



**Red Biobancos**

Instituto de Salud Carlos III

# PNT

## Células Mononucleares de Sangre Periférica

Red Nacional  
de Biobancos

Spanish National  
Biobank Network

Grupo de Trabajo en Banco de Cerebros

REVISIÓN	REALIZADO	FECHA	APROBADO	FECHA	ENTRADA EN VIGOR
00	Grupo de Derivados Hemáticos	16/06/2011	Dirección	16/06/2011	19/07/2011
Modificaciones:					

Madrid 2011



## Obtención, Procesado y Almacenaje de Muestras de Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP).

La presente publicación está financiada por Subprograma de Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), dentro la Acción Estratégica en Salud 2009, RD09/0076/00113

***M<sup>a</sup> Ángeles Muñoz***

*Coordinadora del*

*Grupo de Trabajo*

***Manuel M Morente.***

*Coordinador de la Red*

*Nacional de Biobancos - ISCIII*

***Red Nacional de Biobancos - ISCIII***

*www.redbiobancos.es*



## AUTORES.

El contenido de este Código de Buenas Prácticas ha sido elaborado por el **Grupo de Trabajo de Derivados Hemáticos** ([www.redbiobancos.es](http://www.redbiobancos.es)):

Maribel García Sánchez, Hospital Virgen Macarena

Lina Mayorga, Hospital Carlos Haya

Tatiana Díaz, Hospital Carlos Haya

Inmaculada Martín, Hospital Carlos Haya

Pilar Giraldo Castellanos, Hospital Miguel Servet

Fernando Civeira Murillo, Hospital Miguel Servet

Miguel Pocoví Mieras, Hospital Miguel Servet

Pablo Isidro Marrón, Hospital Central de Asturias

Jacobo Martínez, Centro Superior de Investigación en Salud Pública (CSISP)

Inés Santiuste, Hospital Marqués de Valdecilla

José Manuel González de Buitrago, Hospital Universitario de Salamanca

Eduarne Pedrosa, Fundación Instituto de Investigación Germán Trías i Pujol

Alfonso Monje Hernández, San Juan de Dios. Servicios de Salud Mental

Gerard Pardo, Hospital Dr. Josep Trueta

Beatriz Bellosillo, Hospital del Mar

Luis Gallart Millán, Hospital Joan XXIII

Anna Bosch, Hospital Clínico y Provincial de Barcelona - IDIBAPS

Nieves Doménech García, Complejo Hospitalario Universitario de La Coruña

M<sup>re</sup> Ángeles Muñoz Fernández, Hospital Gregorio Marañón

Almudena García Torres, Hospital Gregorio Marañón

Irene Consuegra, Hospital Gregorio Marañón

Rosario Martínez Marín, Hospital Virgen de La Arrixaca

M<sup>re</sup> Antonia Fortuño Cebamano, Clínica Universidad de Navarra

Isabel Gil Aldea, Hospital de Navarra

Inés Aroca Siendones, Hospital Universitario San Cecilio, Granada,

Clara Rodríguez, BioBanco Vasco/Centro Vasco de Transfusiones

### **Coordinador:**

M<sup>re</sup> Ángeles Muñoz, Hospital Gregorio Marañón



## ÍNDICE

1.	ABREVIATURAS.....	8
2.	DEFINICIONES.....	8
3.	OBJETO .....	8
4.	ALCANCE.....	8
5.	MATERIALES Y SERVICIOS .....	9
6.	DESARROLLO .....	10
6.1.	OPERACIONES PREVIAS.....	10
6.2.	VERIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS TUBOS.....	10
6.3.	OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA EMPLEANDO TUBOS LEUCOSEP 10	
6.4.	OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA SIN TUBOS LEUCOSEP .....	11
6.5.	OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA .....	12
6.6.	MANTENIMIENTO DE LA TRAZABILIDAD Y DATOS ASOCIADOS A LA MUESTRA: .....	12
7.	DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA.....	13
8.	DOCUMENTACIÓN RELACIONADA .....	13

## 1. ABREVIATURAS

**DMSO:** Dimetilsulfóxido ( $\text{CH}_3\text{SOCH}_3$ ) es un líquido orgánico sin color que contiene sulfuro, usado como disolvente orgánico. Agente criopreservante. Es un compuesto de bajo peso molecular y permeable a través de la membrana. Actúa desplazando el agua del interior de la célula evitando la formación de cristales de hielo durante la congelación.

**RPMI:** medio de cultivo formulado en su origen para mantener fibroblastos en suspensión, hoy en día se utiliza para el mantenimiento de numerosas líneas celulares e hibridomas.

**PBS:** (Phosphatedbufferedsaline) Suero salino tamponado en fosfatos

**EDTA:** Ácido etilendiamintetraacético. El EDTA atrae a los iones de calcio bloqueando la cascada de coagulación. (sal dipotásica K2 ó K3 )

**ACD:** Ácido cítrico, Citrato y Dextrosa en una proporción de 0.9, 2 y 2 respectivamente, en 120 ml de agua destilada. Se emplea en la obtención de plasma para pruebas de coagulación y función plaquetaria. Se usa en recolección y almacenamiento para transfusiones, ya que preserva la sangre, concretamente la supervivencia de los eritrocitos durante más tiempo, 21-32 días- 70% supervivencia. Altera la concentración de calcio.

**CPD:** Citrato - Fosfato –Dextrosa.

**CPD-A:** Citrato - Fosfato - Dextrosa – Adenina

**SBF:** Suero fetal bobino

## 2. DEFINICIONES

**CMSP:** Células mononucleares de sangre periférica (monocitos y linfocitos)

**Granulocitos:** Los granulocitos son leucocitos polimorfonucleares, caracterizados por el modo de colorear los orgánulos de su citoplasma, en microscopía de luz. Hay tres tipos de granulocitos en la sangre humana:

Neutrófilos: se colorean con tintes neutros o casi no adquieren el colorante

Eosinófilos : importante coloración rojiza

Basófilos: muestran afinidad por colorantes básicos adquiriendo una coloración azulada

## 3. OBJETO

El objeto de este procedimiento es definir la actuación y establecer las directrices básicas de calidad, ya sea tanto en la obtención y manejo, como en el procesamiento de las muestras de sangre total, que serán depositadas en los biobancos pertenecientes a cualquier centro u hospital adscrito a la Red Nacional de BioBancos.

## 4. ALCANCE

Este procedimiento es aplicable a todas las muestras de CMSPs que sean extraídas con la finalidad de ser procesadas y almacenadas en un biobanco. Este protocolo no detalla los procesos para la seguridad e higiene laboral sobre materiales de riesgo biológico y/o productos químicos, y se recomienda que el personal siga las normas de Seguridad e Higiene establecidas en cada centro



## 5. MATERIALES Y SERVICIOS

*Servicio de mensajería con permiso de transporte de material biológico:*

Material	Clasificación ONU		Instrucciones de embalaje				Observaciones
	Clase	Nº					
Muestras infecciosas para el ser humano	6.2	2814					Materiales grupos 2,3,4
Muestras para diagnóstico	6.2	3373					Materiales grupos 1,2,3

*Para muestras no infecciosas: Bolsa o contenedor de transporte interno en el centro hospitalario.*

*Para muestras infecciosas o peligrosas : Contenedor de transporte de sustancias peligrosas que cumpla con la legislación vigente: Real Decreto 664/97, siguiendo la "Instrucción de embalaje 620 (IATA – OACI 602)"*

*Jeringuillas y/o material necesario para la extracción de sangre.*

*Tubos Leucosep de 15 ml o tubos de 15 ml estériles*

*Tubos tipo falcon de 50 ml*

*Crioviales estériles Pipetas y puntas estériles con filtro*

*Etiquetas identificativas*

*PBS*

*Ficoll*

*RPMI completo (RPMI1640 glutamina/Hepes+15% FBS+ 1% antibiótico)*

*DMSO Medio de congelación (SBF+7,5-10% DMSO)*

## **6. DESARROLLO**

### **6.1. OPERACIONES PREVIAS**

- 6.1.1.** La sangre debe extraerse con posterioridad a que el paciente ha firmado el consentimiento informado de donación de muestras al biobanco. Se recomienda que el tiempo transcurrido entre la extracción sanguínea y la congelación a -80°C sea definido en base al tipo de estudios para los que la muestra vaya a estar destinada; así, en función de ensayos previos, se ha determinado: a) Tiempo óptimo para estudios celulares: máximo 1,5 horas tras la extracción. b) Tiempo óptimo para estudios virológicos: máximo 24 horas tras la extracción
- 6.1.2.** La extracción sanguínea se realiza por venopunción en una vía periférica. Los responsables de llevar a cabo este procedimiento, así como de la programación de las extracciones, se coordinarán con el personal del biobanco para garantizar que los tubos de recolección de la sangre con anticoagulante estén debidamente identificados y se asegure una correcta obtención y recepción de la muestra
- 6.1.3.** El tipo de anticoagulante empleado ha de ser el más apropiado para los estudios a los que se destina la muestra, en función de la experiencia previa, se aconseja: a) Estudios de proliferación celular - leucocitos: Heparina. b) Extracción de DNA: EDTA. c) Crio preservación de hematíes: Citrato ACD, CPD-A o CPD
- 6.1.4.** En el momento de la extracción se aconseja recoger la máxima información posible relativa a la muestra:
- Fecha y hora de extracción.
  - Tipo de anticoagulante.
  - Incidencias ajenas al protocolo

### **6.2. VERIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS TUBOS**

Verificar la información del paciente, siempre manteniendo la privacidad y ética garantizada por la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, y el resto de la legislación nacional vigente aplicable a este proceso, y asegurar la correcta relación de los tubos de extracción sanguínea debidamente etiquetados con la información del paciente.

### **6.3. OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA EMPLEANDO TUBOS LEUCOSEP**

Opcional: Juntar el contenido de todos los tubos de extracción de sangre en un único tubo falcon de 50ml para homogeneizar la sangre.

6.3.1 Añadir 3,2 ml de Ficoll a cada tubo etiquetado Leucosep (tubos vacíos)

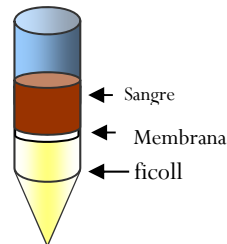
6.3.2 Centrifugar el tubo Leucosep que contiene el ficoll a 1000xg durante 1 min. Retirar el Ficoll sobrante por decantación o con pipeta.

6.3.3 Centrifugar los tubos de sangre a 1500g durante 15 min

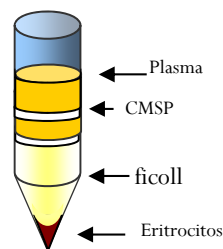
6.3.4 Aspirar el plasma sin coger células mononucleadas que forman una capa blanca por encima de los eritrocitos y granulocitos y descartarlo o alicuotarlo según el PNT "Obtención de plasma".

6.3.5 Aspirar 2 ml de la capa de células mononucleares y depositarla en un tubo falcon de 15 ml que contenga 4 ml de PBS. Invertir el tubo para mezclar bien la solución.

6.3.6 Añadir la capa de células mononucleares con el PBS o la sangre al tubo Leucosep del punto 6.3.1.



6.3.7 Centrifugar los tubos a 800 g durante 15-30 min. a 18-25 °C sin frenos



A partir de aquí continuar en el punto 6.5

#### 6.4. OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA SIN TUBOS LEUCOSEP

Opcional: Juntar el contenido de todos los tubos de extracción de sangre en un único tubo falcon de 50ml para homogeneizar la sangre.

6.4.1 Añadir un volumen de Ficoll por cada dos volúmenes de sangre (Ficoll: Sangre 1:2)

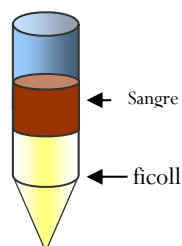
6.4.2 Centrifugar los tubos de sangre a 1500g durante 15 min. Opción: homogeneizar la sangre y pasar al punto 6.4.5

6.4.3 Aspirar el plasma sin coger células mononucleadas que forman una capa blanca por encima de los eritrocitos y granulocitos y descartarlo o alicuotarlo según el PNT "Obtención de plasma". Opción: añadir PBS en cantidad igual al volumen de plasma retirado.

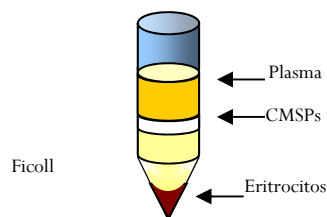
6.4.4 Homogeneizar la sangre con el PBS y pasar al paso 6.4.5.

6.4.5 Aspirar 2 ml de la capa de células mononucleares y depositarla en un tubo Falcon de 15 ml que contenga 4 ml de PBS. Invertir el tubo para mezclar bien la solución.

6.4.6 Añadir la capa de células mononucleares con el PBS o la sangre sobre el ficoll con el tubo lo mas horizontal posible, para que no se mezclen el ficoll y la sangre.



6.4.7 Centrifugar el tubo a 500 g durante 10 min. a 18-25 °C sin freno.



A partir de aquí continuar en el punto 6.5

## 6.5. OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA

6.5.1 Extraer el halo blanco de CMSPs y transferirlo a un tubo estéril. Completar el volumen con PBS.

6.5.2 Centrifugar el tubo a 500 g durante 10 min. a 18-25 °C.

6.5.3 Eliminar el sobrenadante de los tubos por decantación procurando no romper el botón celular. Resuspender el pellet obtenido en PBS.

6.5.4 Extraer una muestra de 10-25 µl y realizar un conteo.

6.5.5 Centrifugar el tubo a 500 g durante 10 min. a 18-25 °C.

6.5.6 Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet en medio completo:

Para cultivo (RPMI+ 10 % SBF)

Para congelar (SBF+7,5 - 10 % DMSO)

6.5.7 Realizar la dilución oportuna para conseguir una concentración deseada:

Para congelación  $7 - 15 \times 10^6$  cel. /ml.

6.5.8 Congelar o poner en cultivo.

## 6.6. MANTENIMIENTO DE LA TRAZABILIDAD Y DATOS ASOCIADOS A LA MUESTRA:

En el biobanco se aconseja recoger la máxima información posible relativa a la muestra, tanto en el momento de la recepción como tras el procesado y almacenaje, y en función de los estudios destinados a la misma, por ejemplo: Fecha y hora de recepción y/o procesamiento

- Grado de hemólisis
- Volumen de sangre recibida
- Grado de lipemia
- Grado de ictericia
- Nivel de coagulación
- Incidencias en el procesado

## 7. DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA

- Norma UNE-EN-ISO 9001:2008. Sistemas de gestión para la calidad. Requisitos.
- Norma ISO 6710, que establece el código de colores para tubos según el anticoagulante empleado.

## 8. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA

- *Isolation of Whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood: Kanof ME, Smith PD, Zola H. CurrprotocImmunol 2001 may Chapter 7, unit 7.1*





# Red Nacional de Biobancos

Spanish National  
Biobank Network



***Red Biobancos***

Instituto de Salud Carlos III