

**XI Curso Básico de Doenças Hereditárias do Metabolismo
Hospital Pediátrico Carmona da Mota – CHUC-EPE
Coimbra, 23 a 25 de setembro de 2013**

**Condições e tipos de colheitas,
processamento, armazenamento e transporte
de produtos biológicos. Colheitas SOS**

Ana Marcão

Tipos de amostras para estudos metabólicos

Sangue

Urina

Biópsia
muscular

Biópsia hepática

LCR

Biópsia
de pele

Líquido
Amniótico

Vilosidades
Coriônicas

Humor
vítreo

Bílis

Colheitas de sangue

Tubo com anticoagulante

Tubo Seco

Tubo com ac. Perclórico (1 mL)

Tubo com estabilizador de RNA

Papel filtro

Heparina de lítio

Fluoreto de EDTA

**Citrato de K/Na
(estudos moleculares)**

Sangue em heparina de lítio

Plasma:

Amónia (1 mL, separar de imediato, analisar 2-4h após a colheita)

Aminoácidos (2 mL)

Pesquisa 7-dehidrocolesterol (1 mL)

Homocisteína total (2 mL, separar de imediato)

Sangue total:

Teste de Beutler (atividade GALT, semi-quantitativo. Mais estável em sangue em papel de filtro)

Cistina intraleucocitária (mínimo 10 mL, juntar Citrato de Dextrose Ácida ou utilizar tubo com CPDA)

Estudos moleculares

Sangue em Fluoreto de EDTA

Plasma:

Lactato (0.5 – 1 mL)

Sangue total:

Estudos moleculares (2 - 5 mL)

Sangue em tubo seco

Soro:

Biotinidase (quantitativo), (1 mL, centrifugar de imediato)

Carnitina livre e total (2 mL)

Transferrina deficiente em carboidratos (CDT), (2 mL)

Focagem isoelétrica da transferrina (2 mL)

Pesquisa 7-deidrocolesterol (1 mL)

Cromatografia de esteróis (1 mL)

Sangue em tubo com ac. Perclórico (1mL, 1N)

Piruvato

Colher 1 mL de sangue para tubo com 1 mL de ac. Perclórico (tubo fornecido pelo laboratório)

**Agitar vigorosamente e congelar de imediato.
Analisar até 24h após a colheita.**

Sangue em papel de filtro (cartão de Guthrie)

Perfil de acilcarnitinas

Atividade da biotinidase (qualitativo)

Carnitina livre

Galactose Total

Tripsina Imuno-reativa (IRT) e Proteína associada à pancreatite (PAP)

17-alfa-hidroxiprogesterona

Teste de Beutler (atividade GALT, semi-quantitativo)

Doseamento da succinilacetona

Quantificação de TSH e T4 total

Quantificação de aminoácidos individuais (Phe, Met, Cit, Arg)

Quantificação do ác. argininosuccínico

Estudos moleculares (estudo familiar, pesquisa de mutação mais frequente)

Sangue em papel de filtro (cartão de Guthrie)

**Devem preencher-se bem, pelo menos 2 círculos.
O papel de filtro deve ficar bem impregnado dos 2 lados.**

Se usar uma ficha do diagnóstico precoce deve assinalar de forma bem visível na ficha que não é para efetuar rastreio neonatal.

Urina

**1ª micção da
manhã**

**Urina de
24h**

1ª micção da manhã

Ac. Orgânicos

Ac. Orótico (HPLC e GC-MS)

Ac. Vanil-lático

Pesquisa de substâncias redutoras (Clinitest)

Cromatografia de açúcares redutores (placa)

Carnitina livre/ total

Succinilacetona

Sulfiteste

Teste de Bratton-Marshall, qualitativo (défice em adenilossuccinase)

HVA e 5-HIAA (HPLC, preferencial LCR. Urina sem aditivos)

Pterinas (abrigar da luz)*

Urina de 24h

Ac. Oxálico (recipiente com 5 mL de HCl)

Ac. Vanilmandélico (recipiente com 5 mL de HCl)

Hidroxirolina livre/ total (recipiente com 10 mL HCL)

1ª micção da manhã ou urina 24h

Aminoácidos (inclui ac. delta – aminolevulínico)

Lactato

Ac. Guanidinoacético (GAA) e creatina (sem aditivos)

Ac. Homogentísico (abrigar da luz)

Pesquisa de corpos cetónicos (preferencial urina de crise)

LCR

Aminoácidos (0.5mL)

Lactato (0.5mL)

Piruvato (0.25mL)

Neurotransmissores (1 mL)

(ac. homovanílico - HVA, ac. 5-hidroxiindolacético - 5-HIAA)

Folatos

Pterinas*

Ácidos orgânicos (acidúrias orgânicas cerebrais)

Protocolo de colheita de LCR para neurotransmissores e pterinas

1º tubo	1,5 ml (±15 gotas)	Neurotransmissores
2º tubo	1 ml (±10 gotas)	Pterinas + Folatos
3º tubo	≥ 3 ml (±30 gotas)	Lactato, piruvato e aminoácidos
4º tubo		Congelar para estudos futuros

0-2 anos

1º tubo	1 ml (±10 gotas)	Citoquímica
2º tubo	3 ml (±30 gotas)	Lactato, piruvato e aminoácidos
3º tubo	1 ml (±10 gotas)	Pterinas + Folatos
4º tubo	1,5 ml (±15 gotas)	Neurotransmissores
5º tubo		Congelar para estudos futuros

2-12 anos

1º tubo	1 ml (±10 gotas)	Citoquímica
2º tubo	5 ml (±50 gotas)	Lactato, piruvato e aminoácidos
3º tubo	2 ml (±20 gotas)	Pterinas + Folatos
4º tubo	1,5 ml (±15 gotas)	Neurotransmissores
5º tubo		Congelar para estudos futuros

>12 anos

Líquido amniótico

DPN por análise de cromatografia de aminoácidos (1mL, sobrenadante)

DPN de SLO (Síndrome de Smith- Lemli- Opitz), (4mL)

DPNs moleculares (1mL para extração direta de DNA, 15mL para cultura de amniócitos)

DPNs moleculares exigem sempre a caracterização prévia do caso index, com confirmação nos progenitores, e DNA materno para exclusão de contaminação materna.

Vilosidades Coriônicas

DPNs moleculares (extração de DNA direta ou após cultura celular)

DPNs moleculares exigem sempre a caracterização prévia do caso index, com confirmação nos progenitores, e DNA materno para exclusão de contaminação materna.

Biópsia muscular

Cadeia respiratória mitocondrial (estudo enzimático), (40-80 mg)

Cadeia respiratória mitocondrial (estudo molecular*), (15-20 mg)

*O músculo é a única amostra a utilizar para estudar deleções mtDNA e análise de mtDNA total, Síndromes de depleção podem ser estudada em fibroblastos, algumas CRM podem ser estudadas em sangue, inclui todas as de origem nuclear.

Biópsia de Pele

Estudos moleculares (pós-cultura)

Cadeia respiratória mitocondrial (estudo enzimático – condicionado, não é possível efetuar o estudo do complexo I)

Preparação do doente

Jejum de 8h para estudos bioquímicos (3h para os lactentes), se forem efetuados tempos de jejum diferentes (curtos ou muito longos) o laboratório deve ser informado. Colheita de sangue para estudos moleculares não exige jejum

Se o doente estiver a fazer medicação, o laboratório deve ser informado.

Sempre que possível a medicação deve ser suspensa (ex. valproato interfere nos ac. orgânicos, L-DOPA interfere no estudo dos neurotransmissores)

Preparação do doente

As perfusões de soro devem ser suspensas pelo menos 3h antes da colheita (especialmente importante para o doseamento do lactato).

No caso de o doente ter sido submetido a uma transfusão de glóbulos, o doseamento da atividade das enzimas eritrocitárias só pode ser efetuado após 90 dias (ex. Teste de Beutler).

No caso de o doente ter sido submetido a uma transfusão de plasma, o doseamento dos metabolitos plasmáticos só pode ser efetuado após 3 dias.

Transporte, acondicionamento e processamento no local de colheita

Todas as amostras devem ser transportadas com grau de confinamento adequado a produtos biológicos e em recipientes/ embalagens adequados, que permitam efetuar o transporte das amostras à T.a., refrigeradas ou congeladas, de acordo com a indicação para cada caso.

Os recipientes de transporte devem ter bem visível a indicação de que contêm produtos com risco biológico.

Transporte, acondicionamento e processamento no local de colheita

Amostras de sangue

Se demorarem mais de 3-4h a chegar ao laboratório, os sangues devem ser centrifugados (10min, 3000rpm, centrifuga refrigerada). Nunca congelar sangue total.

Após separação, os plasmas/ soro devem ser refrigerados ou congelados (>24h). Devem ser enviados os tubos primários para confirmação dos anticoagulantes e eventual realização de outros estudos. Todos os tubos devem estar perfeitamente identificados.

O anticoagulante a utilizar depende da análise a efectuar (solicitar manual de colheitas do laboratório, contactar o laboratório em caso de dúvida).

Os sangues para estudos moleculares não devem ser separados e devem ser preferencialmente enviados à temperatura ambiente (após separação é possível extrair DNA a partir do buffy coat, exceto se os tubos contiverem géis ou microesferas).

Transporte, acondicionamento e processamento no local de colheita

Amostras de sangue em papel de filtro

Devem ser bem preenchidos 2 círculos de sangue, tendo o cuidado de verificar que o papel de filtro fica impregnado de sangue dos 2 lados.

Deixar secar, longe de fontes diretas de calor, e enviar para o laboratório em envelope de papel. Não utilizar invólucro de plástico ou papel de alumínio.

Não utilizar sangue com anticoagulantes.

Não utilizar anestésicos locais.

Transporte, acondicionamento e processamento no local de colheita

Amostras de urina

As urinas devem ser enviadas refrigeradas ou congeladas (>24h).

As urinas de 24h devem manter-se refrigeradas durante o período de colheita e devem ser colhidas para recipientes com conservante (HCl concentrado 5-10 mL).

As urinas para análise das pterinas e do ac. homogentísico devem ser protegidas da luz.

Transporte, acondicionamento e processamento no local de colheita

Amostras de LCR

Colher entre as 8:30 e 10h da manhã, várias frações em tubo seco. Congelar imediatamente após a colheita. No caso de punção traumática centrifugar de imediato as amostras e só depois congelar. É muito importante evitar a hemólise.

As várias frações devem ser bem identificadas. O volume de cada fração depende da idade do doente; solicitar protocolo ao laboratório.

Os folatos e as pterinas são sensíveis à luz, pelo que as frações para efetuar estes doseamentos devem ser protegidas da luz.

Transporte, acondicionamento e processamento no local de colheita

Biópsias de pele (para efetuar cultura celular)

Devem ser colhidas em condições estéreis, para tubos com soro fisiológico ou meio de cultura adequado, e devem ser enviadas para o laboratório à temperatura ambiente, o mais rapidamente possível.

Biópsias de músculo ou fígado

Devem ser colhidas para tubo seco e congeladas de imediato em neve carbónica ou azoto líquido. Não devem ser envolvidas em papel de alumínio, nem devem ser adicionados conservantes.

Transporte, acondicionamento e processamento no local de colheita

Líquido amniótico (para efetuar cultura celular)

Devem ser colhidos em condições estéreis, e devem ser enviadas para o laboratório à temperatura ambiente, o mais rapidamente possível.

Vilosidades coriônicas (para efetuar cultura celular)

Devem ser colhidas em condições estéreis e enviadas em meio de transporte adequado (com antibiótico, antifúngico e soro vitelo fetal) ou líquido amniótico.

Provas de sobrecarga

Doseamento de lactato e piruvato pós-prandial ou com sobrecarga de glicose (2g/Kg, max. 50g)

Efetuar a colheita 1h após a refeição

Doseamento de amónia pós-prandial ou com sobrecarga de proteínas (1-2g/Kg)

Efetuar a colheita 2h após a refeição

Doseamento de lactato e piruvato após exercício

Efetuar a colheita após o doente ter realizado exercício físico em condições standard

(equivalente à sobrecarga de glicose realizada nas crianças)

Provas de sobrecarga

Outras provas de sobrecarga

Met, Phe, Ile, Alopurinol (substitui sobrecarga de proteínas)

Contactar o laboratório para solicitar protocolos

Análises que exigem contacto prévio do laboratório

Diagnóstico pré-natal (molecular ou bioquímico)

Doseamento de cistina intra-leucocitária

- A amostra deve chegar ao laboratório durante a manhã, preferencialmente colher no laboratório
- Os tubos com CPDA podem ser solicitados ao laboratório, deve ser sempre agendado o dia da colheita.

Provas de sobrecarga para confirmar protocolo

Estudos de RNA (solicitar tubos com estabilizador de RNA)

Colheitas SOS (descompensação metabólica grave, sem diagnóstico de DHM estabelecido)

- **Dosear amónia e fazer cromatografia de aminoácidos (sangue em tubo com heparina de Li)**
- **Dosear lactato (sangue em tubo com fluoreto de EDTA ou separação imediata do plasma)**
- **Fazer perfil de ac. orgânicos (urina)**
- **Fazer perfil de acilcarnitinas (sangue em papel de filtro)**

Colheitas numa situação de morte iminente ou *pós-morte* (suspeita de DHM)

- **Sangue para separação de soro e plasma: separados e congelados de imediato**
- **Urina: congelar de imediato**
- **Sangue total em papel de filtro para perfil de acilcarnitinas (bílis e urina)**
- **Sangue total em EDTA para estudos moleculares**
- **Biópsia de pele (até 24h pós-morte)**
- **Biópsia de músculo / coração (até 8h pós-morte)**
- **Biópsia hepática**
- **LCR**
- **Humor vítreo**

Colheitas numa situação de morte iminente ou pós-morte (suspeita de DHM)

O processo de autólise que ocorre com a morte do doente origina muitas alterações nos metabolitos plasmáticos, tornando difícil a interpretação dos resultados das colheitas *pós-mortem*.

Sempre que possível, as colheitas devem ser efetuadas antes da morte ocorrer, ou imediatamente após.