



Red Biobancos

Instituto de Salud Carlos III

Red Nacional
de Biobancos

Spanish National
Biobank Network

PNT

Obtención, Procesado y Almacenaje de Muestras de Líquido Pleural

Grupo de Trabajo de Derivados Hemáticos

REVISIÓN	REALIZADO	FECHA	APROBADO	FECHA	ENTRADA EN VIGOR
00	Grupo de Derivados Hemáticos	05/06/2013	Dirección	05/06/2013	05/06/2013

Modificaciones:

Madrid 2013

Obtención, Procesado Y Almacenaje de Muestras de Líquido Pleural

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^a Ángeles Muñoz

Coordinadora del

Grupo de Trabajo

Manuel M Morent.

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):

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^a 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^a Antonia Fortuño Cebamanos, 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^a Ángeles Muñoz, Hospital Gregorio Marañón

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	9
2. DEFINICIONES	9
3. OBJETO	9
4. ALCANCE	9
5. MATERIALES	10
6. DESARROLLO	11
6.1. CONSIDERACIONES PREVIAS	11
6.2. EXTRACCIÓN DE LÍQUIDO PLEURAL	11
6.3. RECEPCIÓN DE LA MUESTRA EN EL LABORATORIO	11
6.4. PROCESAMIENTO: OBTENCIÓN DEL LÍQUIDO PLEURAL Y CONSERVACIÓN DE LAS ALÍCUOTAS	11
7. DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA	13
8. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA	13

1. ABREVIATURAS

- **EDTA:** Acido etilendiamintetraacético.
- **LP:** Líquido pleural
- **DMSO:** Dimetilsulfóxido (CH₃SOCH₃)
- **SBF:** Suero fetal bovino

2. DEFINICIONES

- **Líquido Pleural:** Es el líquido existente entre las capas de tejido que recubren los pulmones (pleura visceral) y la cavidad torácica (pleura parietal). Por sus características se puede clasificar por trasudados (filtrado plasmático) y exudados (origen inflamatorio, rico en proteínas y células).
- **Punción Pleural o toracocentesis:** Es un procedimiento realizado para drenar el exceso de líquido que se encuentra en el espacio entre el revestimiento externo de los pulmones (pleura visceral) y la pared torácica (pleura parietal).
- **EDTA: Acido etilendiamintetraacético.** Agente anticoagulante que bloquea la cascada de la coagulación de la sangre mediante la atracción de calcio iónico.
- **Heparina:** Agente anticoagulante que prolonga el tiempo de coagulación de la sangre a través de la activación de la antitrombina III.
- **DMSO:** 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.

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 LP 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 LP que sean obtenidas con la finalidad de ser 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

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

Material	Clasificación ONU		Instrucciones de embalaje				Observaciones
	Clase	Nº	ADR	RID	OACI	IMDG	
Muestras infecciosas para el ser humano	6.2	2814	620	620	692	620	Materiales grupos 2,3,4
Muestras para diagnóstico	6.2	3373	650	650	650	----	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 del LP
- Tubo estéril para la recogida del LP
- Guantes para protección en la manipulación
- Pipetas Pasteur estériles de 1 mililitro
- Criotubos estériles (desde 0.5 a 2 mililitros)
- Gradillas para criotubos
- Cajas de criolmacenaje
- Etiquetas adecuadas al tipo de criotubos
- Centrífuga con los adaptadores adecuados para el tipo de tubos de recolección utilizados
- Impresora para etiquetado de muestras
- Medio de congelación (SBF+10% DMSO)
- Ultracongelador de -80°C con sistema de registro de temperatura, sistema de mantenimiento de temperatura en caso de corte de corriente eléctrica (inyección de CO₂, sistema de administración de energía (SAE) interno, sistema electrógeno) y sistema de alarma telefónica
- Software de gestión de muestras aplicable a cada centro (Ejemplos: aplicación BBUN (Maxwell), aplicación Bio-e-Bank, etc.)

6. DESARROLLO

6.1. CONSIDERACIONES PREVIAS

- Elección del anticoagulante: En caso de que la muestra de LP se tome para una finalidad concreta, es recomendable elegir el tipo de anticoagulante en función del tipo de estudio/análisis que se vaya a realizar con las muestras derivadas
- Estudios de proliferación celular-leucocitos: Heparina
- Extracción de DNA/RNA: EDTA.

6.2. EXTRACCIÓN DE LÍQUIDO PLEURAL

6.2.1. Se realizará mediante la toracocentesis, tras la firma del consentimiento informado por parte del paciente (de estudio específico y/o biobanco). Se recomienda realizar una extracción entre 10-20 ml de LP.

6.2.2. La recogida del LP se realiza en los tubos con el anticoagulante elegido.

6.2.3. Tras la obtención, la muestra se puede mantener a 4°C en nevera hasta su procesado y almacenamiento posterior (máximo 48h).

6.2.4. La muestra perfectamente etiquetada y la petición se transportan al laboratorio junto con el consentimiento informado, manteniendo las pautas de seguridad de transporte de material biológico establecidas por cada centro. Se recomienda que el tiempo transcurrido entre la extracción del LP y la congelación a -80°C no supere las 2 horas tras la extracción.

6.3. RECEPCIÓN DE LA MUESTRA EN EL LABORATORIO

6.3.1. Verificar la información e identificación de los tubos y asegurar la correcta relación entre los tubos y la información del paciente, siguiendo el compromiso de confidencialidad exigido por la Ley de Protección de Datos.

6.3.2. Etiquetar y registrar la muestra según el procedimiento de gestión de muestras utilizado por cada centro.

6.3.3. Rellenar la hoja de datos mínimos necesarios para un correcto almacenamiento de la muestra. 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
- Sospecha diagnóstica
- Incidencias ajenas al protocolo.

6.4. PROCESAMIENTO: OBTENCIÓN DEL LÍQUIDO PLEURAL Y CONSERVACIÓN DE LAS ALÍCUOTAS

6.4.1. El procesamiento del LP consiste en la obtención del sobrenadante y del botón celular.

6.4.2. Una vez recibida la muestra en el laboratorio, se centrifuga entre 800-1200g durante 10 minutos a 4°C.

- 6.4.3. Aspirar cuidadosamente el sobrenadante de aspecto claro y transparente, de color amarillento, con ayuda de una pipeta Pasteur estéril de volumen adecuado
- 6.4.4. El botón celular se congela en medio de congelación (SBF+10% DMSO) a -80°C en los viales de criocongelación adecuados.
- 6.4.5. Alicuotar el sobrenadante en fracciones de 0.5-1ml en viales de criocongelación adecuados, debidamente etiquetados e identificados.
- 6.4.6. Sellar correctamente los tubos para conseguir un cierre hermético. Registrar el número de alícuotas obtenidas para cada muestra. Almacenar a -80°C.
- 6.4.7. Registrar la ubicación de la muestra en el software de gestión de muestras que maneje el biobanco.

7. DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA

- Norma UNE-EN-ISO 9001:2008. Sistemas de gestión para la calidad. Requisitos.
- La Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal, (LOPD).
- Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica (LIB).

8. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA

- Instrucciones Técnicas para el transporte sin riesgos de mercancías peligrosas por vía aérea OACI 2009. http://www.traficoadr.com/oaci/oaci_2006.htm
- Australasian Biospecimen Network, 2007. Guidelines for Biorepository Protocols.
- Sample Handling and Storage Subgroup and Recommendations. 2004. the UK Biobank.
- NCI best practices for biospecimen resources. June 2007. Available at: www.nci.nih.gov. Last accessed February 23, 2011.
- ISBER Best Practices for repositories: Collection, storage, retrieval and distribution of biological materials for research. Cell Preservation Technology 6(1), 358, 2008 <http://www.isber.org/Pubs/BestPractices2008.pdf>
- Antonangelo L, Vargas FS, Acencio MMP, et al. Pleural fluid: are temperature and storage time critical preanalytical error factors in biochemical analyses? Clin Chem Acta 2010;411:1275-8.
- Antonangelo L, Vargas FS, Acencio MMP, et al. Effect of temperature and storage time on cellular analysis of fresh pleural fluid samples. Cytopathology 2012;23:103-7.
- Bielsa S, Esquerda A, Palma R, et al. Influence of storage time on pleural fluid adenosine deaminase activity. Clin Lab (in press).
- Bielsa S, Davies HE, Davies RJ, et al. Reproducibility and reliability of pleural fluid cytokine measurements. Eur Respir J 2009;34:1001-3.
- Porcel JM, Light RW. Pleural effusions. Dis Mon 2013;59:29-57.
- Porcel JM. Handling of pleural fluid samples for routine analysis. Plevra Bülteni 2013 (in press)

Red Nacional de Biobancos

Spanish National
Biobank Network



Red Biobancos

Instituto de Salud Carlos III