

# **CONDIÇÕES E TIPOS DE COLHEITAS, PROCESSAMENTO, ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE DE PRODUTOS BIOLÓGICOS, COLHEITAS SOS**

**Patrícia Cardoso**

**S. Centro de Desenvolvimento da Criança  
Hospital Pediátrico – CHUC**

Coimbra, 23 de Setembro de 2015

# DIAGNÓSTICO CLINICO-LABORATORIAL

## Condições das Colheitas



# Condições das Colheitas

- Jejum / pós-prandial
  - Valor diagnóstico: Ser < (JJ), Ala > (pp)
  - Tabelas de referência (JJ)
- Sem / com garrote; amostra hemolisada
  - Falsos + amónia e lactato
- Processamento imediato
  - $\leq 2\text{h}$ , devendo ser conservado no frio até ser processado
  - Falsos + amónia e lactato
- Em gelo/congeladas/temp. ambiente
  - Particularidades de cada teste



# Condições das Colheitas

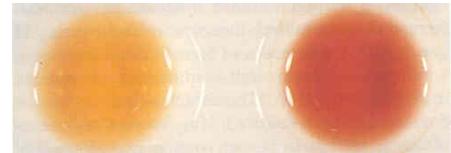
- Exames de urina à cabeceira do doente (simples, importantes na suspeita de diagnóstico, rápida deterioração da amostra)

- Combur® (CC, G, P, Du, GV)
- DNPH ( $\alpha$ -cetoácidos) ex: leucinose
- Sulfiteste (sulfitos e s-sulfocisteína) ex: déf. cofator molibdénio
- Açúcares redutores (glicose, galactose, frutose)



# Condições das Colheitas

- Teste da porfiria (alteração cor urina com luz solar)
  - Teste do nitroprussiato (AA com grupo sulfidril)
- Amostra : 1<sup>a</sup> micção (+ concentrada, -20ºC, de eleição); outra
  - Urina 24h (GAGs, Oligossacáridos, oxalato, ác. vanilmandélico)



# DNPH e Corpos Cetónicos

DNPH	Acetest	Positive compound	Disorder – source
+	-	Phenylpyruvic acid	Classical PKU
+	-	2-Oxoisocaproic acid	MSUD
+	-	2-Oxo-3-methylvaleric acid	Idem
(+)	-	Imidazolepyruvic acid	Histidinemia
<u>+</u>	<u>+</u>	Acetone	3-Oxothiolase def./ ketosis/SCOT deficiency
-	+	2-Methylacetoacetate	Propionic/MMA academia
		Idem	3-oxothiolase deficiency
-	+	Butanone	Idem
		Acetoacetate	SCOT deficiency, ketosis
+	-	p-Hydroxyphenylpyruvic acid	Liver disease, tyrosinemia types 1 and 2
+	-	2-Oxobutyric acid	Methionine malabsorption
<u>+</u>	<u>+</u>	Pyruvate	Lactic acidosis

+ precipitate formed, - no detectable reaction

# Teste de Nitroprussiato

Positive compound	Disorder – source
Cystine	Cystinuria
Arginine	Hyperargininemia
Cystine	Generalized aminoaciduria
Cystine	Fanconi syndrome
3-Mercaptolactatecysteine-disulfide	3-Mercaptolactatecysteine-disulfiduria
Homocysteine, mixed disulfide	Homocystinuria
Idem	B 12 def. and cobalamin C, D, E, G
Idem	Methylenetetrahydrofolate reductase def.
Idem	Cystathioninuria (bacterial formation of Hcy)
Glutathione	Glutathionuria
<u>Ketones + high creatinine</u>	Dehydration

# Substâncias Redutoras

Compound	Disorder – source
Galactose	Galactosemia Galactokinase def. Fanconi-Bickel; Wilson disease
Fructose	Fructose intolerance Essential fructosuria
p-Hydroxyphenylpyruvic acid	Tyrosinemia types 1 and 2
Homogentisic acid	Alkaptonuria
Xylose	Pentosuria
<u>Glucose</u>	Diabetes mellitus Renal Fanconi syndrome, cystinosis, etc.
Oxalic acid	Hyperoxaluria
Salicylates	Drug treatment
Uric acid	Hyperuricosuria
Hippuric acid	Treatment with sodium benzoate/severe malabsorption
Ascorbic acid	Excessive vitamin use

# Abordagem Inicial – Investigação de Emergência



**Table 7.2.** Initial laboratory investigation of suspected inherited metabolic disease presenting in the newborn period

Blood

Hemoglobin, white blood count, platelets  
Blood gases and plasma electrolytes (calculate anion gap)  
Glucose  
Ammonium  
Lactate  
Calcium and magnesium  
Liver function tests, including albumin and prothrombin and partial thromboplastin times

**PERÍODO  
NEONATAL**

QUANTITATIVE Amino acid analysis

Carnitine, total and free  
Galactosemia screening test  
Blood or plasma acylcarnitine analysis (tandem MS–MS)  
Plasma for storage at – 20°C: 2–5 ml

Urine

Ketones (Ames Acetest)  
Reducing substances (Ames Clinitest)  
Ketoacids (DNPH)  
Sulfites (Merck Sulfitest)  
Organic acids (GC–MS)  
Urine for storage at – 20°C: 10–20 ml

**Rastreio NN**

Abbreviations: DNPH, dinitrophenylhydrazine; GC–MS, gas–chromatography-mass spectrometry; tandem MS–MS, tandem mass spectrometry–mass spectrometry (see Chapter 9).

# Testes Funcionais



# Testes Funcionais

- Investigação dinâmica baseada na quantificação de metabolitos intermediários – útil nos défices energéticos / intoxicações
- O melhor teste funcional é o dado pelas circunstâncias naturais durante o stress metabólico – “crise”
- Perante uma suspeita devem ser colhidos fluidos biológicos “em bloco” (sangue, urina e LCR)  
→ investigação imediata ou reserva
- Se risco eminente de morte → programação colheitas SOS

# Testes Funcionais

- Reservados para clarificar situações mal esclarecidas ou provocar situações de stress para obter **perfis metabólicos**
- Exigem **protocolos bem definidos** para melhor interpretação e minimização de riscos
- Em **meio hospitalar** dado o risco de descompensação metabólica
- Alguns em desuso → análises mais simples e diretas (ex: DNA) reduzem seu valor diagnóstico

# Testes Funcionais

- Perfil metabólico das 24h
- Prova de jejum
- Prova da BH4 (tetrahidrobiopterina)

# Perfil Metabólico das 24h

## Indicações:

- Episódio agudo ou recorrente prévio suspeito de défice energético/ intoxicação (hipoglicemia, hiperlactacidemia, hiper/ hipocetose, hiperamoniémia...)

## Procedimento:

- Colheitas seriadas de cateter periférico com SF iv, antes e 1 h após refeições e de madrugada
- Idealmente associada a monitorização continua da glicose nas hipoglicemias
- Tipo de análises pode ser adaptado ex: ciclo de amoniémia

Realizar antes de testes de provação →  
risco de descompensação metabólica

# Perfil Metabólico das 24h

Table 4.3. Assessment of intermediary metabolism over the course of the day

Parameters in blood	Breakfast		Lunch		Dinner		Night
	Before	1 h after	Before	1 h after	Before	1 h after	04 h
Glucose <sup>1</sup>	X	X	X	X	X	X	X
Acid-base	X	X					
Lactate <sup>2</sup>	X	X	X	X	X	X	X
Pyruvate <sup>2</sup>	X	X	X	X	X	X	X
Free fatty acids	X	X	X	X	X	X	X
Ketone bodies	X	X	X	X	X	X	X
Ammonia	X	X	X	X	X	X	X
Amino acids	X						
Carnitine	X						
Acylcarnitines	X						
Hormones <sup>3</sup>	X	X	X	X	X	X	X
Urine 24 h collection <sup>4</sup>	Amino acids, organic acids, ketone bodies, urea, creatinine						

<sup>1</sup>Glucose should be determined immediately. <sup>2</sup>Immediate deproteinisation (with perchloric acid) at the bedside is the only way of ensuring that the results for calculating redox potential ratios can be accurately interpreted. <sup>3</sup>Hormones (insulin, cortisol, growth hormone) are useful in the investigation of hypoglycaemia. <sup>4</sup>Urine samples are collected both overnight and during the day and should be frozen immediately

# Perfil Metabólico das 24h

- **Hiperinsulinismo:**

Insulina >3 mU/L + glicose < 2,8 mmol/L + AGL < 0,6 mmol/L

- Lactato (JJ):  $\downarrow$  PDH,  $\uparrow$  GSD tipo I, sempre  $\uparrow$  CRM
- Corpos cetónicos:  $\uparrow$  paradoxal após refeição CRM
  - $\uparrow$  AGL/CC nos défices da b-OAG
  - $\downarrow$  AGL/CC nos défices cetólise
- Estado redox citoplasma (L/P)  $\uparrow$  CRM, N/ $\downarrow$ PDH
- Estado redox mitocondrial (3-OHB/AcAc)  $\uparrow$  CRM, N PDH

# Prova de Jejum

- Indicações:
  - Esclarecimento de episódio(s) de hipoglicémia (doenças da neoglicogénese, b-OAG, cetogénesis, cetólise e endocrinopatias)
- Preparação:
  - Alimentação adequada nos 3 dias prévios
  - Isenção de doença aguda na semana anterior
  - Conhecimento e normalidade de estudo redox, amónia, gasimetria, ácidos orgânicos, aminoácidos e carnitina/ acilcarnitinas
  - Cateter venoso com SF iv, colocado na hora 0

# Prova de Jejum

- Procedimento:

- O tempo de JJ depende da idade:
  - 12 h < 6 meses
  - 20 h dos 6-12 meses
  - 24 h > 12 meses
- Ingestão livre de água simples
- A urina é refrigerada e no final guardada a -70 °C
- O teste pára após as colheitas se:
  - surgir hipoglicémia ( $G<2,6 \text{ mmol/L}$ )
  - acidose ( $\text{HCO}_3^- < 15 \text{ mmol/L}$ )
  - sintomas neurológicos

# Prova de Jejum

■ Table 4.5. Fasting test flow sheet. The duration of the test is adapted to the age of the patient or is determined by the length of time for the onset of spontaneous symptoms (► text). A complete sample is taken at the end of the fast if the test is stopped after less than 24 h

Time (h)	0	8	12	16	20	24
Blood						
Glucose	+	+	+	+	+	+
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	+	+	+	+	+	+
Lactate	+	+	+	+	+	+
3-Hydroxybutyrate	+	+	+		+	+
FFA	+	+	+	+	+	+
Carnitine	+		+		+	+
Acylcarnitines	+	+	+	+	+	+
Amino acids	+		+		+	+
Insulin	+		+		+	+
Cortisol	+					+
ACTH	+					+
Growth hormone	+					+
Urine	0-8			16-24		
Organic acids	+			+		

ACTH, adrenocorticotropic hormone; FFA, free fatty acids

# Prova de Jejum

- Sangue
  - **Hiperinsulinismo:** G <2,8 mmol/L, Insulina >3 mU/L, AGL <0,6 mmol/L, CC ↓
  - **Défice da β-OAG:** G<2,8 mmol/L, AGL ↑, CC ↓, AGL/CC>2 (N<1)
  - **Défice da neoglicogénese:** Lactato>3 mmol/L, G ↓
  - **Defeitos da cetólise:** CC ↑ que ↑↑
  - **Défice de PDH:** ↓ Lactato e Piruvato durante o teste
  - **Défices da CRM e Ciclo de Krebs:** variável

# Prova de Jejum

- Sangue
  - **Insuficiência adrenal:** Cortisol <250 nmol/L, G <2,8mmol/L
  - **Défice hormona de crescimento:** HC < 10 ng/ml
  - **Défice de ACTH:** ACTH < 80 pg/L
- Urina
  - Acidúria dicarboxílica dos **def.  $\beta$ -OAG** (adípico, subérico)
  - Acidúria da **CRM e Ciclo de Krebs** (lactato, málico, fumárico)

# Prova da BH4 (tetrahidrobiopterina)

## Indicações:

- RN [Phe] >N  
rastreio défice  $\text{BH}_4$ , cofator de Phe hidroxilase (1-2% dos casos)

## Procedimento:

- $[\text{Phe}] >120 <400 \text{ mmol/L}$
- $\text{BH}_4$  (20 mg/Kg) seguido de refeição de leite
- T0, T4, T8 (Phe plasma, DHPR papel, pterinas urina)
- Iniciar dieta de restrição em Phe

## Interpretação:

- Défice de  $\text{BH}_4$  (metab. pterinas):  $\downarrow$  Phe
- PKU clássica: não  $\downarrow$  Phe

# Outros Tipos de Exames Complementares



# Tipos de Exames Complementares

- “Química geral”
- Substrato(s) acumulado(s)
- Produto deficitário
- Produto(s) an/ tóxicos
- Doseamento enzimático
- Défice funcional 1º de um orgão ou tecido
- Alt. 2ª da função/ estrutura orgãos/ tecidos
- Alt. genética subjacente

# Laboratório Hospitalar Base

## Sangue

Glicémia, AST, ALT, CK ...

Gasimetria

Na K Cl (hiato aniónico)

Ácido úrico

F. renal (glomerular/ tubular)

Amónia

F. hepática (TGO/P, T Prot. ...)

Hemograma

Lactato e piruvato

Cetonémia (3-hidroxibutirato)

Ácidos gordos livres ...

## Urina

Cor/ cheiro

Sumária (pH...)

Cetonúria

Subst. redutoras

Cetoácidos (DNPH)

Sulfitest

F. renal (glomerular/ tubular)

## Outros

LCR (citoquímica, redox)

...

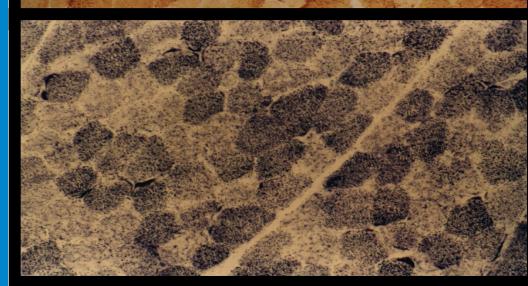
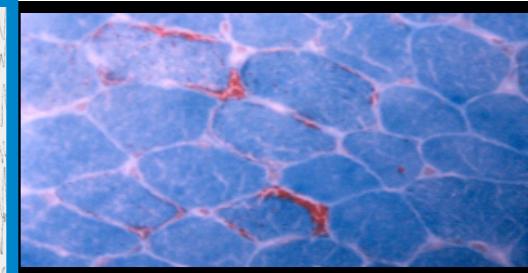
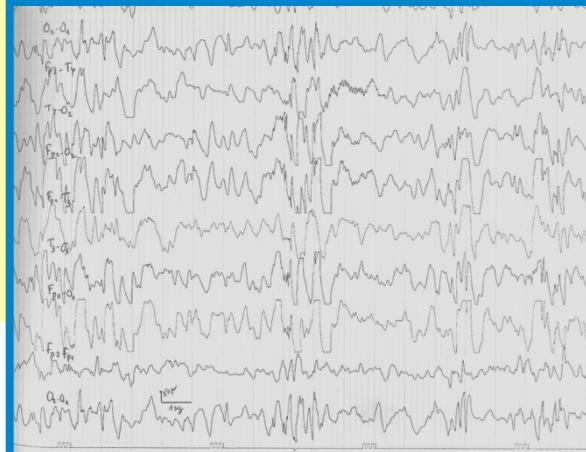
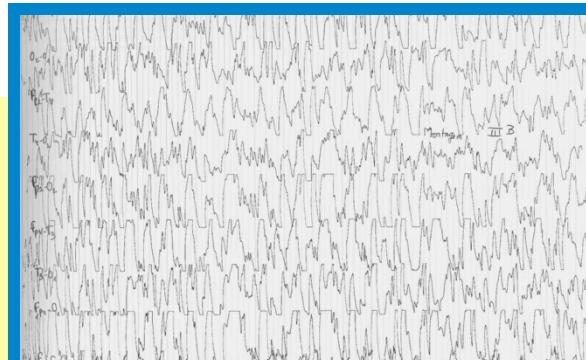
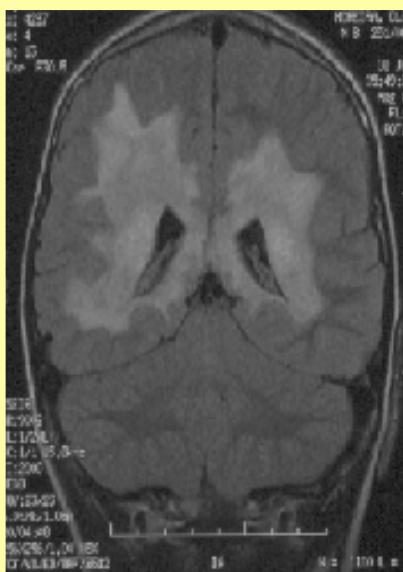
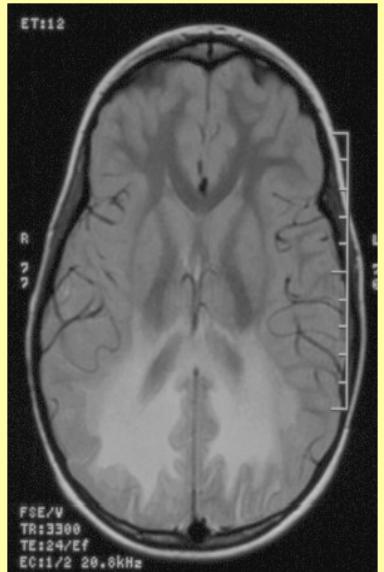


# Outros Exames

Imagiológicos (Rx convencional, TAC, RMN ...)

Electrofisiológicos (ECG, EEG; PEA, PEV...)

Anatomo-patológicos (MO, histoenzimologia, ME...)



# Laboratório “Metabólico”

AA, AO, carnitinas e acilcarnitinas

CDT –transferrina def.em carbohidratos (%; focagem isoelétrica)

GAGs (mucopolissacáridos), oligossacáridos, ác.siálico

Peroxisomas (AGCML, ác. fitânico/ pristânico, ácidos biliares)

Esteróis, Neurotransmissores, Purinas e pirimidinas ...

Enzimas: lisossómicos, da cadeia respiratória mit, ...

Estudos genéticos

Laboratório Nacional de Rastreio NN -INSA – Porto

Centro de Genética Médica J. Magalhães -CHP

Centro de Patogénese Molecular- Fac Farmácia – Lisboa

Centro de Neurociências – Universidade de Coimbra

➔ Centros estrangeiros de referência

# Métodos Laboratoriais

Técnicas mais antigas

Espectrofotometria

Focagem isoeléctrica

HPLC e outras cromatografias

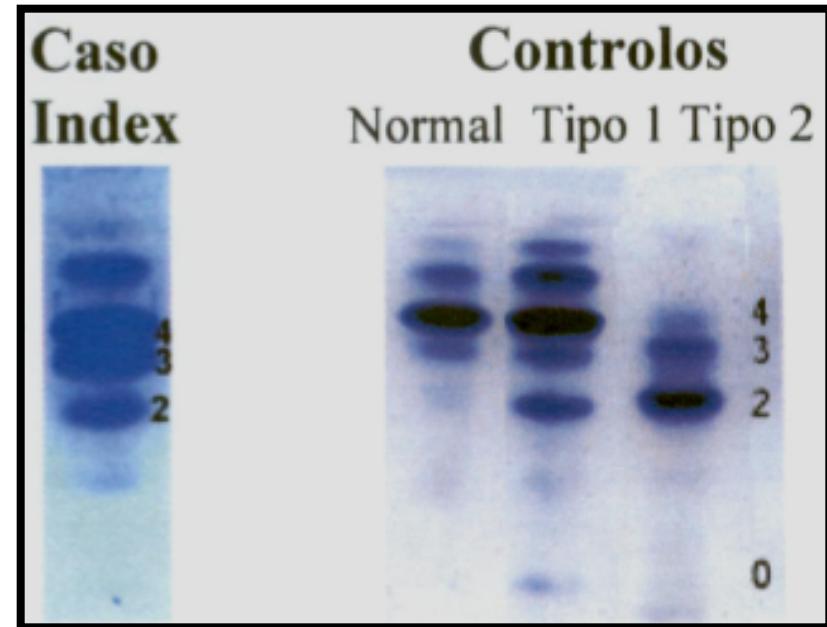
GC/MS

HPLC

...



Focagem isoeléctrica  
da transferrina - CDT



# Métodos Laboratoriais

... e mais recentes

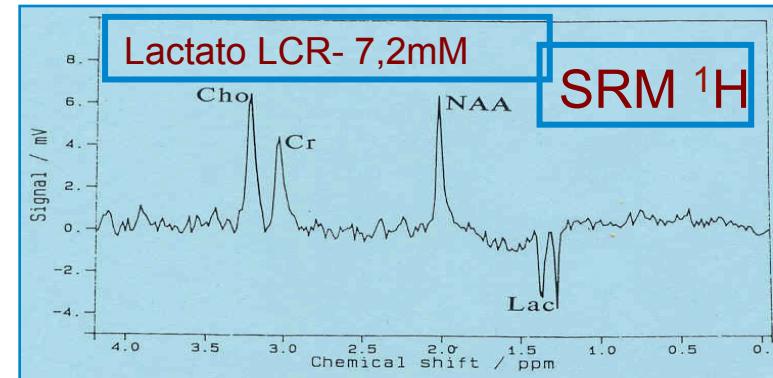
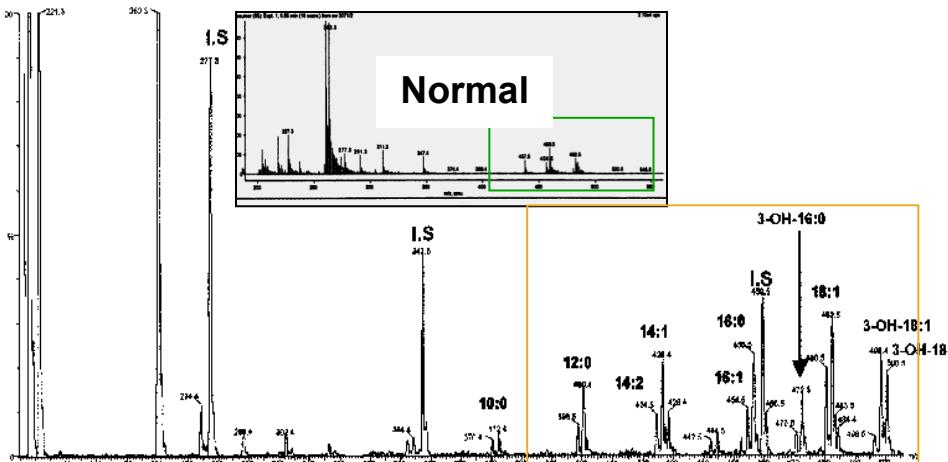
RMN Espectroscópica P / H

Imagen: muscular (P)

encefálica (H)

Protónica dos fluidos orgânicos

*Tandem Mass Spectrometry*



SRM 31P (ATP PCr Pi pHic)  
Músculo (repouso/ exercício)  
SRM 1H  
Cerebral (lesões; gânglios da base)



# Valores de Referência

- Método /Laboratório
- Variação com a faixa etária (ácido úrico, creatinina ...)
- Estudo enzimáticos em tecidos (CRM ...)
- Fatores que afetam a concentração dos AA
  - Idade
  - Variações fisiológicas (ritmo circadiano, prematuridade, gravidez, exercício prolongado..)
  - Estado nutricional
  - Patologia associada (infeção, hiperinsulinismo)
  - Medicação (VPA, antibióticos)

# Plasma

Amino acid	Men (n=50) <sup>a</sup>	Women (n=15) <sup>a</sup>	Adolescents (n=80) <sup>b</sup>	Children (n=52) <sup>b</sup>
Taurine	27–95	18–66	2–90	20–120
Aspartic acid	2–9	3–6	3–15	1–17
Threonine	92–180	93–197	102–246	40–204
Serine	89–165	78–166	92–196	70–194
Asparagine	32–92	26–74	34–94	15–83
Glutamic acid	6–62	6–38	17–69	14–78
Glutamine	466–798	340–696	457–857	333–809
Proline	97–297	112–220	58–324 <sup>c</sup>	40–332 <sup>d</sup>
Glycine	147–299	100–384	166–330	107–343
Alanine	146–494	218–474	242–594	120–600
Citrulline	19–47	10–58	19–52 <sup>c</sup>	8–47 <sup>d</sup>
<i>a</i> -Aminobutyrate	15–35	7–35	8–36 <sup>c</sup>	12–43 <sup>d</sup>
Valine	179–335	172–248	155–343	132–480
Cystine	24–54	31–49	36–58 <sup>c</sup>	23–68 <sup>d</sup>
Methionine	13–37	14–30	13–41	3–43
Isoleucine	46–90	39–67	34–106	6–122
Leucine	133–205	98–142	86–206	30–246
Tyrosine	37–77	26–78	35–107	19–119
Phenylalanine	46–74	42–62	34–86	26–98
Ornithine	55–135	36–96	47–195	20–136
Lysine	135–243	119–203	116–276	66–270
Histidine	72–108	68–104	68–108	47–135
Tryptophan	25–65	17–53	–	12–69 <sup>d</sup>
Arginine	28–96	28–108	1–81	12–112

The values represent the mean±2SD

# Urina

Amino acid	0–1 month	1–6 months	6–12 months	1–2 years	2–4 years	4–7 years	7–13 years	Over 13 years
Taurine	8–226	6–89	9–123	12–159	13–200	17–230	18–230	16–180
Aspartic acid	2–12	2–16	3–12	3–10	2–8	2–8	1–10	2–7
Hydroxyproline	20–320	0–143	0–22	0–13	0–13	0–13	0–13	0–13
Threonine	20–138	17–92	14–56	15–62	10–48	9–36	8–28	7–29
Serine	80–282	42–194	50–137	45–124	32–94	38–93	23–69	21–50
Asparagine	0–84	0–58	0–36	0–32	0–30	0–29	0–24	0–23
Glutamic acid	0–30	2–29	0–18	0–11	0–10	0–8	0–9	0–12
Glutamine	52–205	63–229	74–197	62–165	45–236	52–133	20–112	20–76
Proline	21–213	0–130	0–14	0–13	0–9	0–9	0–9	0–9
Glycine	283–1,097	210–743	114–445	110–356	111–326	91–246	64–236	43–173
Alanine	75–244	72–206	36–162	41–130	33–115	27–92	17–65	16–68
Citrulline	0–11	0–10	0–8	0–7	0–6	0–5	0–5	0–4
<i>a</i> -Aminobutyrate	0–9	0–7	0–8	0–8	0–6	0–5	0–5	0–4
Valine	3–26	4–19	6–19	7–21	6–20	3–15	3–17	3–13
Cystine	12–39	7–24	6–15	5–13	4–15	4–11	4–12	3–17
Methionine	7–27	6–22	8–29	7–29	5–21	5–20	3–17	2–16
Isoleucine	0–6	0–5	0–6	0–6	0–5	0–5	0–6	0–4
Leucine	3–25	4–12	4–16	3–17	4–18	3–13	3–16	2–11
Tyrosine	6–55	12–52	11–54	13–48	10–30	9–35	6–26	2–23
Phenylalanine	4–32	7–28	11–28	10–31	7–21	6–26	5–20	2–19
$\beta$ -Aminoisobutyrate	0–87	0–216	0–226	0–206	0–175	0–59	0–85	0–91
Ornithine	0–19	0–13	0–8	0–8	0–7	0–7	0–6	0–5
Lysine	22–171	15–199	13–79	16–69	10–46	10–68	10–56	7–58
Histidine	80–295	72–342	92–278	87–287	68–255	61–216	43–184	26–153
3-Methylhistidine	20–39	19–40	20–47	22–57	20–59	21–61	18–59	19–47
Arginine	0–14	0–11	0–11	0–8	0–9	0–7	0–6	0–5

Modified from Parvy et al. (1988)

Amino acid	Men (n=50) <sup>a</sup> Range ( $\pm 2SD$ )	Women (n=15) <sup>a</sup> Range ( $\pm 2SD$ )	Children 3–18 yr (n=50) <sup>b</sup> Range ( $\pm 2SD$ )	Infants <12 mo (n=12) <sup>b</sup> Range ( $\pm 2SD$ )
Taurine	4.4–12.4	2.5–8.5	3.7–8.6	4.2–13.3
Aspartic acid	0.4–5.2	1.4–2.2	1.9–4.2	3.1–9.9
Threonine	22.2–52.6	22.3–47.1	10.3–39.5	<100.6
Serine	18.7–37.5	22.6–37.8	19.8–42.0	27.3–76.6
Asparagine	<17.9	0.6–17.4	2.7–7.4	3.5–14.5
Glutamic acid			<8.3	<7.8
Glutamine	356.0–680.0	284.0–566.0	333.5–658.4	363.0–785.1
Proline				
Glycine	2.2–14.2	0.7–14.7	2.9–7.9	3.7–7.6
Alanine	13.4–48.2	11.5–41.1	11.1–29.6	16.5–36.6
Citrulline	0.8–4.8	<6.4	0.9–2.4	<8.5
<i>a</i> -Aminobutyrate	1.5–7.1	<7.9	0.2–4.8	1.6–4.3
Valine	10.1–37.7	4.5–24.5	7.6–18.0	9.7–28.7
Cystine				
Methionine	<9.3	<8.8	0.9–3.5	0.7–6.0
Isoleucine	3.4–13.4	<11.1	2.2–6.2	3.9–11.3
Leucine	10.4–26.8	4.2–18.2	5.4–15.4	12.1–19.3
Tyrosine	5.3–13.3	1.9–13.9	4.3–11.7	6.7–20.4
Phenylalanine	6.7–18.3	2.4–19.2	0.5–15.9	0.6–22.6
Ethanolamine			7.8–23.8	<26.4
Ornithine	3–9	1.7–8.1	2.0–5.9	0.7–15.7
Lysine	20.1–42.9	15.1–36.3	9.1–25.5	9.1–33.6
Histidine	11.4–22.2	12.0–25.2	8.0–18.4	8.3–28.5
Arginine	13.1–35.1	14–34.4	11.3–29.5	10.1–29.9

# Colheitas SOS



# Colheitas SOS

- Protocolo por suspeita de doença genética
- Sempre que falecimento (criança +++) sem diagnóstico etiológico
- Reserva de material biológico em condições apropriadas para futuras investigações:
  - Células e tecidos para estudos enzimáticos
  - Células e tecidos para estudos DNA
  - Fluidos biológicos para investigações bioquímicas
- Imagiologia
- Autópsia anatomo-patológica



# Colheitas SOS

Fluidos biológicos para investigação bioquímica:

- Plasma de 20 ml de sangue centrifugado
- 10 ml de urina
- 4 ml de LCR
- 1,5 ml de Humor vítreo
- Bílis (acilcarnitinas)

→ Congelar imediatamente a – 20ºC

Carnitina, amónia, lactato e AAs → difícil interpretação  
por rápida lise tissular e alt. secundárias

# Colheitas SOS

## Células e tecidos para estudos enzimáticos

- Células: (sangue - 10 ml por punção intracardíaca)
    - Isolamento de leucócitos
    - Sangue total à temperatura ambiente (avaliação 24h)
  - Tecidos: (congelar imediatamente a -70ºC)
    - Fígado (biópsia por punção ou incisão)
    - Músculo (esquelético, cardíaco)
    - Pele (meio de cultura/gase húmida com SF)
    - Outros (cérebro)
- Possibilidade de estudos a fresco, rotulagem

# Colheitas SOS

## Células e tecidos para estudos DNA

- Células: (10 ml EDTA por punção intracardíaca)
  - 2 ml para cariótipo
  - 8 ml para extracção DNA
  - Reserva em papel de filtro
- Tecidos
  - Fibroblastos em cultura (2 amostras)
  - Pele ou pericárdio
  - Tecidos em parafina
    - Meio de cultura ou gaze húmida com SF (24h)
    - Fonte ilimitada de DNA e enzimas

# Colheitas SOS

- Imagiologia
  - Fotografias do corpo inteiro e pormenores
  - Radiografia do esqueleto (AP e perfis)
  - RMN se autópsia negada
- Autópsia anatomo-patológica
  - Após autorização
  - Guardar material congelado dos diversos órgãos
  - Histologia e microscopia electrónica

# Em resumo

- Laboratório “básico” em cada hospital é essencial à prática clínica diária (... amónia, lactato...)
- Laboratório “específico” – ter em conta métodos de conservação e transporte, período e tipo de colheitas
- Colheitas atempadas e adequadas  
→ situações de emergência e em SOS