



Errores Congénitos del Metabolismo IIBC Manual de Instrucciones

Diagnóstico Bioquímico y Molecular de las
Enfermedades Metabólicas Hereditarias

Hospital Clínic de Barcelona
Centro Diagnóstico Biomédico
Servicio de Bioquímica y Genética Molecular

Instrucciones generales para la preparación, conservación y envío de muestras

| Muestra | Cantidad necesaria | Preparación | Conservación | Envío |
|--------------------------------------|-----------------------|--|-----------------------|--|
| Orina (1 micción) | 10-20 ml | Sin conservantes, congelación inmediata. | -20°C | Nieve carbónica |
| Plasma | 0,5-1 ml (según edad) | 2-5 ml de sangre recogida en EDTA o heparina, centrifugar suavemente, recoger el plasma en otro tubo y congelar inmediatamente. | -20°C | Nieve carbónica |
| Suero | 0,5-1 ml (según edad) | Evitar hemólisis, antes de centrifugar esperar a la retracción del coágulo. Recoger el sobrenadante en otro tubo y congelar inmediatamente. Proteger de la luz si es para determinar esteroides. | -20°C | Nieve carbónica |
| Líquido cefalorraquídeo | 0,5-1 ml | Extraer líquido cefalorraquídeo no hemorrágico. Para estudio de neurotransmisores se utilizaría la segunda fracción. Si la punción ha sido traumática y el LCR tiene sangre, centrifugar inmediatamente y separar el líquido claro. Congelar inmediatamente. | -20°C | Nieve carbónica |
| Sangre total para extraer leucocitos | 5-10 ml | Recogida sobre heparina de litio. Si desean enviar las muestras ya preparadas, ver página 5. | Temperatura ambiente. | Temperatura ambiente. Enviar en el plazo de 24h. Contactar previamente. |

Instrucciones generales para la preparación, conservación y envío de muestras

| Muestra | Cantidad necesaria | Preparación | Conservación | Envío |
|--|-----------------------|---|-----------------------|--|
| Sangre total para extraer linfocitos | 5-10 ml | Toma de muestra en ayunas. Recogida sobre EDTA. Para estudio de CoenzimaQ10 ha de ser sangre sobre heparina. Si desean enviar las muestras ya preparadas, ver página 6. | Temperatura ambiente. | Temperatura ambiente. Enviar en el plazo de 24h. Contactar previamente. |
| Sangre total para extraer eritrocitos | 2 ml | Toma de muestra en ayunas. Recogida sobre EDTA. Si desean enviar las muestras ya preparadas, ver página 7. | Temperatura ambiente. | Temperatura ambiente. Enviar en el plazo de 24h. |
| Sangre total para extraer granulocitos | 6- 10 ml (según edad) | Recogida sobre heparina de litio. Debe haber transcurrido como mínimo 6 horas desde la última toma de medicación. | Temperatura ambiente. | Temperatura ambiente. Enviar en el plazo de 24h. Última semana de cada mes. |
| Sangre total para extraer DNA | 2 ml | Recogida sobre EDTA. | Temperatura ambiente. | Temperatura ambiente. Enviar en el plazo de 24h. |
| Sangre impregnada en papel. | 2-4 círculos | Gotas de sangre recogidas en papel de filtro Whatman 903 (el mismo que el de cribado neonatal). No utilizar anticoagulante y dejar secar al aire entre 2-4 horas. Ver página 8. | Temperatura ambiente. | Temperatura ambiente. Enviar en el plazo de 48h. |

Instrucciones generales para la preparación, conservación y envío de muestras

| Muestra | Cantidad necesaria | Preparación | Conservación | Envío |
|-------------------|--|--|---|--|
| Biopsia de piel | Superficie de 2-3 mm ² de superficie x 1 mm de profundidad. | En medio de cultivo estéril. Ver forma de obtención en la página 9. | Temperatura ambiente, en medio de cultivo estéril. No congelar. | Temperatura ambiente. Enviar en el plazo de 24h. |
| Biopsia muscular | 50-100 mg | Sin conservantes, congelación inmediata en nitrógeno líquido. No utilizar bisturí eléctrico. | -80°C | Nieve carbónica (3-4 kg). |
| Otras Biopsias | Variable, consultar laboratorio. | Sin conservantes, congelación inmediata en nitrógeno líquido. | -80°C | Nieve carbónica (3-4 kg). |
| DNA | 100-200 µL de una concentración aproximada de 150 ng/µL. | Según protocolos de rutina de cada laboratorio/hospital. | Temperatura ambiente. | Temperatura ambiente. |
| Líquido amniótico | 15-20 ml | Punción, condiciones estériles. | Temperatura ambiente. No congelar. | Temperatura ambiente. Enviar en el plazo de 24h. Indispensable concertar cita previa. |
| Biopsia Corial | Mínimo 20 mg | Separar cuidadosamente la decidua materna y sumergir la biopsia en medio de cultivo estéril. | Temperatura ambiente. No congelar. | Temperatura ambiente. Enviar en el plazo de 24h. Indispensable concertar cita previa. |

Instrucciones para la obtención de leucocitos

Reactivos

- EDTA: 0.2M: Guardar en nevera, estable durante 6 meses.
- Tampón de lisis:

| | |
|--------------------|-------|
| NH ₄ Cl | 8,3 g |
|--------------------|-------|

| | |
|-------------------|-----|
| KHCO ₃ | 1 g |
|-------------------|-----|

| | |
|------------|--------|
| EDTA 0,2 M | 0,5 ml |
|------------|--------|

Mezclar y llevarlo a 1 l.

El pH tiene que estar entre 7.1 y 7.3.

Guardar en nevera, estable durante 6 meses.

- Suero fisiológico.

Método

- Extraer de 5-10 ml de sangre recogida sobre heparina de litio.
- Centrifugar la sangre a 1500 rpm 10 min.
- Retirar el plasma sin apurar para no tocar el anillo que hay entre plasma y eritrocitos.
- Añadir 10-13 ml de tampón de lisis.
- Mezclar bien, girando el tubo lentamente.
- Mantener en hielo 15 min.
- Centrifugar 10 min. a 1200 rpm.
- Extraer el sobrenadante y descartar.
- Si el pellet está muy rojo, resuspender con una pipeta y repetir los pasos del 3 al 7, añadiendo nuevamente 10-13 ml de tampón de lisis.
- Añadir 2 ml de tampón de lisis, resuspender el pellet con una pipeta.
- Mantener en hielo 5 min.
- Añadir suero fisiológico hasta 15 ml para limpiar.
- Centrifugar 10 min. a 1200 rpm.
- Extraer el sobrenadante y descartar.
- Congelar el pellet o sedimento a -20°C hasta su envío.

NOTA: Si la sangre no se puede procesar, se puede guardar a 4°C 48h como máximo.

Conservación

- Congelar a -20°C. Para larga conservación mantener a -80°C.

Envío

- Congelado, en caja de pórex-pan con nieve carbónica.

Instrucciones para la obtención de linfocitos

Reactivos

- Histopaque®-1077 (Sigma)
- PBS 1x (Dulbecos)

Método

- Extraer 5 ml de sangre recogida sobre EDTA a temperatura ambiente. Toma de muestra en ayunas.
- Homogeneizar la sangre con cuidado por inversión (3-4 veces).
- Disponer 5 ml de Histopaque®-1077 (Sigma) en un tubo cónico debidamente rotulado y añadir 5 ml de sangre dejándola resbalar cuidadosamente por la pared con una pipeta pasteur. Si el volumen de sangre es inferior o superior a 5, tendremos en cuenta que la relación Histopaque®/Sangre debe ser siempre de 1:1. No debe mezclarse el Histopaque® con la sangre.
- Centrifugar a 1.500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Atención: Utilizar centrifuga SIN FRENO.
- Recoger con una pipeta pasteur la capa superior de plasma hasta unos 5mm de la interfase opaca que contiene los linfocitos.
- Limpieza de los linfocitos: Si las células están muy hemáticas, traspasarlas a otro tubo cónico. Añadir un volumen de PBS (Dulbecos) igual a la capa de linfocitos recogidos (aprox. 1 ml). Preparar de nuevo un tubo cónico con 2 ml. de Histopaque® y añadir los linfocitos dejándolos resbalar cuidadosamente por la pared con una pipeta pasteur. Centrifugar 20 minutos a 1.500 rpm (SIN FRENO).
- Traspasar con una pipeta pasteur la interfase opaca (CMN) a otro tubo cónico.
- Añadir al tubo 5 ml de tampón PBS, remover con una pipeta pasteur.
- Centrifugar 10 minutos a 1.200 rpm a temperatura ambiente.
- Decantar, queda el pellet en el fondo del tubo.

Conservación

- Congelar a -20°C. Para larga conservación mantener a -80°C.

Envío

- Congelado, en caja de pórex-pan con nieve carbónica.

Instrucciones para la obtención de eritrocitos

Reactivos

- Suero fisiológico.

Método

- Extraer 2 ml de sangre recogida sobre EDTA. Toma de muestra en ayunas.
- Homogeneizar la sangre con cuidado por inversión (3-4 veces) y centrifugar 1500 rpm durante 10 minutos.
- Separar el plasma inmediatamente y congelarlo a -20°C .
- Lavar el sedimento de eritrocitos añadir 2 ml de suero fisiológico y homogenizar suavemente.
- Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos.
- Descartar el sobrenadante y volver a añadir 2 ml de suero fisiológico y homogenizar suavemente.
- Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos.
- Descartar el sobrenadante.

Conservación

- Congelar el sedimento (eritrocitos) a -20°C . Para larga conservación mantener -80°C .

Envío

- Congelado, en caja de pórex-pan con nieve carbónica.

Instrucciones para la obtención de sangre impregnada en papel

Método

- Utilizar papel de filtro Whatman 903.
- Con un dispositivo de incisión cortante realizar la incisión, esperar a que se forme una gota de sangre grande y colocar el papel de filtro con los círculos impresos contra la gota, sin que éste contacte con la herida, de forma que el papel absorbente impregne y llene completamente el círculo para ambas caras.
- Impregnar con las gotas de sangre un mínimo de tres círculos del papel absorbente. No utilizar anticoagulante.
- Dejar secar a temperatura ambiente en posición horizontal durante dos o tres horas antes de introducirlo en el sobre de envío.

Conservación

- Temperatura ambiente.

Envío

- Temperatura ambiente antes de las 48h tras su obtención.



Instrucciones para la obtención de biopsia de piel

Toma de muestra

- Desinfección: con alcohol 96°. No emplear otros desinfectantes locales.
- Emplear material estéril.
- La toma de muestra ha de ser de una zona no vellosa, tal como la cara interna del brazo.
- Tamaño deseado: 2 a 3 mm² de superficie x 1 mm de profundidad (debe incluir las capas basales de la dermis sin llegar al tejido adiposo).

Recipiente

- Donde se va a depositar la biopsia. Tubo estéril con tapón de rosca que cierre herméticamente, lleno de medio de cultivo (sin suero fetal). En su defecto se puede utilizar una solución salina estéril (en este caso la muestra deberá llegar al laboratorio en 24h).

Conservación

- Temperatura ambiente.

Envío

- Lo antes posible, a temperatura ambiente. **No congelar.**

Biopsia post-mortem

- Seguir las mismas normas de asepsia total, tanto en el material quirúrgico como en la desinfección de la piel.

Criopreservación

- Para que los fibroblastos se puedan mantener congelados en nuestra colección de muestras, la solicitud debe ir acompañada del correspondiente consentimiento informado. Si no es así, de acuerdo con la ley 14/2007 de Investigación Biomédica, los fibroblastos se eliminarán una vez realizado el estudio solicitado.

Test de sobrecarga de alopurinol

Test

- Recoger la primera orina de la mañana y rotularla como Orina Basal.
- **El test debe iniciarse por la mañana. Tras la obtención de la orina basal**, administrar la sobrecarga de alopurinol en una sola dosis, vía oral:

Dosis

| | |
|---------------------------|--------------|
| Niños de 6 meses a 6 años | 100mg |
| Niños de 6 a 10 años | 200mg |
| A partir de los 10 años | 300mg |

- A continuación recoger la orina en 4 fracciones y guardarlas en nevera rotulando el tubo con la fracción correspondiente:

Fracción

| | |
|------------|---|
| Fracción 1 | 0-6h después de la sobrecarga |
| Fracción 2 | 7-12h después de la sobrecarga |
| Fracción 3 | 13-18h después de la sobrecarga |
| Fracción 4 | 19-24h después de la sobrecarga |

- Enviar las orinas CONGELADAS para valorar ácido orótico.

NOTA: Es necesario que, durante la realización del test, la ingestión de proteínas sea la habitual, pues es un factor importante en la eliminación de ácido orótico y orotidina.

Test de sobrecarga de alopurinol

Observaciones

- En las 24 horas anteriores a la prueba evitar la ingesta de cafeína y bebidas que contengan benzoato. En el caso de las mujeres la prueba debería realizarse pasados de 7 a 12 días el periodo menstrual, si las circunstancias clínicas lo permiten.

Contraindicaciones

- Interacciones con fármacos que utilizan la vía de las xantinas como mecanismo de acción (mercaptopurina, azatioprina).

Efectos secundarios

- Son muy raros, se han descrito en tratamiento con alopurinol casos de reacciones cutáneas, hematológicas, gastrointestinales, cefalea y vértigo. En el caso de la sobrecarga, al tratarse de una única dosis y por debajo de las que se usan para la hiperuricemia, cabe esperar que los efectos secundarios sean prácticamente inexistentes.

Conservación

- Congelar a -20°C.

Envío

- Congelado, en caja de pórex-pan con nieve carbónica.





932 275 464
atencdb@clinic.cat
<https://cdb.clinic.cat>