliativa | Líquido das cavidades serosas - Urina

1. Identificar o tipo de exame e recolher a informação clínica adequada;
2. **Identificar** frasco;
3. **Não** deve ser utilizada a **primeira urina** da manhã. O doente deve **beber cerca de 1L** de água antes de efetuar o exame;
4. Colher a urina para um frasco adequado, garantindo que a amostra tem cerca de 30mL (metade da capacidade do frasco de urina ocasional);
5. Adicionar 30mL de álcool a 50% (perfazendo a capacidade total do frasco de urina ocasional).





Figura 23 - Exemplo de frasco adequado para conservação e transporte de urinas.

Nota: Os produtos conservados em álcool a 50% deverão ser entregues no laboratório preferencialmente nas primeiras 24h após a colheita. Não sendo possível, colocar o frasco no frigorífico.

9.7 Citologia de escovado | Escovado brônquico

1. Identificar o tipo de exame e recolher a informação clínica adequada;
2. O produto do escovado pode ser recolhido para uma lâmina efetuando esfregaços finos e homogêneos.
3. Fixar 2 lâminas em álcool 96º e 2 lâminas secas ao ar (podem ser fixadas com spray mas deve ser mencionada na requisição o método de fixação escolhido);
4. **Preferencialmente** o material deve ser fixado em **Cytolyt®**. Deverá ser feita a lavagem da agulha e a libertação do material neste reagente por ser o mais adequado para a fixação deste tipo de material.

9.8 Citologia de escovado | Escovado das vias biliares

1. Identificar o tipo de exame e recolher a informação clínica adequada;
2. O produto do escovado pode ser recolhido para uma lâmina efetuando esfregaços finos e homogêneos.
3. Fixar 2 lâminas em álcool 96º e 2 lâminas secas ao ar (podem ser fixadas com spray mas deve ser mencionada na requisição o método de fixação escolhido);
4. **Preferencialmente** o material deve ser fixado em **Cytolyt®**. Deverá ser feita a lavagem da agulha e a libertação do material neste reagente por ser o mais adequado para a fixação deste tipo de material.



9.9 Biologia Molecular na Citologia não Ginecológica

Na área de Biologia Molecular do LAP são efetuados os seguintes testes/pesquisas em amostras de citologia não ginecológica:

- **MTB /RIF (*Mycobacterium tuberculosis* e sensibilidade à rifampicina)** - pesquisa a presença de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* complex, causador da tuberculose. Permite também avaliar a resistência ao antibiótico rifampicina. O teste é automatizado e utiliza a tecnologia PCR, em equipamento automatizado. Em Dezembro de 2010, a Organização Mundial de Saúde (OMS) elegeu o Xpert MTB/RIF utilização em países com tuberculose endémica e como uma pedra basilar no combate global à tuberculose.
- **CMV** - A tecnologia PCR em tempo real, utilizada pelo LAP, permite detetar este agente com bastante sensibilidade.

O conteúdo líquido deverá ser adicionado a um frasco de meio líquido ThinPrep® (semelhante aos utilizados na Ginecologia).

O meio líquido ThinPrep® é estável à temperatura ambiente, conservando os ácidos nucleicos durante pelo menos 90 dias



10. Histológicos

10.1 Biópsias e Peças Operatórias

1. Identificação do (s) produto (s) enviados (identificação da natureza da peça ou produto a analisar). Sempre que, do mesmo doente, sejam enviados simultaneamente, duas ou mais peças ou produtos, a estes deverá ser feita referência própria na respetiva requisição e nos recipientes onde vêm contidos);
 - a. Informação clínica relevante e completa com hipóteses de diagnóstico clínico
 - b. **Identificar** frasco (se mais do que um recipiente do mesmo doente, identificar cada frasco com informação do local da colheita, de acordo com as referências contidas na requisição
2. Colocar o produto num recipiente adequado;
3. Conservar em **formol tamponado a 10%** até cobrir na totalidade a biópsia ou peça operatória de pequenas dimensões;
4. Peças operatórias de grandes dimensões ou do foro oncológico deverão ser enviadas para o laboratório num curto intervalo de tempo após cirurgia, de forma a minimizar o tempo de isquémia fria até à preparação da peça e garantir uma fixação adequada dos tecidos.
5. Uma fixação adequada dos tecidos é crucial na avaliação morfológica das lesões, na qualidade dos resultados de técnicas adicionais (imunohistoquímica biologia molecular) para um diagnóstico preciso e completo. Um tecido mal fixado prejudica o estudo histopatológico por má preservação celular e pode mesmo impossibilitar o diagnóstico, com as inerentes consequências nefastas para o doente.



Figura 24 - Frasco de 20ml adequado para o acondicionamento e transporte de biópsias.





Figura 25 - Recipiente para acondicionamento e transporte de peças operatórias. Diversos tamanhos estão disponíveis para se adequar ao tamanho da peça em questão.

10.2 Biologia Molecular na Histologia

Para permitir a posterior realização de exames complementares baseados em técnicas de **Biologia Molecular** e **Imunocitoquímica** devem ser observados os seguintes pressupostos:

- a fixação da biópsia/peça deve ser feita em **formol tamponado a 10%**
- caso seja utilizado o tecido a fresco deve proceder-se à extração do DNA e/ou processamento histológico no prazo de 24h (temperatura ambiente);
- no caso de ter sido executado processamento histológico, o bloco ou cortes de parafina podem ser enviados à temperatura ambiente.

É possível no LAP fazer a pesquisa de HPV (**genotipagem total**) em blocos de parafina.

É também possível fazer pesquisa de **EGFR** detetando 29 das mais comuns mutações somáticas no gene EGFR. A tecnologia utilizada permite deteção de 1% de DNA mutante num *background* de 99% de DNA normal numa amostra de 10ng de DNA, enquanto assegura que os falsos negativos são minimizados. É um teste de PCR em tempo real com elevada sensibilidade, e pode ser utilizado em amostras a fresco, congeladas, bloco de parafina, ou na ausência do tecido tumoral sangue periférico (plasma ou soro), pois está demonstrado que existe DNA livre de células tumorais no sangue periférico.



10.3 Biópsia de rim para execução de Imunofluorescência e Microscopia eletrónica

Em caso de realização de biópsia renal para realização de estudo histológico com exame complementar de imunofluorescência e microscopia eletrónica deverá ter-se em consideração o seguinte procedimento:

1. Ao efetuar-se a biópsia renal devem-se colher três amostras:
 - a. 1 amostra para estudo anatomopatológico – recipiente com formol a 10%
 - b. 1 amostra para imunofluorescência – Recipiente com meio de Michel
 - c. 1 amostra para microscopia eletrónica (se solicitado) – recipiente com gluteraldeído
2. Após a colheita os frascos (formol e meio de Mitchell) devem ser acondicionados juntamente com a requisição à temperatura ambiente e terão de seguir diretamente para o laboratório do Porto o mais rápido possível;

11. Autópsia Fetal e Exame Patológico do Aborto Precoce e da Placenta

Amostras de Aborto Precoce (11s+^{6d}), Placentas e Fetos do 2º e 3º Trimestre (≥12semanas)

A garantia da qualidade dos produtos a analisar depende do tempo que decorre entre a expulsão da amostra, do seu manuseamento na necessidade de colheitas adicionais, da conservação e da fixação (ver ponto 10 acima).

O estudo patológico da placenta fornece informações macroscópicas e e microscópicas relevantes para o desenvolvimento fetal. É um dos exames mais importantes na compreensão dos processos de doença e estabelecimento da causa em situações clínicas concretas e em particular na morte fetal (MF) inexplicada.

A exame pós-morte (autópsia) sendo um dos exames mais importantes no estabelecimento da causa de morte, se ocorre depois das 22 semanas carece de uma explicação ao casal por forma a obter o seu consentimento livre e esclarecido.

Há um consenso que o exame pós-morte, o exame histológico da placenta e exame genético representam as 3 investigações mais informativas na MF.



1. **Colheitas específicas nos diferentes tipos de amostras**, idealmente deverão ser efetuadas no bloco operatório garantindo as melhores condições de assepsia e utilização de material estéril.
- 1.1. **Estudos Microbiológicos e Genéticos** (pesquisa de aneuploidias e a-CGH, PCR etc). As amostras devem ser enviadas ao laboratório de Patologia Clínica (microbiologia) e/ou Laboratório de Genética. (Recomendação: Ver capítulos 7 a 10 deste manual).
 - 1.1.1. **Fetos:** Para estudos genéticos preferencialmente devem efetuar-se **colheitas de fragmentos (com 1 a 1,5cc) de tecidos internos** (p.ex., tecidos costal condral ou rótula ou calcâneo; musculo esquelético, rim ou fígado (a pele e o fígado particularmente nos casos com maceração têm uma menor probabilidade de crescimento celular.
 - 1.1.2. **Líquido amniótico:** preferencialmente aquando do diagnóstico da perda (principalmente se parto não eminente) é a colheita com maior taxa de sucesso de cultura (84%) e menor risco de contaminação.
 - 1.1.3. **Placenta:** Preferencialmente fragmentos com 2cc da proximidade da zona de inserção do cordão: Em meio seco (microbiologia) e, em meio de cultura / soro fisiológico com ampicilina (1g/L) (cariótipo e a-CGH) guardado em arca.
 - 1.1.4. **Fibrina subcorial:** Enviar em zaragatoa com meio de cultura.

Tabela 1

Tipo de Amostra	Metodologia	Quantidade	Acondicionamento
Fetos	Colheita de fragmento da região Deltoide, Glúteo ou Calcâneo	1 a 1,5cc	Microbiologia: Em meio seco Genética: Em meio de cultura ou em soro+ampicilina (1g/L)
Líquido amniótico	Amniocentese	≥5ml	Enviado em seringa (preferencialmente) ou em frasco estéril.
Placenta	Colheita fragmento junto da inserção do cordão.	2cc	Microbiologia: Em meio seco Genética: Em meio de cultura ou em soro+ampicilina (1g/L)
Fibrina subcorial	Raspagem	-	Microbiologia: zaragatoa em meio de cultura



2. Estudo Patológico

2.1. Identificação e acondicionamento da amostra

A amostra deve ser corretamente identificada e colocada num contentor rígido de plástico com **formol tamponado a 10%**, assegurando-se que cumpre o tamanho adequado para o volume da amostra, que está bem fechado e se encontra convenientemente vedado e adesivado. É crucial o estudo integrado da unidade feto-placentária particularmente na morte fetal inexplicada (nota).

(Recomendação: Ver boas práticas no capítulo 2 e 3 deste manual).

2.2. Estudos complementares

Deverá haver informação do resultado dos **estudos genéticos e moleculares** para a integração dos achados patológicos que promoverão estudos comparativos incluindo o “reverse genome”. Adicionalmente, para uma melhor interpretação e adequação da metodologia do exame pós-morte fetal, é essencial o envio do **relatório dos estudos complementares** (Tab 1.) porquanto permitem a correlação dos achados pré e pós-natais e melhoram a integração dos achados e diagnóstico patológico.

Tabela 2

Patologia	Estudos (Relatórios) complementares
Sistema Nervoso Central	RM e Neurosonografia
Cardiovascular	Ecocardiograma
Musculoesquelética	Raio-x ¹
Genitourinária	Ecografia
Respiratória	Ecografia

¹Raio-X fetal pós-morte: (incidência frontal e lateral) a realizar no hospital de origem. Recomendável em todas as mortes fetais, **obrigatório** em casos de suspeita e diagnóstico de displasia esquelética.

3. Documentação

Requisição de estudo anátomo-patológico de Autópsia Fetal/Perinatal, Aborto Precoce e Placenta, de preenchimento obrigatório, onde conste a **identificação da utente**, a sinalização do **consentimento livre e esclarecidamente orientado para o estudo**, a **informação clínica** relevante para a integração dos achados patológicos e sempre que justificável nos casos de **morte fetal espontânea ≥22 semanas** a **sinalização de doação ou devolução do corpo**, emissão de CO e guia de transporte. (Tab. 2)

Tabela 3

Tipo de Amostra	Requisição de Estudo	Certificado de Óbito (SICO)	Guia de Transporte	Declaração de Doação ou Devolução
-----------------	----------------------	-----------------------------	--------------------	-----------------------------------



	Sim	-	-	-
Feto <12sem - <22sem	Sim	-	-	-
Feto ≥12sem - <22sem	Sim	-	-	-
Feto ≥22sem – Recém-Nascidos	Sim	Sim	Sim	Sim

4. Transporte

O transporte inter-hospitalar de fetos mortos, independentemente da respetiva idade de gestação, e de recém-nascidos falecidos no período neonatal precoce, para fins de autópsia clínica para precisão de diagnóstico, pode efetuar-se em ambulância ou noutra viatura de hospital. (DL. Nº 411/1988 e DL. Nº 5/2000).

12. Anexo I – lista de lubrificantes

É importante ter consciência que os **lubrificantes** aumentam o risco de **contaminação** e **obscurecimento** da amostra, tanto em esfregaços convencionais como nos meios líquidos. É aconselhado, por isso, o uso de água morna para lubrificar e aquecer o espécúlo.

A Hologic avaliou uma grande variedade de lubrificantes e descobriu que os que contém um ingrediente conhecido por carbomero ou polímero carbopol são os que mais interferem com os meios líquidos de citologia. A Hologic desaconselha o uso de lubrificante pois a maioria deles não tem ingredientes listados.

No entanto, na eventualidade de ser **estritamente necessária** a utilização de lubrificante (por desconforto da paciente ou outras circunstâncias), o lubrificante deve ser aplicado com moderação e deve ter-se cuidado para evitar a ponta do mesmo.

A tabela seguinte lista os nomes dos **lubrificantes hidrossolúveis recomendados** pela Hologic:

KY Jelly® Ky Jelly is a registered trademark of Johnson & Johnson
Surgilube® Surgilube is a registered trademark of E. Fougera & Co.
Astroglide® Astroglide is a registered trademark of Biofilm, Inc.
Crystelle® Crystelle is a registered trademark of Deltex Pharmaceuticals

