LOS BIOBANCOS EN LA ERA "ÓMICA": DERIVADOS HEMÁTICOS

Mª Ángeles Muñoz – Fernández

Red Nacional de Biobancos

LOS BIOBANCOS EN LA ERA "ÓMICA":

DERIVADOS HEMÁTICOS

EDITOR

Mª Ángeles Muñoz – Fernández

Doctora en Biología: Bioquímica Biología Molecular

Doctora en Medicina y Cirugía

Especialista en Inmunología

LOS BIOBANCOS EN LA ERA "ÓMICA": DERIVADOS HEMÁTICOS

© De los textos, sus autores

© De la cubierta y diseño, Mª Dolores García Alonso

© De la Edición, Mª Ángeles Muñoz-Fernández

ISBN: 978-84-606-5785-9

Número de registro: 2015001379

Depósito legal: 06/02/2015

NOTA

Este libro ha sido realizado por el grupo de Derivados Hemáticos de la Red Nacional de Biobancos. Estos desean agradecer el apoyo y la autonomía otorgada para realizar su trabajo y declaran no tener conflicto de interés con este libro.

Grupo de Derivados Hemáticos de la Red Nacional de Biobancos

A todos los donantes de muestras,

por su gran contribución a la ciencia

AUTORES

Abril, Carolina

Biobanco Centro Superior de Investigación en Salud Pública (CSISP)

Almeida, María

Banco Nacional de ADN Carlos III. Universidad de Salamanca

Bosch, Anna

Biobanco del Hospital Clínic – IDIBAPS

Consuegra, Irene

Biobanco del Hospital General Universitario Gregorio Marañón

Díez, Tatiana

Biobanco del Hospital Carlos Haya

Domenech, Nieves

Biobanco del Complejo Hospitalario Universitario de La Coruña

Fernández, Verónica

Biobanco del Hospital Clínic – IDIBAPS

Fortuño, Mª Antonia

Biobanco de la Clínica Universidad de Navarra

Gallart, LLuis

Biobanco del Hospital Joan XXIII

García, Almudena

Biobanco del Hospital General Universitario Gregorio Marañón

García, Mª Isabel

Biobanco del Hospital Virgen de la Macarena

Isidro, Pablo

Biobanco del Hospital Central de Asturias

Martí, Salvador

Biobanco del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER)

Martínez, Rosario

Biobanco del Hospital Virgen de la Arrixaca

Muñoz-Fernández, Mª Ángeles
Biobanco del Hospital General Universitario Gregorio Marañón
Inmunología Hospital General Universitario Gregorio Marañón

Pedrosa, Edurne
Biobanco del Hospital Germans Trias i Pujol

Pérez, Sonia
Biobanco del Centro de Hemoterapia y Hemodonación de CyL

Rodríguez, Clara
Biobanco Vasco para la Investigación-nodo CVTTH

Ruiz, María
BioBanco del Hospital de Lleida (IRBLleida)

Santiuste, Inés
Biobanco del Hospital Marqués de Valdecilla

PRESENTACIÓN

La actual investigación biomédica y su orientación hacia lograr una medicina más personalizada basada en la evidencia y las características genético-moleculares del paciente y del propio proceso, nos obliga a plantear estudios de gran escala donde se recojan y analicen un gran número de casos y pacientes, o más correctamente, un gran número de muestras y datos correspondientes a pacientes y controles. Ese es el cometido y la razón del surgimiento de los biobancos para investigación biomédica.

Pero además los requerimientos de casuísticas amplias y de perfil genético y fenotípico variado obligan a la participación cooperativa de varios biobancos establecidos en red como una plataforma de servicio.

Con el fin de evitar los sesgos característicos de los estudios multicéntricos o del origen múltiple de las muestras y datos asociados es imprescindible y urgente el normalizar los procedimientos de trabajo que intervienen en la fase preanalítica de las muestras recogidas y gestionadas por los biobancos. Sólo esta normalización hará posible el establecimiento de grandes series multicéntricas de calidad homogénea que permitan el desarrollo de proyectos complejos de investigación biomédica.

Por el contrario la ausencia de procedimientos normalizados de trabajo da lugar a variabilidades cualitativas de las muestras a compartir y pueden potencialmente bloquear la posibilidad de un intercambio y compartición significativos de recursos.

Esto tiene una especial importancia cuando nos referimos a investigación clínica o traslacional, especialmente vocacionada a pasar al ámbito clínico en el menor tiempo posible. La existencia de calidades incompatibles por heterogeneidad de los métodos preanalíticos usados pueden introducir un sesgo en los resultados que puede confundir el análisis estadístico y pueden oscurecer hallazgos biológicamente interesantes y, lo más importante, clínicamente relevantes.

La presente monografía incluye los procedimientos para derivados hemáticos asumidos por la Red Nacional de Biobancos y en gran parte desarrollados por un grupo de trabajo promovido en el seno de propia red. Su publicación será de utilidad no solo a los biobancos miembros de dicha plataforma, sino a cuantos laboratorios de investigación españoles pretenden desarrollar su trabajo adhiriéndose a estándares cooperativos facilitando una posible futura integración de resultados con otros grupos.

Mi agradecimiento a cuantos han participado en su elaboración y muy especialmente a la Dra. Mª Ángeles Muñoz-Fernández, coordinadora del grupo de trabajo, principal promotora de esta publicación, trabajadora incansable y magnífica amiga.

Manuel M Morente

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas – CNIO

Coordinador de la Red Nacional de Biobancos

PRÓLOGO

Lo normal es que las palabras iniciales de un libro se escriban al final, cuando ya está concluido el trabajo editorial previo a la impresión del libro, porque así se consigue una perspectiva global de todo lo que ha supuesto su gestación, el desarrollo de una andanza que culmina con el libro que el lector o el biobanquero tiene ante sus ojos. Tras finalizarlo, vienen a la mente cantidad de recuerdos, apegos, deseos, retos, reconocimientos y gratitud que uno piensa que no serán repetibles.

Ha sido un periodo de estrecha relación y trabajo en Red difícil de resumir, pero debo hacerlo porque conlleva una satisfacción no disimulada. El fin esencial de los biobancos, y en especial a partir de los enormes avances de la genómica, proteómica, transcriptómica y metabolómica, es disponer de muestras humanas debidamente registradas y almacenadas y con alta calidad en el momento de su cesión para la investigación biomédica. Ese Horizonte es tan amplio que sitúa al "biobanquero" en un lugar privilegiado de nuestra sociedad para que desempeñe también, y a la par, los papeles de recepción, procesamiento, criopreservación, cesión de muestras biológicas con datos asociados que cumplan la normativa vigente y que sirvan para un avance en la investigación biomédica. En el fondo y en la forma es una tarea integradora apasionante que arrastra indudables obligaciones y para la que se necesita, sin duda alguna, gran vocación. Pero a su vez, la práctica en el biobanco tiene la particularidad de acontecer en un marco triangular ineludible: el donante, autentico sujeto de nuestros resultados, el médico encargado de que las muestras reúnan las características necesarias con los datos asociados, sin excluir a otros profesionales también necesarios en la relación sanitaria con el biobanco, y los investigadores, últimos responsables de utilizar las muestras con los objetivos descritos en sus proyectos para avanzar en ciencia. En este punto no hay que olvidar la necesidad de los consentimientos de los donantes, en caso que sean niños, hay que pasar del triángulo al cuadrado y añadir a los padres o responsables legales del menor, incluyendo instituciones encargadas de velar por sus derechos. Todo ello incrementa el número de actores y de escenarios posibles, complica las relaciones intersubjetivas e implica consideraciones especiales. Pero que las situaciones sean numerosas, complejas y polifacéticas, no implica que no sean posibles de reflexionar y tratar adecuadamente. Ante semejante encrucijada el plus de exigencia estaba servido y nos dispusimos en conjunto, en red a trabajar sobre los "Derivados Hemáticos", procedimientos normalizados de trabajo, criterios de trabajo según la muestra, el estudio destinado, controles de calidad internos, interbiobancos, plasma rico en plaquetas, interferencia de las muestras sanguíneas por hemólisis, lipemia e ictericia.

Desde el principio abordamos la edición de este libro con humildad, debido al desafío que suponía. Observamos que las colecciones vinculadas a Anatomía Patológica almacenan tejidos y, en menor medida, ADN/ARN y en los biobancos se invierte la proporción, almacenando más ADN/ARN que muestras de tejidos. Hay un menor número de biobancos que almacenan precursores hematopoyéticos y células, aunque observamos un incremento debido al avance de la terapia celular y medicina regenerativa, así como las investigaciones relacionadas con la inmunología. Pero cada vez son más solicitadas las muestras de suero, plasma, ADN celular, micro-ARN, etc. Nuestro objetivo en este libro ha sido transmitir una visión de cómo se trabaja en los biobancos con los "Derivados Hemáticos" para que los investigadores se den

cuenta del potencial que tienen las muestras y que tras cumplir los requisitos de presentar un proyecto de investigación que haya pasado los dos Comités: Científico y Ético, puedan disponer de muestras de gran calidad. En caso que haya alguna incidencia en una muestra, el investigador la puede conocer, y se asegura así que los experimentos serán reproducibles y los resultados podrán ser trasladados a la clínica. Porque una de nuestras principales tareas es marcar el nivel de excelencia del biobanco, consistente en la cesión de muestras a los investigadores y no almacenar muchas más muestras de las que se van a ceder o no van a ser utilizadas en un futuro.

Los biobancos deben ser sostenibles, la investigación los necesita. Por otra parte el entusiasmo real, sincero y noble, la esperanza y la amistad son las palabras que emergen con fuerza al agradecer la contribución de cada uno de los autores que han participado en este libro de "Derivados Hemáticos". Por supuesto, sin vosotros, no hubiera sido posible.

Todo este trabajo no hubiera sido posible sin la participación y confianza depositada en nosotros del Coordinador de la Red Nacional de Biobancos Manuel Morente, sin Francisco de Luna, María Cruz Marín y el resto de miembros de la Comisión Ejecutiva.

Un especial agradecimiento a Mª Dolores García-Alonso por estar siempre ahí, sea la causa que sea y por dedicar su tiempo en este caso al diseño de este libro.

Por último agradecer a Irene Consuegra su dedicación y ayuda inestimable en la realización de este libro.

Es lo que nos queda en tiempos de crisis: entusiasmo, amistad y responsabilidad ya que no hay recetas mágicas.

Madrid, 11 de Octubre de 2014

Mª Ángeles Muñoz Fernández

"Los años arrugan la cara,

pero perder el entusiasmo arruga el alma"

Watterson Lowe

ÍNDICE

CAPÍTULO 1

GRUPO DE TRABAJO DE DERIVADOS HEMÁTICOS **1**

CONSTITUCIÓN DE LA RED NACIONAL DE BIOBANCOS 1

ESQUEMA Y DISTRIBUCIÓN DE DERIVADOS HEMÁTICOS EN LOS BIOBANCOS 4

METODOLOGÍA DE TRABAJO 5

CAPÍTULO 2

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO (PNT) **9**

INTRODUCCIÓN 9

FASE PREANALÍTICA 10

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO 12

¿QUÉ ES UN PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO? 12

OBJETIVOS DE LOS PROTOCOLOS NORMALIZADOS DE TRABAJO REALIZADOS POR EL GRUPO DE DERIVADOS HEMÁTICOS 13

REDACCIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE TRABAJO 14

ELABORACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE TRABAJO 15

APORTACIONES DE LOS PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE TRABAJO 16

CAPÍTULO 3

CRITERIOS DE TRABAJO SEGÚN LA MUESTRA Y EL ESTUDIO DESTINADO **20**

INTRODUCCIÓN 20

ADITIVOS UTILIZADOS EN LA TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE 21

ANTICOAGULANTES 21

AGENTES ESTABILIZANTES 28

GEL SEPARADOR DEL SUERO 28

CAPÍTULO 4

CONTROLES DE CALIDAD INTERNOS **35**

INTRODUCCIÓN A LA CALIDAD 35

NECESIDAD DEL CONTROL DE CALIDAD INTERNO EN UN BIOBANCO 35

FASES DE MANIPULACIÓN DE MUESTRAS EN UN BIOBANCO Y EL CONTROL DE CALIDAD ASOCIADO 37

CONTROLES DE CALIDAD INTERNOS 41

CONTROLES DE CALIDAD EN MUESTRAS DE PLASMA/SUERO 41

CONTROLES DE CALIDAD EN MUESTRAS DE ADN 42

CONTROLES DE CALIDAD EN MUESTRAS DE ARN 43

CONTROLES DE CALIDAD EN CÉLULAS 43

CONCLUSIÓN 44

CAPÍTULO 5

CONTROLES DE CALIDAD INTERBIOBANCOS 48

CONTROL DE LA CALIDAD 48

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO INTERBIOBANCO 49

TIPOS DE ERRORES EN LAS DETERMINACIONES ANALÍTICAS: ERROR ALEATORIO, ERROR SISTEMÁTICO Y ERROR TOTAL 50

CAPÍTULO 6

PLASMA RICO EN PLAQUETAS, PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO Y LISADO PLAQUETAR 54

INTRODUCCIÓN 54

CARACTERÍSTICAS 55

OBTENCIÓN 58

PLASMA RICO EN PLAQUETAS 58

PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO 60

LISADO PLAQUETAR PARA CULTIVOS CELULARES 61

MANEJO DE LAS MUESTRAS DE PRP/PRFC 61

CAPÍTULO *7*

INTERFERENCIA EN LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS POR HEMÓLISIS, LIPEMIA E ICTERICIA 66

HEMÓLISIS 67

DEFINICIÓN 67
ETIOLOGÍA 68
MECANISMOS DE INTERFERENCIA DE LA HEMÓLISIS 70
LIPEMIA 71
DEFINICIÓN 71
ETIOLOGÍA 73
MECANISMOS DE INTERFERENCIA DE LA HEMÓLISIS 74
ICTERICIA 74
DEFINICIÓN 74
ETIOLOGÍA 75
MECANISMOS DE INTERFERENCIA DE LA HEMÓLISIS 76
ABREVIATURAS 79
ANEXO I 82
PNT OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS
PNT OBTENCIÓN, PROCESADO Y ALMACENAJE DE MUESTRAS DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (CMSP)
PNT OBTENCIÓN, PROCESADO Y ALMACENAJE DE ERITROCITOS
PNT OBTENCIÓN, PROCESADO Y ALMACENAJE DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO
PNT OBTENCIÓN, PROCESADO Y ALMACENAJE DE LÍQUIDO PLEURAL
PNT OBTENCIÓN, PROCESADO Y ALMACENAJE DE MUESTRAS DE PLASMA
PNT OBTENCIÓN, PROCESADO Y ALMACENAJE DE MUESTRAS DE SUERO
PNT OBTENCIÓN, PROCESADO Y ALMACENAJE DE MUESTRAS DE SANGRE TOTAL
HOJA DE RECOGIDA DE DATOS
CRITERIOS DE CALIDAD PARA DERIVADOS HEMÁTICOS

CAPÍTULO 1

GRUPO DE TRABAJO DE DERIVADOS HEMÁTICOS

GRUPO DE TRABAJO DE DERIVADOS HEMÁTICOS

Mª Ángeles Muñoz-Fernández

CONSTITUCIÓN DE LA RED NACIONAL DE BIOBANCOS

La Red Nacional de BioBancos (RNBB) se constituyó a través de una convocatoria financiada por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) en el año 2010 y duró hasta el año 2013. Debido a la relevancia de los biobancos, ha continuando con otra convocatoria también financiada por el ISCIII y se denomina Plataforma "Red de Biobancos", cuya página web es de gran interés y os animamos a que la visitéis con asiduidad (http://www.redbiobancos.es). Este libro se ha escrito teniendo en cuenta el funcionamiento y resultados obtenidos por el grupo de trabajo de "Derivados Hemáticos" de la RNBB desde su comienzo a 2010 a finales del año 2013.

El grupo "Derivados Hemáticos" se originó a partir del establecimiento, por parte de la RNBB, de ocho grupos de trabajo que desarrollaron su actividad alrededor de aspectos estratégicos específicos. Algunos de estos grupos han mantenido una actividad indefinida, mientras que otros tuvieron un carácter meramente temporal, en base a objetivos concretos. De esta forma, la actividad de la Red se fue adaptando a su momento evolutivo y a los requerimientos concretos de su dinámica. Los grupos de trabajo establecidos a partir de esta iniciativa fueron los siguientes:

- Análisis de costes
- Bancos de ADN
- Bancos de Cerebros
- Consentimientos Informados
- Implicaciones de la Ley de Investigación biomédica
- Políticas de Gestión de Calidad
- Procesos oncológicos
- Derivados Hemáticos

Estos grupos de trabajo estaban compuestos por miembros de los diversos biobancos adscritos a la RNBB, pudiendo ser invitados otros expertos en las correspondientes materias. La coordinación de los mismos fue ejercida por un miembro de la Comisión Ejecutiva de la RNBB. En el caso del grupo "Derivados Hemáticos" correspondió a la Dra. Mª Ángeles Muñoz-Fernández. En su comienzo, la comisión ejecutiva de la RNBB propuso una serie de objetivos a corto y largo plazo que debían ser tratados por los miembros del grupo, siendo:

- Elaborar una propuesta de estándares técnicos para derivados hemáticos, partiendo de la propia experiencia y de la revisión de la literatura.

- Elaborar una propuesta de estándares técnicos para concentrados leucocitarios, partiendo de la propia experiencia y de la revisión de la literatura.
- Diseñar una propuesta, basada en la propia experiencia y la revisión de la literatura, de parámetros a incluir en futuros controles de calidad.
- Elaboración de proyectos de investigación en materia de biobancos y en el área específica del grupo, y acudir a las principales convocatorias de investigación de concurrencia pública o privadas, especialmente con referencia a marcadores de calidad.

Grupo de trabajo:

En el momento de su formación, a principios del año 2011, el grupo de trabajo en Derivados Hemáticos contaba con la participación de 20 biobancos y 26 miembros, quedando distribuidos de la siguiente manera:

1. Biobanco del Hospital General Universitario Gregorio Marañón:
    I. Coordinadora: Mª Ángeles Muñoz Fernández
    II. Irene Consuegra Fernández
    III. Almudena García Torres
2. Biobanco del Hospital Virgen de la Macarena
    I. Maribel García Sánchez
3. Biobanco del Hospital Carlos Haya
    I. Lina Mayoraga
    II. Tatiana Díaz
    III. Inmaculada Martín
4. Biobanco del Hospital Miguel Servet
    I. Pilar Giraldo Castellanos
    II. Fernando Civeira Murillo
    III. Miguel Pocoví Mieras
5. Biobanco del Hospital Central de Asturias
    I. Pablo Isidro Marrón
6. Biobanco del Centro Superior de Investigación en Salud Pública (CSISP)
    I. Jacobo Martínez
7. Biobanco del Hospital Marqués de Valdecilla
    I. Inés Santiuste
8. Biobanco del Hospital Universitario de Salamanca
    I. Jose Manuel González de Buitrago
9. Biobanco del Hospital Germans Trias i Pujol
    I. Edurne Pedrosa
10. Biobanco de los Servicios de Salud del Hospital San Juan de Dios
    I. Alfonso Monje Hernández
11. Biobanco del Hospital Doctor Josep Trueta
    I. Gerard Pardo
12. Biobanco del Hospital del Mar
    I. Beatríz Bellosillo
13. Biobanco del Hospital Joan XXIII
    I. Lluis Gallart Millán
14. Biobanco del Hospital Clínic – IDIBAPS
    I. Anna Bosch
15. Biobanco del Complejo Hospitalario Universitario de La Coruña
    I. Nieves Doménech García

16. Biobanco del Hospital Virgen de la Arrixaca
    I. Rosario Martínez Marín
17. Biobanco de la Clínica Universidad de Navarra
    I. Mª Antonia Fortuño Cebamanos
18. Biobanco del Hospital de Navarra
    I. Isabel Gil Adea
19. Biobanco del Hospital Universitario San Cecilio
    I. Inés Aroca Siendones
20. Biobanco Vasco para la Investigación-nodo CVTTH
    I. Clara Rodríguez

Posteriormente, se unirían nuevos biobancos y nuevos miembros a este grupo de trabajo, hasta quedar constituido por 24 biobancos y 29 miembros:

20. Biobanco del Hospital Clínico de Valencia (INCLIVA)– Incorporación: Noviembre de 2011
    I. Rebeca Hilario Barberá
21. Biobanco del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) – Incorporación: Enero de 2012
    I. Virginia Corrochano
    II. Salvador Martí
22. Biobanco del Centro de Hemoterapia y Hemodonación de CyL – Incorporación: Enero de 2012
    I. Sonia Pérez
23. Banco Nacional de ADN Carlos III. Universidad de Salamanca-Incorporación: Noviembre de 2012
    I. María Almeida Parra

Nuevos miembros adicionales:

- Carolina Abril. Biobanco Centro Superior de Investigación en Salud Pública (CSISP).
- Antía Solloso. Biobanco del Complejo Hospitalario Universitario de La Coruña.
- Verónica Fernández. Biobanco del Hospital Clínico de Barcelona (IDIBAPS).
- Mª Jesús García Salgado y Carmen Martín Seisdedos. Biobanco del Hospital Universitario de Salamanca.
- Miriam Campos. Biobanco del Hospital Joan XXIII.

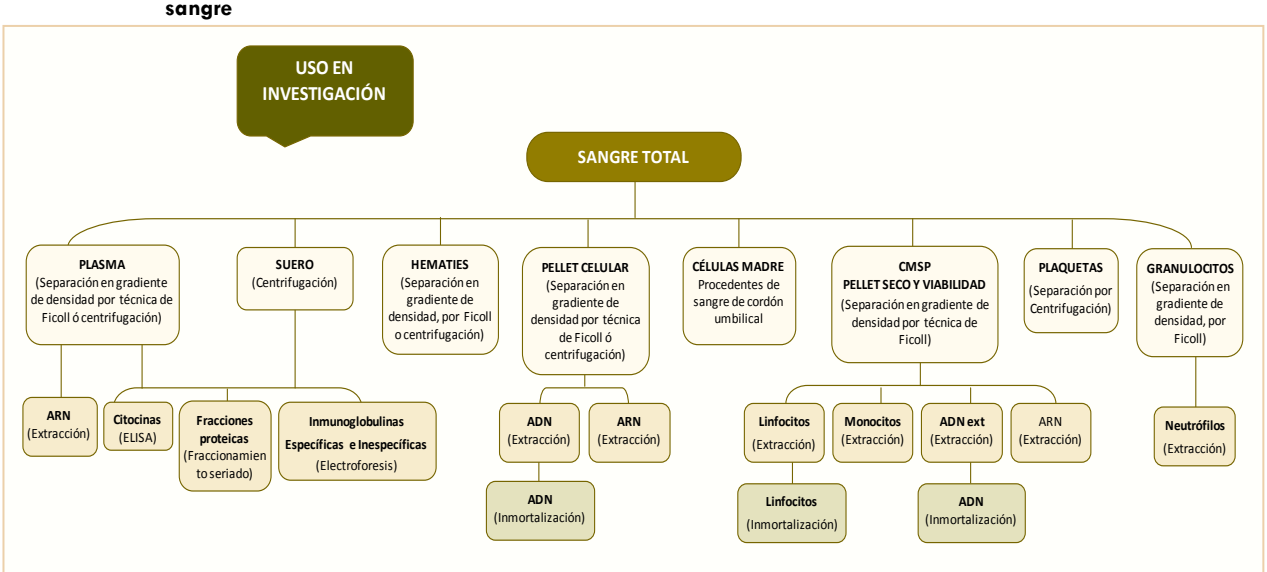
Bajas de miembros:

- Antía Solloso. Biobanco del Complejo Hospitalario Universitario de La Coruña.
- Alfonso Monje. Biobanco de los Servicios de Salud del Hospital San Juan de Dios.
- Carmen Martín Seisdedos. Biobanco del Hospital Universitario de Salamanca.

ESQUEMA Y DISTRIBUCIÓN DE DERIVADOS HEMÁTICOS EN LOS BIOBANCOS

Como primera acción del grupo de trabajo, se realizó un esquema de todo lo que debería entenderse como "derivado hemático" y así poder definir todos aquellos elementos que puedieran considerarse como tales y que debían ser incluidos en la actividad del grupo. Como resultado se obtuvo el esquema 1, que recoge todos aquellos elementos obtenidos a partir de una muestra sanguínea, y su categorización, ya sea dentro de un uso clínico o en investigación.

Esquema 1. Distribución de los componentes que pueden obtenerse a partir de una muestra de sangre



Una vez definidos todos los componentes que se pueden encontrar almacenados en un biobanco, el siguiente paso fue obtener una instantánea de cómo se encontraba definido el grupo de "Derivados Hemáticos", pudiendo conocer la composición y la experiencia de cada uno de los biobancos participantes en el esquema 2.

Esquema 2. Distribución de los derivados hemáticos almacenados por centro perteneciente al grupo de trabajo

TIPO DE MUESTRAS CRIOPRESERVADAS										
HOSPITAL	SANGRE TOTAL	SUERO	PLASMA	PELLET	CMSP	LINFOCITOS B	ERITROCITOS	LIQUIDO CEFALORRAQIDEO	ADN	ARN
Biobanco VIH-HGM										
CIBERER										
Complejo Hospitalario de la Coruña										
Biobanc HBC-IDIBAPS										
H. Marqués de Valdecilla-IFIMAV										
Universidad de Navarra										
Hospital Germans Trias i Pujol										
Hospital de Navarra										
Hospital Central de Asturias										
Hospital Carlos Haya										
H. Virgen de la Macarena de Sevilla										
Biobanco Vasco para la Investigación										
Hospital del Mar										
Hospital Virgen de la Arriaca										
Hospital Clínico San Cecilio										
Biobanco de Salamanca										
Hospital Joan XIII										
Hospital Dr. Josep Trueta										
Banco de ADN de Salamanca										
Hospital Miguel Servet										
CSISP										
BioBanco del Hospital de Lleida (IRBLleida)										

Nota: El color verde representa las muestras hemáticas almacenadas. El color rojo representa las muestras hemáticas no almacenadas.

METODOLOGÍA DE TRABAJO

A continuación, se definió la metodología de trabajo que se iba a adoptar para el desarrollo y funcionamiento del grupo. Dicho protocolo se concretó en el establecimiento de 2 reuniones anuales presenciales, un trabajo telemático en red (e-mail, teléfono, skype ...) y una segmentación en subgrupos de trabajo basados en aquellos miembros con mayor experiencia en cada uno de los temas. Los trabajos producidos por cada subgrupo fueron revisados por el resto de miembros y por la coordinadora, y tras la aprobación general se dieron por consensuados y se dejaron disponibles por correo electrónico o en la http://www.redbiobancos.es a la gestión de la RNBB.

Se llevaron a cabo 6 reuniones presenciales, 2 al año, teniendo todas ellas lugar en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón. La asistencia a las reuniones osciló entre un 84 a un 42% de seguimiento, con una media del 65%, lo que supone un trabajo conjunto de 19 miembros a lo largo de una jornada completa. En el desarrollo de las mismas se sometieron a discusión y análisis tanto los objetivos propuestos por la comisión ejecutiva de la RNBB, como aquellos elementos clave que en la propia actividad de biobanco generan alguna necesidad de consulta, así como cualquier problemática concreta que alguno de los miembros planteara. Este método de discusión y consulta activa permitió no sólo responder a las cuestiones planteadas en el momento de la formación, sino también plantear nuevas preguntas y definir nuevos horizontes que posibilitaron el diseño de proyectos de investigación en el área concreta de los derivados hemáticos y la escritura de artículos.

Como resultado del trabajo desarrollado por los miembros del grupo de "Derivados Hemáticos" se han generado los siguientes documentos que se

encuentra en el Anexo 1 de este libro y en la página web de la Plataforma "Red BioBancos" http://www.redbiobancos.es.

PNT Obtención de muestras sanguíneas

PNT Obtención, procesado y almacenaje de CMSP

PNT Obtención, procesado y almacenaje de eritrocitos

PNT Obtención, procesado y almacenaje de líquido cefalorraquídeo

PNT Obtención, procesado y almacenaje de líquido pleural

PNT Obtención, procesado y almacenaje de muestras de plasma

PNT Obtención, procesado y almacenaje de muestras de suero

PNT Obtención, procesado y almacenaje de muestras de sangre total

Hoja de recogida de datos

Criterios de calidad para derivados hemáticos (controles internos y externos)

Todos estos documentos también están disponibles en inglés en http://www.redbiobancos.es

También se consiguió financiación en la convocatoria Nacional de Proyectos de Investigación del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) del proyecto:

- *Búsqueda de indicadores para evaluar la calidad de muestras de plasma almacenadas en los biobancos y determinar su adecuación a los métodos analíticos proteómicos*. PROYECTO DE INVESTIGACIÓN MULTICÉNTRICO: Red de Biobancos (Grupo derivados hemáticos), ProteoRED (Plataforma de Proteómica). Convocatoria Inst. Carlos III. PI12/02670. (Convocatoria FIS 2012). Aprobado en Diciembre de 2012. Investigador Principal: Nieves Donenech García.
- El proyecto está en marcha y ha pasado las correspondientes Memorias científicas del ISCIII.

Como resultado del trabajo desarrollado se definieron los siguientes objetivos:

- Redacción y edición de este libro de consulta con toda la operativa relativa al trabajo en derivados hemáticos:
    - Procedimiento normalizado de trabajo (PNT)
    - Criterios de trabajo según la muestra y el estudio destinado
        - Controles de calidad internos
        - Plasma, suero
        - Células mononucleares de sangre periférica
        - Eritrocitos
        - ADN, ARN

- Controles de calidad interbiobanco
- Plasma rico en plaquetas, plasma rico en factores de crecimiento y lisado plaquetar
- Interferencia en las muestras sanguíneas por hemólisis, lipemia e ictericia

– Redacción de artículos científicos en relación a la criopreservación de céulas mononuclares de sangre periférica, y su publicación en revistas científicas especializadas en el campo de los biobancos (submited in "biobanking and biopreservation").

– Redacción de artículos científicos en relación a la elaboración de protocolos normalizados de trabajo sobre derivados hemáticos en Red, y su publicación en revistas científicas especializadas en el campo de los biobancos (submited in "biobanking and biopreservation").

– Redacción de artículos científicos basados en los futuros resultados obtenidos a partir de la consecución del proyecto "Búsqueda de indicadores para evaluar la calidad de muestras de plasma almacenadas en los biobancos y determinar su adecuación a los métodos analíticos proteómicos".

– Presentación de un proyecto de investigación basado en el testaje de medios de cultivo que no contienen suero fetal bovino en la criopreservación de células mononucleares de sangre periférica. Proyecto presentado en la convocatoria del año 2014.

De esta manera, se han cerrado y cumplido todos los objetivos propuestos inicialmente por la Comisión Ejecutiva de la RNBB, y se han proyectado nuevos objetivos a corto, medio y largo plazo. Estos objetivos permiten que la Red y los biobancos adscritos a la misma evolucionen dinámicamente mediante la respuesta a preguntas concretas y a la generación de nuevos horizontes que puedan adecuarse tanto a las necesidades futuras del personal perteneciente a los biobancos, como a los investigadores que se nutren del trabajo desarrollado en los mismos.

La Plataforma "Red de BioBancos" promueve una gestión profesionalizada de sus servicios, colecciones de muestras y datos de alto valor estratégico y la realización de actividades de I+D+i en el campo de los biobancos.

CAPÍTULO 2

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO

Mª Isabel García Sánchez

Inés Santiuste

María Ruiz

Coordinadora del capítulo: Mª Antonia Fortuño

INTRODUCCIÓN

En la literatura científica se encuentran a menudo discrepancias en los resultados de investigación, lo que implica la validación constante de ciertos resultados, incluso a veces, la divergencia de opinión entre investigadores. Este hecho ha cobrado especial importancia en los últimos años con el uso de las plataformas analíticas de alto rendimiento, ya que se ha hecho evidente la necesidad de estandarizar los procedimientos de obtención de muestras y análisis, y optimizar los ensayos biológicos con el fin de obtener una información homogénea entre los diferentes laboratorios, que permita extrapolar los resultados de investigación a la población general.

Las diferencias observadas entre estudios pueden estar causadas por distintos tipos de variables, como son la variabilidad biológica (interindividual e intraindividual) y las variables analíticas en los ensayos biológicos. Dentro de las variables denominadas analíticas, los factores modificadores de resultados se hallan en el preanálisis, el análisis en sí y el post-análisis. El control de estas variables es imprescindible para minimizar las fuentes de la desviación producida en los resultados como consecuencia de la variabilidad biológica. De los tres niveles de variabilidad mencionados, la fase preanalítica es la que genera más puntos de incertidumbre y mayor dificultad para su control. De hecho, muchos de los errores cometidos en los laboratorios de análisis clínicos cuando se lleva a cabo una medición precisa en la concentración de un determinado analito, son debidos a factores preanalíticos, pudiendo causar hasta el 60% de los mismos en determinados biofluidos como el líquido cefalorraquídeo.

Mientras que la imprecisión, el error sistemático y el error total de los procedimientos utilizados en un laboratorio están tipificados, son evaluables, acotados y asumidos por los mismos, formando parte de las especificaciones de calidad del propio laboratorio, la variabilidad en la fase preanalítica es un problema que se traslada a cualquier tipo de investigación, y es dependiente a su vez de muchos factores.

FASE PREANALÍTICA

La fase preanalítica es el conjunto de procesos que se llevan a cabo desde el momento en que se origina una petición del médico facultativo hasta que se inicia el análisis de la muestra ya transformada. Se define como variable preanalítica aquella variación que tiene lugar desde el momento de obtención de la muestra hasta el momento de su análisis.

Aunque la importancia de controlar las variables preanalíticas debe ser uno de los principales objetivos de cualquier laboratorio clínico, es dentro de este contexto donde los biobancos adquieren una importancia especial. Su principal función "como una unidad técnica con criterios de calidad, orden y destino" hace del biobanco un establecimiento comprometido a la implantación de las pautas adecuadas para eliminar, en la medida de lo posible, la asociación que existe entre la divergencia de resultados en los ensayos biológicos y las cualidades de las muestras con las que se trabaja.

La fase preanalítica está relacionada directamente con dos conceptos de calidad de una muestra: 1) su *representatividad* o capacidad para informar acerca del estado biológico del individuo del que se obtuvo (inherente al valor de la muestra), y 2) la *estabilidad* de la misma, entendida como la capacidad para preservar el valor inicial de un constituyente dentro de un límite específico, en un tiempo definido y mantenido en unas condiciones determinadas.

Las variables preanalíticas pueden tener un mayor o menor impacto en los resultados, pero sí parece claro que los estudios de las principales "ómicas" son los más afectados por estas variaciones preanalíticas debido, entre otras cosas, a la alta sensibilidad que presentan las técnicas que se utilizan en este tipo de investigaciones. Especialmente en las plataformas de proteómica y metabolómica siendo las más estudiadas a este respecto. En la tabla 1 se muestra la procedencia de distintas variables preanalíticas.

Tabla 1. Variables preanalíticas de impacto en los resultados de análisis biológicos

- ***De extracción:***
  - La correcta identificación del donante
  - Tiempos de isquemia caliente y fría en procesos quirúrgicos
  - El método de obtención de la muestra
    - Técnica de extracción
    - El punto de extracción puede alterar la obtención del espécimen requerido: venopunción, arterias o capilares, espacio subaracnoideo
  - La postura del sujeto
    - La concentración de determinados metabolitos puede variar según la postura en que se encuentre el sujeto en el momento de la extracción de la muestra

- El momento de la toma de muestra
  - Hora del día
  - Estación del año

– ***Del especimen***:

- La identificación correcta de la muestra
  - Su identidad debe ser inequívoca
- El tipo de muestra
  - Escoger el mejor tipo de muestra representativa de lo que se pretende analizar. Una muestra mal elegida será una variable preanalítica con alto impacto de error en el análisis posterior
  - El material empleado en la extracción y recolección de la muestra debe ser el apropiado para su finalidad (tipo de aguja, tipo de tubo…)
- Las características del sujeto
  - Se necesitan unos datos mínimos previos a la extracción
- La preparación del sujeto
  - Recomendaciones para el estudio de determinados perfiles analíticos (ayuno, curvas de glucosa, anestesia, etc)
- El transporte de la muestra
  - Se debe realizar en los contenedores adecuados y a la temperatura en la que la preservación de la integridad sea más elevada
- La transformación de la muestra
  - Pre-centrifugación, centrifugación y post-centrifugación en el caso de derivados hemáticos
  - Pre-fijación, fijación y post-fijación en el caso de muestras sólidas
  - Ciclos de congelación-descongelación
- Las interferencias
  - Entendida como el error sistemático producido por un interferente en un proceso analítico

– ***De estabilidad***:

- Tiempo transcurrido desde la obtención a la transformación y preservación de la muestra

- Condiciones y tiempo de almacenamiento

Una de las medidas que pueden tomarse para disminuir el impacto de las variables preanalíticas, es la utilización de consensos o guías establecidas por paneles de expertos, y/o documentos estandarizados de actuación frente a estos factores. Así, en la literatura científica se pueden encontrar artículos que pretenden homogeneizar los procedimientos en determinadas áreas de investigación, para llegar a una mayor reproducibilidad y validación de resultados.

En la literatura encontramos artículos que hacen referencia al impacto de las variables preanalíticas en las muestras derivadas de la sangre, pero su estudio se hace de forma independiente y asociando la optimización de estas variables a un biorrecurso específico y a la realización de un determinado análisis u obtención.

Desde este punto de vista, la RNBB y el grupo de Derivados Hemáticos en particular, han trabajado intensamente para conseguir un objetivo que es la armonización de protocolos a nivel nacional, relacionados con las actuaciones que se realizan en la fase preanalítica de muestras derivadas de sangre. También se han estudiado y adaptado estos procedimientos para la obtención del líquido cefalorraquídeo y líquido pleural por la importancia que actualmente están tomando estas muestras biológicas en los estudios de investigación relacionados con las patologías neurológicas y de la pleura.

El resultado de este trabajo se ha visto reflejado en la realización de 8 Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT), que han sido a su vez traducidos al inglés y expuestos a través de la página web de la RNBB a disposición de los biobancos y de toda la comunidad Científica.

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO

I. ¿QUÉ ES UN PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO?

Un procedimiento se puede definir como el conjunto de acciones u operaciones que se realizan de igual manera con el objetivo de obtener siempre un mismo resultado bajo las mismas circunstancias. Los PNT son, por tanto, los documentos escritos que describen la secuencia específica de operaciones y métodos que deben aplicarse para una finalidad concreta.

En el caso de los laboratorios existen referencias normativas desde hace más de una década que avalan el uso de los PNT como parte integrante de la garantía de calidad que ofrecen. Así la Norma EN 4500, Sección 5, Apartado 5.4, especifica que "El laboratorio de biobanco dispondrá de las adecuadas instrucciones escritas sobre la utilización y el funcionamiento de todos los equipos pertinentes, sobre la preparación y manipulación de los objetos sometidos a ensayo, y sobre las técnicas de ensayo normalizadas (...). Cuando sea necesario utilizar métodos de ensayo y procedimientos no normalizados, éstos deberán estar completamente descritos en documentos".

En la Directiva 1999/11/CE de la Comisión, de 8 de marzo de 1999 por la que se adaptan al progreso técnico los principios de buenas prácticas de laboratorio que se especifican en la Directiva 87/18/CEE, en el Apartado 7 de su Sección II,

ya se indicaba que "todo laboratorio de biobanco deberá contar con unos PNT escritos y aprobados por la dirección del biobanco, dirigidos a garantizar la calidad e integridad de los datos obtenidos por el laboratorio. Las revisiones de los mismos deberán ser aprobadas por la dirección del biobanco. Toda unidad o área separada del laboratorio deberá tener disponible inmediatamente los PNT vigentes relacionados con las actividades que en ellas se realizan, etc".

Más recientemente las Normas ISO 9000 (ISO 9001:2008) incorporan los PNT como requisito de documentación en la implantación de los sistemas de Gestión de Calidad.

En el caso de los biobancos, estos PNT tienen una especial importancia pues su cumplimiento está relacionado directamente con la calidad de las muestras que preservan, y con el hecho de cumplir uno de sus principales objetivos que es lograr la reproducibilidad de la experimentación y la validación de los resultados.

II. OBJETIVOS DE LOS PROTOCOLOS NORMALIZADOS DE TRABAJO REALIZADOS POR EL GRUPO DE DERIVADOS HEMÁTICOS

Las muestras almacenadas en los biobancos están siendo cada vez más utilizadas por los investigadores para la identificación y validación de biomarcadores. De hecho, el garante de calidad que imprime la gestión de los biobancos hace que las muestras que conservan se destinen a estos estudios, enfocados principalmente a la investigación de patologías de etiología desconocida y/o sin biomarcadores específicos definidos que permitan identificar la evolución del paciente o la efectividad de un tratamiento.

La mayor o menor utilidad de estos biomarcadores y su fiabilidad va a depender en gran medida de las variaciones preanalíticas de las muestras que hayan sido utilizadas para su identificación inicial. Esto implica que la garantía de calidad es especialmente importante en el desarrollo de estos proyectos de investigación, ya que nos permitirá establecer una correlación directa entre el PNT elegido en la obtención de una muestra, y el resultado obtenido en el desarrollo de la investigación. La obtención de biomarcadores fiables y de alto beneficio para el conjunto de los pacientes nos permitirá identificar los métodos de procesamiento óptimos para cada una de las muestras almacenadas en los biorrepositorios.

Como se observa en la tabla 1 hay muchas variables preanalíticas que pueden alterar el resultado de un análisis. Desde el grupo de Derivados Hemáticos se ha llevado a cabo una evaluación de las variables preanalíticas más comunes en la obtención de muestras derivadas de la sangre y otros biofluidos, con la finalidad de optimizar su acción en la práctica diaria, para que su influencia en los resultados sea mínima.

Los objetivos de la elaboración de los PNT por el grupo de Derivados Hemáticos han sido:

- Armonizar los procedimientos generales de obtención de muestras derivadas de sangre para la comunidad de biobancos que forman parte de la RNBB.
- Establecer los requisitos mínimos de calidad para la obtención de muestras derivadas hemáticas incluidas en los biorrepositorios

- Garantizar el registro de los datos mínimos de las muestras
- Facilitar el seguimiento y el control de las acciones realizadas para la obtención de este tipo de muestras
- Posibilitar el estudio de datos comparativos intra- e interlaboratorios
- Agilizar la identificación de errores de procedimiento para su optimización
- Establecer una guía o código de buenas prácticas sobre la obtención de derivados hemáticos útil para los biobancos y para la comunidad científica

Los PNT del grupo de Derivados Hemáticos establecen los criterios mínimos para la obtención de muestras de calidad de origen sanguíneo y otros biofluidos. Son procedimientos generales que tienen en cuenta la realidad de los biobancos españoles, y en los que se aconseja para la optimización de los procedimientos, determinadas pautas que imprimen la calidad mínima necesaria a la muestra final.

III. REDACCIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE TRABAJO

Para la redacción de los PNT del grupo de Derivados Hemáticos se han establecido normas específicas y criterios generales de elaboración con el fin de facilitar su estructura, formato, redacción y homogeneidad.

Todos mantienen un formato único, una portada y un índice general. Este índice se ha desarrollado en mayor o menor grado dependiendo de las características del espécimen y de las variables preanalíticas que más afecten a la obtención de cada derivado hemático en concreto. En la Tabla 2 se pueden observar los apartados establecidos para los PNT desarrollados por el grupo.

Tabla 2. ÍNDICE de los Procedimientos normalizados de trabajo

1. ABREVIATURAS.....
2. DEFINICIONES.....
3. OBJETO.....
4. ALCANCE.....
5. MATERIALES Y SERVICIOS.....
6. DESARROLLO.....
7. DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA.....
8. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA.....

Los PNT se han redactado de forma clara y concisa para su fácil comprensión y evitar variaciones en su interpretación.

En caso necesario, las tablas, esquemas y figuras de interés se han incluido en documentos ANEXOS. El cuadro de control de cambios se puede observar en la portada de cada uno de los PNT, en él se señalan las distintas versiones del procedimiento y una descripción general del mismo: título, grupo de realización, aprobación, fecha de entrada en vigor y fecha de modificación.

IV. ELABORACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE TRABAJO

La elaboración de los PNT se ha realizado mediante la creación de grupos de trabajo. Los diferentes grupos se han formado en función del tipo de circuitos de recogida de muestras derivadas de sangre establecidos en cada uno de los biobancos que integran el grupo de Derivados Hemáticos de la RNBB.

En estos PNT se recoge el consenso al que se ha llegado sobre el procedimiento mínimo de calidad exigido para la incorporación de las distintas muestras hemáticas al biobanco. Para ello se han estudiado los diferentes protocolos de trabajo que se utilizan o utilizaban en el grupo de biobancos integrados en la RNBB del ISCIII, representados por los miembros del Grupo de Derivados Hemáticos, para la obtención de cada uno de los derivados de sangre objeto de los PNT. Además, en la elaboración se ha tenido en cuenta la literatura científica relacionada más actual, así como las guías generales ya establecidas y los consensos específicos por los paneles de expertos para la obtención de derivados hemáticos.

El resultado del trabajo desarrollado se refleja en la elaboración de 8 PNT que componen un código de buena práctica y ayuda a establecer una calidad equivalente en las muestras derivadas de la sangre y otros biofluidos en los distintos biobancos que forman parte de la RNBB.

La idoneidad de estos procedimientos, así como la aplicación de los mismos, será diferente de unos biobancos a otros. Este hecho dependerá del material con el que cuente la plataforma y de la posibilidad de tener o no circuitos específicos para la obtención de dichas muestras, los cuales permiten un mayor control sobre las variables preanalíticas.

Destacar que el grado de exigencia en cuanto a calidad de las muestras será un factor clave en la diferenciación de los biobancos. No obstante, estos PNT permiten unificar criterios de trabajo y tenerlos disponibles en el momento en que puedan ser efectivos. Aseguran a su vez los requerimientos mínimos de calidad de las muestras, conformando así en el panel nacional de biobancos una colección de muestras derivadas hemáticas y otros biofluidos recogidas en base a directrices básicas comunes de actuación en su obtención, manejo y procesamiento, lo que permite por tanto obtener muestras comparables entre sí.

Los 8 PNT que componen la guía son:

1. PNT para la obtención de Células Mononucleares de Sangre Periférica
2. PNT para la obtención de Eritrocitos
3. PNT para la obtención de Líquido Cefalorraquídeo
4. PNT para la obtención de Muestras Sanguíneas
5. PNT para la obtención de Plasma
6. PNT para la obtención de Sangre Total
7. PNT para la obtención de Suero
8. PNT para la obtención de Líquido Pleural

V. APORTACIONES DE LOS PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE TRABAJO

Todas las iniciativas que se lleven a cabo para armonizar los procedimientos y conseguir gestionar las muestras de la manera más homogénea posible, serán las que aporten reconocimiento al trabajo de los biobancos, contribuyendo directamente en el avance de la investigación traslacional, y aportando soluciones a su máximo beneficiario que es el paciente.

A este respecto la creación del International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER) Biospecimen Science Working Group es un punto de encuentro muy importante para la creación de un mismo sistema de información entre la comunidad de biobancos. Este grupo responsable de la recopilación de la literatura más relevante y actual en materia de muestras biológicas de origen humano, provee a los biobancos de una información de gran utilidad. Los trabajos publicados por el grupo son de amplia aplicación destacando entre ellos "Human Biospecimen research: experimental protocol and quality control tools" de Fotini Betsou et al. en el que se estudia las variables analíticas y el impacto que puedan tener en los resultados y el desarrollo del "Standar PREanalytical Code" (SPREC) para facilitar la comunicación de los parámetros pre-analíticos más importantes que influyen en la calidad de los diferentes bioespecímenes que se utilizan en investigación. El sistema de codificación SPREC es una herramienta para el uso de un mismo lenguaje en todos los biobancos, y una manera muy ágil de evaluar las distintas variables preanalíticas que pueden influir en una muestra en concreto.

El grupo de Derivados Hemáticos con el desarrollo de esta guía de PNT pretende alcanzar un equilibrio en la calidad de las colecciones de derivados hemáticos almacenadas en los biobancos españoles, que permita el desarrollo óptimo de los proyectos de investigación multicéntricos y la validación de biomarcadores clínicamente relevantes (Anexo I).

Bibliografía

1. AHMAD S, SUNDARAMOORTHY E, ARORA R, SEN S, KARTHIKEYAN G, SENGUPTA S. PROGRESSIVE DEGRADATION OF SERUM SAMPLES LIMITS PROTEOMIC BIOMARKER DISCOVERY. ANAL BIOCHEM. 2009 NOV 15;394(2):237-42. DOI: 10.1016/J.AB.2009.07.029. EPUB 2009 JUL 24. PUBMED PMID: 19632190.
2. CAMPO DEL M, MOLLENHAUER B, BERTOLOTTO A, ENGELBORGHS S, HAMPEL H, SIMONSEN AH, KAPAKI E, KRUSE N, LE BASTARD N, LEHMANN S, MOLINUEVO JL, PARNETTI L, PERRET-LIAUDET A, SÁEZ-VALERO J, SAKA E, URBANI A, VANMECHELEN E, VERBEEK M, VISSER PJ, TEUNISSEN C. RECOMMENDATIONS TO STANDARDIZE PREANALYTICAL CONFOUNDING FACTORS IN ALZHEIMER'S AND PARKINSON'S DISEASE CEREBROSPINAL FLUID BIOMARKERS: AN UPDATE. BIOMARK MED. 2012 AUG;6(4):419-30. DOI: 10.2217/BMM.12.46.
3. CARRARO P, PLEBANI M. ERRORS IN A STAT LABORATORY: TYPES AND FREQUENCIES 10 YEARS LATER. CLIN CHEM 2007; 53:1338–42. PUBMED DOI: 10.1373/CLINCHEM.2007.088344.
4. CHANCE J, BERUBE J, VANDERSMISSEN M, BLANCKAERT N. EVALUATION OF THE BD VACUTAINER PST II BLOOD COLLECTION TUBE FOR SPECIAL CHEMISTRY ANALYTES. CLIN CHEM LAB MED. 2009;47(3):358-61. PUBMED PMID: 19676149.
5. CHARLOTTE E. TEUNISSEN, HAYRETTIN TUMANI, JEFFREY L. BENNETT, FRODE S. BERVEN, LOU BRUNDIN, MANUEL COMABELLA, DIEGO FRANCIOTTA, JETTE L. FEDERIKSEN, JOHN O. FLEMING, ROBERTO FURLAN, ROGIER Q. HINTZEN, STEVE G. HUGHES, CONNIE R. JIMENEZ, MICHAEL H. JOHNSON, JOEP KILLESTEIN, EVA KRASULOVA, JENS KUHLE, MARIA-CHIARA MAGNONE, AXEL PETZOLD, CECILIA RAJDA, KONRAD REJDAK, HOLLIE K. SCHMIDT, VINCENT VAN PESCH, EMMANUELLEWAUBANT, CHRISTIANWOLF, FLORIAN DEISENHAMMER, GAVIN GIOVANNONI, AND BERNHARD HEMMER. REVIEW ARTICLE: CONSENSUS GUIDELINES FOR CSF AND BLOOD BIOBANKING FOR CNS BIOMARKER STUDIES

Hindawi Publishing Corporation. Multiple Sclerosis International Volume 2011, Article ID 246412, 9 pages. doi:10.1155/2011/246412.

6. Christenson RH, Duh SH. Methodological and analytic considerations for blood biomarkers. Prog Cardiovasc Dis. 2012 Jul-Aug;55(1):25-33. doi: 10.1016/j.pcad.2012.05.001.
7. Ferguson RE, Hochstrasser DF, Banks RE. Impact of preanalytical variables on the analysis of biological fluids in proteomic studies. Proteomics Clin Appl. 2007 Aug; 1(8):739-46. doi: 10.1002/prca.200700380. Epub 2007 Jul 10.
8. Ferguson RE, Hochstrasser DF, Banks RE. Impact of preanalytical variables on the analysis of biological fluids in proteomic studies. Proteomics Clin Appl. 2007 Aug;1(8):739-46. doi: 10.1002/prca.200700380. Epub 2007 Jul 10.
9. Fotini Betsou, Rebecca Barnes, Thomas Burke, Domenico Coppola, Yvonne DeSouza, James Eliason, Barbara Glazer, David Horsfall, Cynthia Kleeberger, Sylvain Lehmann, Anil Prasad, Amy Skubitz, Stella Somiari, and Elaine Gunter [International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER) Working Group on Biospecimen Science] Human Biospecimen Research: Experimental Protocol and Quality Control Tools. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2009;18:1017-1025.
10. Genetics, A. C. o. M. (2006). "Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories".
11. Lippi G, Guidi GC, Mattiuzzi C, Plebani M. Preanalytical variability: the dark side of the moon in laboratory testing. Clin Chem Lab Med 2006;44:358–65. PubMed doi: 10.1515/CCLM.2006.073.
12. Lista S, Faltraco F, Hampel H. Biological and methodical challenges of blood-based proteomics in the field of neurological research. Prog Neurobiol. 2013 Feb;101-102:18-34. doi: 10.1016/j.pneurobio.2012.06.006. Epub 2012 Jun 26. PubMed PMID: 22743551.
13. Marko-Varga G, Végvári Á, Welinder C, Lindberg H, Rezeli M, Edula G, Svensson KJ,Belting M, Laurell T, Fehniger TE. Standardization and utilization of biobank resources in clinical protein science with examples of emerging applications. J Proteome Res. 2012 Nov 2;11(11):5124-34. doi: 10.1021/pr300185k. Epub 2012 May 25.
14. Moore HM, Kelly A, Jewell SD, McShane LM, Clark DP, Greenspan R, Hainaut P, Hayes DF, Kim P, Mansfield E, Potapova O, Riegman P, Rubinstein Y, Seijo E, Somiari S, Watson P, Weier HU, Zhu C, Vaught J. Biospecimen Reporting for Improved Study Quality. Biopreserv Biobank. 2011 Apr;9(1):57-70.
15. Palmirotta R, De Marchis ML, Ludovici G, Leone B, Savonarola A, Ialongo C, Spila A, De Angelis F, Ferroni P, Della-Morte D, Guadagni F. Impact of preanalytical handling and timing for peripheral blood mononuclear cells isolation and RNA studies: the experience of the Interinstitutional Multidisciplinary BioBank (BioBIM). Int J Biol Markers. 2012 Jul 19;27(2):e90-8. doi: 10.5301/JBM.2012.9235. PubMed PMID: 22562396.
16. Rai AJ, Vitzthum F. Effects of preanalytical variables on peptide and protein measurements in human serum and plasma: implications for clinical proteomics. Expert Rev Proteomics. 2006 Aug;3(4):409-26.
17. Sabine Lehmann, Fiorella Guadagni, Helen Moore, Garry Ashton, Michael Barnes, Erica Benson, Judith Clements, Iren Koppandi, Domenico Coppola, Sara Yasemin Demiroglu, Yvonne DeSouza, Annemieke De Wilde, Jacko Duker, James Eliason, Barbara Glazer, Keith Harding, Jae Pil Jeon, Joseph Kessler, Theresa Kokkat, Umberto Nanni, Kathi Shea, Amy Skubitz, Stella Somiari, Gunnel Tybring, Elaine Gunter, Fotini Betsou [International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER) Working Group on Biospecimen Science] Standard Preanalytical Coding for Biospecimens: Review and Implementation of the Sample PREanalytical Code (SPREC). Biopreservation and Biobanking. August 2012:366-374.
18. Teunissen CE, Petzold A, Bennett JL, Berven FS, Brundin L, Comabella M, Franciotta D, Frederiksen JL, Fleming JO, Furlan R, Hintzen RQ, Hughes SG, Johnson MH, Krasulova E, Kuhle J, Magnone MC, Rajda C, Rejdak K, Schmidt HK, van Pesch V, Waubant E, Wolf C, Giovannoni G, Hemmer B, Tumani H, Deisenhammer F. A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking. Neurology. 2009 Dec 1;73(22):1914-22. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181c47cc2.
19. Teunissen CE, Tumani H, Bennett JL, Berven FS, Brundin L, Comabella M, Franciotta D, Federiksen JL, Fleming JO, Furlan R, Hintzen RQ, Hughes SG, Jimenez CR, Johnson MH, Killestein J, Krasulova E, Kuhle J, Magnone MC, Petzold A, Rajda C, Rejdak K, Schmidt HK, van Pesch V, Waubant E, Wolf C, Deisenhammer F, Giovannoni G, Hemmer B. Consensus

GUIDELINES FOR CSF AND BLOOD BIOBANKING FOR CNS BIOMARKER STUDIES. MULT SCLER INT. 2011;2011:246412. DOI: 10.1155/2011/246412. EPUB 2011 JUL 18.

20. TROYER D. BIOREPOSITORY STANDARDS AND PROTOCOLS FOR COLLECTING, PROCESSING, AND STORING HUMAN TISSUES. METHODS MOL BIOL 2008;441:193-220.
21. TUCK MK, CHAN DW, CHIA D, GODWIN AK, GRIZZLE WE, KRUEGER KE, ROM W, SANDA M, SORBARA L, STASS S, WANG W, BRENNER DE STANDARD OPERATING PROCEDURES FOR SERUM AND PLASMA COLLECTION: EARLY DETECTION RESEARCH NETWORK CONSENSUS STATEMENT STANDARD OPERATION PROCEDURE INTEGRATION WORKING GROUP. J PROTEOME RES 2009;8:113-117.
22. VANDERSTICHELE H, BIBL M, ENGELBORGHS S, LE BASTARD N, LEWCZUK P, MOLINUEVO JL, PARNETTI L, PERRET-LIAUDET A, SHAW LM, TEUNISSEN C, WOUTERS D, BLENNOW K. STANDARDIZATION OF PREANALYTICAL ASPECTS OF CEREBROSPINAL FLUID BIOMARKER TESTING FOR ALZHEIMER'S DISEASE DIAGNOSIS: A CONSENSUS PAPER FROM THE ALZHEIMER'S BIOMARKERS STANDARDIZATION INITIATIVE. ALZHEIMERS DEMENT. 2012 JAN;8(1):65-73. DOI: 10.1016/J.JALZ.2011.07.004. EPUB 2011 NOV 2. REVIEW. PUBMED PMID: 22047631.
23. YIN P, PETER A, FRANKEN H, ZHAO X, NEUKAMM SS, ROSENBAUM L, LUCIO M, ZELL A, HÄRING HU, XU G, LEHMANN R.5. PREANALYTICAL ASPECTS AND SAMPLE QUALITY ASSESSMENT IN METABOLOMICS STUDIES OF HUMAN BLOOD. CLIN CHEM. 2013 MAY;59(5):833-45. DOI: 10.1373/CLINCHEM.2012.199257. EPUB 2013 FEB 5.
24. YI J, CRAFT D, GELFAND CA. MINIMIZING PREANALYTICAL VARIATION OF PLASMA SAMPLES BY PROPER BLOOD COLLECTION AND HANDLING. METHODS MOL BIOL. 2011;728:137-49. DOI: 10.1007/978-1-61779-068-3_8. PUBMED PMID: 21468945.

CAPÍTULO 3

CRITERIOS DE TRABAJO SEGÚN LA MUESTRA Y EL ESTUDIO DESTINADO

CRITERIOS DE TRABAJO SEGÚN LA MUESTRA Y EL ESTUDIO DESTINADO

Salvador Martí Pérez

Carol Abril Tomo

Anna Bosch Comas

Coordinadora del capítulo: Clara Rodríguez Ayerbe

INTRODUCCIÓN

El creciente desarrollo de colecciones biológicas y biobancos han facilitado a los investigadores el acceso a gran cantidad de muestras biológicas. Éstas contienen información de características del donante y son de utilidad para el desarrollo de gran variedad de análisis de laboratorio e investigaciones biomédicas en genómica, proteómica y metabolómica, así como para el desarrollo de aplicaciones diagnósticas y sanitarias.

La estabilidad de la muestra influenciará en gran medida los resultados obtenidos de los análisis en los laboratorios. Es decir, la capacidad de la muestra para mantener las características cuantitativas y cualitativas de los parámetros biológicos a analizar va a determinar que el resultado obtenido en el laboratorio sea equiparable o no al del momento de obtención de la muestra. Por ello, la organización y el desarrollo de métodos y procedimientos adecuados para garantizar la estabilidad de la muestra, así como el conocimiento de los posibles usos analíticos de esas muestras, son uno de los aspectos fundamentales de los biobancos.

El principal material biológico humano que se recibe en los biobancos es sangre periférica de donantes sanos y pacientes afectos de algún tipo de patología. La recepción de estas muestras en muchos casos no se realiza inmediatamente después de su extracción sino que tarda varias horas en llegar hasta el laboratorio para su procesamiento. La sangre contiene componentes que son especialmente lábiles y necesitan de algún tipo de aditivo o agente estabilizante que garantice la estabilidad de la muestra durante la fase preanalítica, es decir, hasta su llegada y procesamiento en el laboratorio.

Para preservar las muestras de sangre y sus derivados, desde su extracción hasta su procesamiento en el laboratorio, se pueden utilizar diferentes tipos de aditivos. Éstos son sustancias que, además de preservar la muestra de sangre o alguno de sus componentes, facilitan su manipulación y su posterior análisis en el laboratorio. Los aditivos difieren en su mecanismo de acción y deben ser elegidos cuidadosamente para evitar en lo posible alteraciones en la muestra y variaciones artificiales *in vitro* que alteren los parámetros a analizar. Además,

determinados aditivos pueden estar perfectamente indicados o ser incluso requeridos para determinados análisis o técnicas de laboratorio, mientras que otros pueden ser inapropiados, por lo que la elección del aditivo vendrá determinada por el destino de la muestra. Así pues, una de las principales decisiones a la hora de realizar una toma de muestra de sangre es si necesitaremos utilizar algún tipo de aditivo y, en caso afirmativo, cuál es el más apropiado para el ensayo a realizar.

Para mantener la estabilidad de la muestra durante el tiempo que transcurre entre la obtención de la muestra hasta su procesado en el laboratorio pueden utilizarse distintitos tipos de aditivos.

Los más utilizados son:

I.- Anticoagulantes

II.- Agentes estabilizantes

III.- Gel separador del suero

ADITIVOS UTILIZADOS EN LA TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE

I. ANTICOAGULANTES

Los anticoagulantes son sustancias químicas que impiden o retrasan la coagulación de la sangre de manera que facilitan además de la manipulación, el fraccionamiento de la sangre y el análisis de la muestra. Las características básicas de los anticoagulantes son:

- No alterar el tamaño de los hematíes
- No producir hemólisis
- Evitar al máximo la agregación plaquetaria
- No alterar la morfología de los leucocitos
- Conservar la muestra

Los anticoagulantes más comúnmente usados en la toma de muestras de sangre para distintos análisis y técnicas de laboratorio son los siguientes:

1. EDTA
2. HEPARINA
3. CITRATO
4. Otros anticoagulantes con CITRATO: ACD, CPD, CPDA

1. EDTA

El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) ($C_{10}H_{16}N_2O_8$): libre, en forma de sal disódica (Na_2EDTA), di- o tripotásica (K_2EDTA - K_3EDTA), actúa mediante un efecto quelante sobre el calcio (Ca^{2+}). Al fijarlo, impide la activación de la trombina (protrombina), la conversión del fibrinógeno en fibrina y, por tanto, la coagulación sanguínea. Las sales de potasio tienen la ventaja con respecto a la de sodio, de ser más solubles en sangre. En cuanto a la diferencia entre el K_2EDTA

y el K_3EDTA, es tan escasa, en cuanto a los valores obtenidos en las distintas magnitudes biológicas, que se considera que su uso indistinto no altera en nada los resultados.

El EDTA es un anticoagulante que proporciona muestras útiles para un amplio rango de análisis de laboratorio, análisis bioquímicos, de biología molecular (ADN, ARN, microARN…), proteómica, etc. Además, también se utiliza para el estudio cuantitativo de células sanguíneas, tanto para su recuento y estudio de su morfología (hemograma) como para el estudio inmunohematológico (grupo sanguíneo, pruebas de compatibilidad, etc.). Por ello, si en el momento de obtención de la muestra de sangre se desconoce qué tipo de derivado va a obtenerse (plasma, células mononucleares de sangre periférica (CMSP), ADN…) o a qué tipo de ensayo se va a destinar, se recomienda recoger la muestra con EDTA.

Ventajas:

Respeta la morfología eritrocitaria (especialmente la sal tripotásica) y leucocitaria. Además, inhibe la agregación de las plaquetas.

Desventajas:

Usado en exceso afecta a los eritrocitos y a los leucocitos, a los cuales les produce encogimiento y cambios de forma. Por ello, debe agregarse la cantidad correcta de sangre; su defecto provoca la formación de coágulos. Además, el EDTA está cargado negativamente y forma complejos solubles con iones metálicos. Se desaconseja para ensayos que incluyan cationes divalentes como Mg^{2+} y Ca^{2+}. El EDTA, también plantea problemas para los análisis citogenéticos ya que impide la formación del huso acromático en la mitosis.

Conservación

En general, el EDTA asegura la conservación de los elementos sanguíneos durante 24 h si la sangre se mantiene a 4° C. Sin embargo, dependiendo del tipo del componente sanguíneo que se desee obtener, la sangre con EDTA debe conservarse a diferente temperatura.

Si ha de obtenerse plasma, la muestras sangre-EDTA ha de centrifugarse antes de 3 h desde su extracción. A temperatura ambiente no cabe esperar modificación alguna de los metabolitos y enzimas durante las primeras 3h. Ante la imposibilidad de centrifugar la sangre-EDTA se recomienda mantener la muestra a 4ºC. El tiempo de almacenamiento máximo dependerá de los parámetros a medir. Una vez centrifugada la muestra puede mantenerse a -20ºC o -80ºC (ver tabla 1).

En el caso de muestras destinadas a ADN se acepta un tiempo de conservación de hasta 24 h a 4ºC. Si fuera necesario congelar la muestra está no debería exceder 1 mes a -20ºC ó 6 meses a -80ºC. En cualquier caso, el ADN es una molécula altamente estable y es posible recuperar muestras incluso cuando la sangre se ha conservado en condiciones subóptimas.

Para obtener ARN de muestras de sangre-EDTA lo idóneo es procesar la muestra en un tiempo inferior a los 30 min. Aunque puede ser aceptable un tiempo de conservación de 24 h a 4ºC. En caso de no poder procesar la muestra en estas

condiciones se recomienda utilizar agentes estabilizadores de ARN (tubos PAXGene, *Tempus* Blood *RNA, RNA* Later).

Si se requiere una alta viabilidad celular es necesario procesar la muestra antes de las 24-48 h de su extracción ya que la viabilidad celular decrece rápidamente después de las 48 h.

APLICACIONES

Anticoagulante	DERIVADO HEMÁTICO	Transporte y conservación de la sangre				Técnica recomendada	Técnica no recomendada
		TA	4ºC	-20ºC	-80ºC		
EDTA (K_2EDTA) (K_3EDTA) 	Plasma	3 h	variable			Cromatografía	Ensayos con cationes divalentes Mg^{2+} y Ca^{2+} Pruebas enzimáticas Pruebas bioquímicas
	ADN	12 h	24 h	1 m	6 m	MPLA Secuenciación Southern blot PCR	Ensayos citogenéticos
	ARN	30 min	24 h			Secuenciación Northern blot Integridad ARN RT-PCR	
	CMSP	4 h	24 h			Hemograma Cultivo CMSP	
	Eritrocitos	12 h	24 h			Estudios morfológicos	
	Plaquetas	12 h					

TA: Temperatura ambiente; min: minutos; h: horas; d: días; m: meses

2.- HEPARINA

La heparina es una mezcla de glicosaminglicanos con un número variable de residuos que les dan cargas negativas. La encontramos como sal sódica, potásica, de amonio o de litio. Inhibe la activación de protrombina a trombina, y por lo tanto, evita la formación de fibrina a partir de fibrinógeno. Normalmente la heparina con litio se utiliza para estudios bioquímicos, para la obtención de CMSP e inmortalización celular y la heparina sódica en recuento celular. Además, la heparina es el anticoagulante utilizado en las gasometrías.

Ventajas:

No altera el tamaño de los eritrocitos. Es el mejor anticoagulante para reducir al mínimo la hemólisis.

Desventajas:

Entre las alteraciones que produce se encuentra la degeneración nuclear de los neutrófilos y no es apta para estudios de inmunohematología y test de Coombs. Además, al ser una molécula muy cargada, su presencia en una solución puede competir con la unión de ciertas moléculas a superficies cargadas. Esto interfiere

en pasos importantes de la adsorción de proteínas a chips. También puede interferir en ciertos procesos de afinidad (ej. Análisis de SELDI-TOF).

Conservación

Al igual que con las muestras recogidas en EDTA, la sangre en heparina que se dedique a la extracción de plasma debe procesarse lo más rápidamente posible, idealmente en menos de 3h si se mantiene a temperatura ambiente. Para otros derivados hemáticos como ARN, CMSP o eritrocitos se puede conservar la muestra hasta 24h en condiciones refrigeradas. En el caso de muestras destinadas a la obtención de ADN la muestra de sangre y heparina puede conservarse meses en condiciones de congelación. Para la obtención y cultivo de CMSP, las muestras recogidas en Heparina de Litio se pueden conservar 2 días a temperatura ambiente.

APLICACIONES

Anticoagulante	DERIVADO HEMÁTICO	Transporte y conservación de la sangre				Técnica recomendada	Técnica no recomendada
		TA	4°C	-20°C	-80°C		
HEPARINA SODICA	Plasma	3 h	variable	variable		Determinación de Oligoelementos	Espectrometría de masas- SELDI-TOF
	ADN	12 h	24 h	1 m	6 m		PCR
	ARN	30 min	24 h				
	CMSP	2 h	24 h			Recuento celular	Proliferación de células T Estudios de inmunohematogía. Test de Coombs. Tinciones citoquímicas.
	Eritrocitos	12 h	24 h				
	Plaquetas	12 h					
HEPARINA LITIO	Plasma	4 h	variable	variable		Estudios bioquímicos	Espectometría de masas-SELDI-TOF
	ADN	12 h	24 h	1 m	6 m	Estudios funcionales	
	ARN	30 min	24 h				
	CMSP	2 d				Cultivo de CMSP	
	Eritrocitos	12 h	24 h				
	Plaquetas	12 h					

TA: Temperatura ambiente; min: minutos; h: horas; d: días; m: meses

3.- CITRATO

El citrato trisódico ($C_6H_5O_7Na_3$) actúa impidiendo que el calcio se ionice, evitando así la coagulación. La proporción es una parte de 3.8 ó 3.2 % de solución acuosa y 9 partes de sangre total. El citrato es el anticoagulante preferido para la toma de plasma para pruebas de coagulación y de plaquetas para pruebas de función plaquetaria.

Ventajas:

Aunque retiene el calcio, su efecto se revierte fácilmente cuando se añade calcio.

Desventajas

El inconveniente que presenta es que produce contracción eritrocitaria. Además, al ser una solución acuosa, diluye el plasma. No sirve para ver la morfología celular, ya que desarrolla con rapidez hematíes dentados y artefactos y deformación en las células sanguíneas. Tampoco es adecuado para las determinaciones bioquímicas ni determinaciones electrolíticas por llevar Na y K.

Conservación

El tiempo máximo entre la extracción de la sangre y su procesamiento depende del destino final de la muestra. En general, la sangre tratada con citrato mantenida a temperatura ambiente se debe procesar lo antes posible. Para el análisis de coagulación no debe exceder de las 4 h. A 4ºC puede mantenerse entre 6-8 horas. Para el cultivo de CMSP puede mantenerse a 4ºC durante 24 h.

APLICACIONES

Anticoagulante	DERIVADO HEMÁTICO	Transporte y conservación de la sangre				Técnica recomendada	Técnica no recomendada
		TA	4°C	-20°C	-80°C		
CITRATO TRISÓDICO	Plasma	4h	6 h			Ensayos de coagulación	Inmunoensayo
	ADN	12 h	24 h	1 m	6 m		
	ARN	30 min	24 h				
	CMSP	4 h	24 h			Cultivo de CMSP	
	Eritrocitos	12 h	24 h			sedimentación de hematíes	
	Plaquetas	12 h				Recuento de plaquetas y función plaquetaria	

TA: Temperatura ambiente; min: minutos; h: horas; d: días; m: meses

4.- Otros anticoagulantes con CITRATO: ACD, CPD, CPDA

- **ACD**

El ACD es un anticoagulante formado por la mezcla de tres compuestos (ácido cítrico, citrato de sodio y dextrosa). Dependiendo de la proporción tenemos:

a) ACD-A, que contiene un volumen de solución A que consiste en citrato de sodio 22.0 g/l, ácido cítrico 8.0 g/l y dextrosa 24.5 g/l.

b) ACD-B, que contiene un volumen de solución B que consiste en citrato de sodio 13.2 g/l, ácido cítrico 4.8 g/l y dextrosa 14.7 g/l.

El citrato actúa como anticoagulante por ser quelante de los iones calcio. La dextrosa proporciona un sustrato para la glucólisis durante el almacenamiento, extendiendo así el tiempo de vida de los eritrocitos. La proporción de ácido cítrico y citrato de sodio es tal que el pH resulta óptimo para la conservación de la sangre entera.

El ACD se utiliza fundamentalmente para la obtención de CMSP y realizar la inmortalización de linfocitos B mediante el virus de Epstein-Barr. Son muy utilizados para bancos de sangre y en Pruebas de histocompatibilidad.

- **CPD**

Contiene citrato, fosfato y dextrosa. Estabiliza el pH de la sangre en valores cercanos a 7,1 durante el periodo de almacenamiento, lo que permite que los componentes celulares continúen su metabolismo. Por otro lado, el fosfato presente en la solución anticoagulante permite mantener las reservas de ATP, lo que se traduce en una mayor estabilidad de la membrana celular y por último conserva lo niveles elevados de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), lo que disminuye la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno facilitando su liberación en los tejidos. La sangre anticoagulada con CPD se conserva hasta los 28 días.

- **CPDA**

a) CPDA-1: Esta solución anticoagulante contiene más glucosa que el CDP. Además contiene adenina, que es utilizada por el hematíe para sus reservas de nucleótidos, prolongando por más tiempo la estabilidad de la membrana celular.

b) CPDA-2: Es una fórmula mejorada del CPDA-1. Tiene mayor concentración de dextrosa y adenina.

Ventajas:

Permite una buena conservación de los hematíes e inhibe la agregación plaquetaria, por la reducción del pH.

Desventajas:

Son anticoagulantes líquidos, por lo que diluyen la muestra y están especialmente desaconsejados para estudios con plasma.

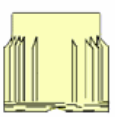
Conservación

La fecha de vencimiento de la sangre entera anticoagulada con solución ACD es de 21 días. Si la sangre se conserva con CPDA-1 tiene una viabilidad de 35 días. Y si el anticoagulante utilizado es el CPDA-2 se ha observado que la Sangre total puede conservarse por 49 días, mientras que los concentrados de hematíes se conservan durante 42 días.

Para la extracción de ARN los tubos con ACD deben transportarse al laboratorio lo antes posible. Si no pueden procesarse inmediatamente, pueden mantenerse a temperatura ambiente (10-22 °C) como máximo 24h desde la extracción.

Para la obtención y cultivo de CMSP la sangre se podría mantener a temperatura ambiente hasta cuatro días.

APLICACIONES

Anticoagulante	DERIVADO HEMÁTICO	Transporte y conservación de la sangre				Técnica recomendada	Técnica no recomendada
		TA	4°C	-20°C	-80°C		
ÁCIDO CÍTRICO, CITRATO DE SODIO, DEXTROSA (ACD) 	Plasma						Estudios de plasma
	ADN	12 h	24 h	1 m	6 m		
	ARN	30 min	24 h			- Secuenciación Northern blot - Integridad ARN - RT-PCR	
	CMSP	4 d				- Cultivo CMSP - Pruebas de Histocompatibilidad - Estudios morfológicos	
	Eritrocitos		21 d			- Estudios metabólicos eritrocitarios - Conservación de los hematíes - Para determinar el grupo sanguíneo - Estudios morfológicos	
	Plaquetas						
CITRATO, FOSTATO, DEXTROSA (CPD)	Plasma						Estudios de plasma
	ADN	12 h	24 h	1 m	6 m		
	ARN	30 min	24 h			- Secuenciación Northern blot - Integridad ARN - RT-PCR	
	CMSP	4 d				Estudios morfológicos	
	Eritrocitos		35 d			- Estudios metabólicos eritrocitarios - Conservación de los hematíes - Estudios morfológicos	
	Plaquetas						
CITRATO, FOSTATO, DEXTROSA, ADENINA (CPDA)	Plasma						Estudios de plasma
	ADN	12 h	24 h	1 m	6 m		
	ARN	30 min	24 h			- Secuenciación Northern blot - Integridad ARN - RT-PCR	
	CMSP	4 d				Estudios morfológicos	
	Eritrocitos		42 d			- Estudios metabólicos eritrocitarios - Conservación de los hematíes - Para determinar el grupo sanguíneo - Estudios morfológicos	
	Plaquetas						

TA: Temperatura ambiente; min: minutos; h: horas; d: días; m: meses

II. AGENTES ESTABILIZANTES

Este tipo de aditivos tiene como misión preservar un determinado componente sanguíneo. Unos de los estabilizantes más utilizados para la toma de muestras para investigación son los agentes estabilizantes de ARN.

1.- Agente estabilizante del ARN

Es un aditivo que estabiliza el perfil de transcripción génica, reduciendo la degradación del ARN *in vitro* y minimizando la inducción génica.

Ventajas:

Estabiliza el ARN intracelular. Minimiza las variables preanalíticas y estabiliza todo el proceso en el análisis de ARN.

Desventajas:

La sangre obtenida sólo puede utilizarse para la obtención de ARN.

Conservación

Tanto los tubos de Paxgene como de Tempus blood RNA o RNA later pueden mantenerse varios días a temperatura ambiente ó 4ºC. Además pueden conservarse durante años congelados a -20ºC ó -80ºC.

APLICACIONES

ADITIVO	DERIVADO HEMÁTICO	Transporte y conservación de la sangre				Técnica recomendada	Técnica no recomendada
		TA	4ºC	-20ºC	-80ºC		
PAXGene (PreAnalytix)	ARN	2-72 h	2-3 d		50 m	Obtención de ARN	Obtención de ADN Biología Celular
Tempus Blood *RNA*	ARN	5 d	7 d	años	años		
RNA Later (Ambion)	ARN	7 d	1 m	años			

TA: Temperatura ambiente; h: horas; d: días; m: meses

III. GEL SEPARADOR DEL SUERO

El suero es el componente de la sangre que resulta tras eliminar el coágulo sanguíneo. Es decir, el suero es similar al plasma sanguíneo sin las proteínas de la coagulación, fibrinógeno principalmente.

Para la obtención de suero generalmente se utilizan tubos sin aditivos, aunque en algunos casos sí contienen activadores que facilitan la retracción del coágulo. También pueden contener un gel separador que facilita la separación de suero y el coágulo tras la centrifugación.

Una vez extraída la sangre se producen una serie de procesos que pueden alterar algunos parámetros bioquímicos. Entre otros, por ejemplo, si transcurre mucho tiempo entre la toma de la muestra de sangre total y la separación del suero, la glucolisis que ocurre en la sangre total provocará una disminución de la concentración sérica de la glucosa en suero. También se producen procesos proteolíticos e hidrolíticos que provocan un aumento de la concentración de amoniaco. Por ello, debe separase el suero a los 30 min de la obtención, siempre que el coágulo se haya formado.

Una vez extraída la sangre, se deja reposar, al menos 30 min a temperatura ambiente, para que se forme el coágulo y, posteriormente, mediante centrifugación, obtenemos el suero.

Ventajas:

Facilidad para la obtención del suero

Desventajas:

Generalmente no se puede aprovechar la fase celular ni la fase roja de la sangre

Conservación

El suero debe separarse del contacto con las células tan pronto como sea posible. Se recomienda un límite máximo de 2 h a partir del momento de recolección. El suero separado debe permanecer a temperatura ambiente no más de 8 h. Si los ensayos no se han determinado dentro de 8 h el suero debe refrigerarse a 4°C. En caso de que la muestra separada deba conservarse más de 48 h, el suero debe congelarse a -20°C ó -80°C

Un método ideal para almacenar suero incluye su rápida congelación a -80°C; sin embargo, para la mayoría de sustancias el almacenamiento a -20°C en un periodo de hasta 6 semanas no conducirá a ninguna variación clínicamente importante.

APLICACIONES

ADITIVO	DERIVADO HEMÁTICO	Transporte y conservación de la sangre				Técnica recomendada	Técnica no recomendada
		TA	4°C	-20°C	-80°C		
Sin gel	SUERO	2 h				Bioquímica Metabolismo del hierro Inmunología Toxicología Inmunoensayo	Obtención de ADN Biología Celular
Gel separador del suero	SUERO	2 h					

TA: Temperatura ambiente; h: horas; d: días; m: meses

TABLA 1. Condiciones de obtención y conservación de la muestra de acuerdo al tipo de estudio que se pretende realizar

CAMPO DE APLICACIÓN	TÉCNICA	Aditivo Recomendado	Transporte y conservación de la sangre				TIPO DE MUESTRA OBTENIDA	Conservación de la muestra					Aditivo no recomendado
			TA	4°C	-20°C	-80°C		TA	4°C	-20°C	-80°C	NL	
BIOLOGÍA CELULAR	CULTIVO CMSP	EDTA	4 h	24 h			CMSP				1 año	indefinido	
		HEAPARINA de LITIO	2 d										
		CITRATO	4 h	24 h									
		ACD/CPD/CPDA	4 d										
	ERITROCITOS	ACD		21 d			ERITROCITOS				años	indefinido	CITRATO
		CPD		35 d									
		CPDA		42 d									
	ACTIVACION PLAQUETAS	CITRATO	60 min				PLAQUETAS						
ANÁLISIS ADN	MICROARRAY GENOTIPADO SNP SOUTHER BLOT	EDTA	12 h	24 h	1 m	6 m	ADN		1 año	indefinido	indefinido		
		CITRATO											
		ACD											
		HEPARINA											
	PCR MPLA SECUENCIACIÓN	EDTA	12 h	24 h	1 m	6 m	ADN		1 año	indefinido	indefinido		HEPARINA
		CITRATO											
		ACD											
ANÁLISIS ARN	SECUENCIACIÓN NOTHER BLOT INTEGRIDAD ARN RT-PCR	EDTA	30 mim	24 h			ARN / microRNA			indefinido	indefinido		
		ACD/CPD/CPDA	24 h	24 h									
		TEMPUS BLOOD RNA	5 d	7 d	años	años							
		PAXGENE	2-72 h	2-3 d		años							
		RNA LATER	7 d	1 m	años	años							

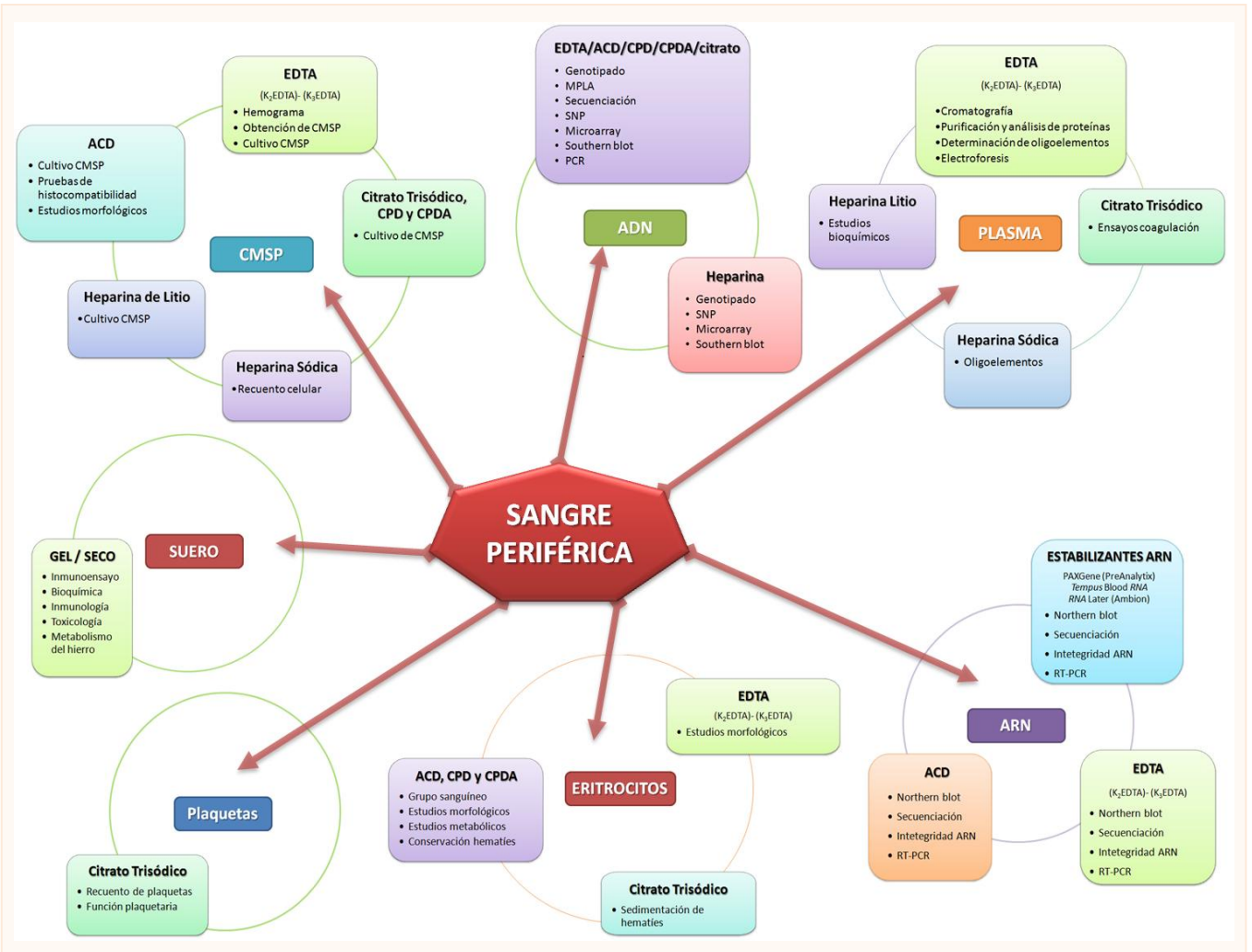
TA: Temperatura ambiente; NL: Nitrógeno líquido; min: minutos; h: horas; d: días; m: meses

TABLA 1. Condiciones de obtención y conservación de la muestra de acuerdo al tipo de estudio que se pretende realizar (continuación)

CAMPO DE APLICACIÓN	TÉCNICA	Aditivo Recomendado	Transporte y conservación de la sangre				TIPO DE MUESTRA OBTENIDA	Conservación de la muestra					Aditivo no recomendado
			TA	4°C	-20°C	-80°C		TA	4°C	-20°C	-80°C	NL	
ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	ELECTROFORESIS	EDTA	3h	variable			PLASMA	3 h	8 h	1 m	años		ACD/CPD/CPDA
	WERTERN BLOT	Gel separador suero	2 h				SUERO	3 h	8 h	1 m	años		Anticoagulantes / Agentes estabilizantes
	PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS	EDTA	3h	variable			PLASMA	3 h	8 h	1 m	años		ACD/CPD/CPDA
		Gel separador suero	2 h				SUERO	3 h	8 h	1 m	años		Anticoagulantes / Agentes estabilizantes
	CUANTIFICACIÓN (Biuret, Bradford)	Gel separador suero	2 h				SUERO	3 h	8 h	1 m	años		Anticoagulantes / A. estabilizantes
	SECUENCIACIÓN DE PROTEÍNAS	EDTA	3h	variable			PLASMA	3 h	8 h	1 m	años		ACD/CPD/CPDA
		Gel separador suero	2 h				SUERO	3 h	8 h	1 m	años		Anticoagulantes / Agentes estabilizantes
	RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	EDTA	3h	variable			PLASMA	3 h	8 h	1 m	años		ACD/CPD/CPDA
		Gel separador suero	2 h				SUERO	3 h	8 h	1 m	años		Anticoagulantes / Agentes estabilizantes
	ESPECTROMETRÍA DE MASAS	EDTA	3h	variable			PLASMA	3 h	8 h	1 m	años		HEPARINA/ ACD/CPD/CPDA
		Gel separador suero	2 h				SUERO	3 h	8 h	1 m	años		Anticoagulantes / Agentes estabilizantes
BIOQUÍMICA	DETERMINACIÓN DE OLIGOELEMENTOS	EDTA	12 h	24 h			SANGRE / PLASMA	3 h	8 h	1 m	años		ACD
INMUNOHEMATOLOGÍA	SERIE ROJA	EDTA	24 h	10 d			ERITROCITOS		3 d		años	indefinido	
	SERIE BLANCA	EDTA	24 h	10 d			LEUCOCITOS		3 d		1 año	indefinido	
	PLAQUETAS	EDTA	6 h				PLAQUETAS	3-5 d					
	ANTÍGENO HLA	ACD	48 h	48 h			LEUCOCITOS		3 d		1 año	indefinido	
	ANTICUERPO HLA	EDTA	24 h	10 d			PLASMA				años		

TA: Temperatura ambiente; NL: Nitrógeno líquido; min: minutos; h: horas; d: días; m: meses

Figura 2. Diagrama resumen del conjunto de derivados hemáticos con las posibles aplicaciones en función del contenedor primario de recogida de la sangre periférica



Bibliografía

1. Becton, Dickinson and Company: www.bd.com
2. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. Nina T. Holland, Martyn T. Smith, Brenda Eskenazi, Maria Bastaki. Mutation Research 2003: 543 217-234.
3. Blood Collection, Shipment, Processing, and Storage. Jimmie B. Vaught. Cancer Epidemiol Biomarkes 2006:15(9) 1582-1584.
4. Manual de obtención, transporte y conservación de muestras biológicas en hematología y hemoterapia. Coordinador Josep Mª Jou, SETH.
5. Molecular Medicine Ireland Guideliness for Standarized Biobanking. Guierin JS, Murray DW, McGrath MM, Yuile MA, McPartin and Doran PP. Biopreservation & Biobanking, volume 8 number 1, 2010.
6. Norma ISO 6710.
7. Sample handling and storage subgroup protocol and recommendations. Version 1.0, 7 july 2004. The UK Biobank.
8. The UK Biobank sample handling and storage protocol for the collection, processing and archiving of human blood and urine. Paul Elliott and Tim Peakman. International Journal of Epidemiology 2008;37:234-244.
9. 2012 Best Practices for Repositories. Collection, Storage, Retrieval, and Distribution of Biological Materials for Research. International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER). Third Edition. Biopreservation and Biobanking. 2012, 10(2): 79-161.

CAPÍTULO 4

CONTROLES DE CALIDAD INTERNOS

CONTROLES DE CALIDAD INTERNOS

Pablo Isidro

María Almeida

Nieves Domenech

Coordinadora del capítulo: Verónica Fernández

INTRODUCCIÓN A LA CALIDAD

La adaptación del sistema a las nuevas exigencias que imponen los mercados permite a las empresas ser más competitivas y crecer, en la medida en que éstas alcancen un sistema orientado a la calidad total. Así, en los últimos años la calidad se ha impuesto como un elemento esencial para cualquier tipo de empresa productiva, tanto pública como privada, así como para las organizaciones sin ánimo de lucro.

La calidad se define como el grado en el que un conjunto de características inherentes cumple los requisitos. A su vez, el término calidad total engloba el conjunto de procesos estandarizados dirigidos a obtener la satisfacción del usuario y una rentabilidad adecuada, que permita a la organización su continuidad en el mercado. La calidad total incluye tanto la gestión de la calidad, definida como el conjunto de actividades coordinadas para dirigir y controlar una organización en lo relativo a la calidad, como el aseguramiento de la calidad, definida como la parte de la gestión de la calidad orientada a proporcionar confianza en que se cumplirán los requisitos de la calidad. A su vez, el estándar de calidad es el valor de referencia para un criterio de calidad frente al que contrastar, aceptar o modificar la calidad de los productos o servicios.

En definitiva, la calidad se ha convertido en un requisito indispensable para un producto o servicio, constituyendo un factor estratégico del cual dependen la mayoría de las organizaciones para mantener su posición e incluso su supervivencia en el mercado.

I. NECESIDAD DEL CONTROL DE CALIDAD INTERNO EN UN BIOBANCO

La principal misión de los biobancos es facilitar a la comunidad científica muestras biológicas estandarizadas y de alta calidad, para promover, facilitar y desarrollar la investigación biomédica de acuerdo con la legislación vigente. Así, en los últimos años los biobancos se han convertido en indispensables infraestructuras tecnológicas de apoyo a la investigación científica, encargados de obtener, procesar, validar, almacenar y distribuir material biológico de origen humano a investigadores o instituciones de carácter público o privado.

La Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica (LIB) establece en el artículo 66.2 que la dirección del biobanco "*debe garantizar la calidad, la seguridad y la trazabilidad de los datos y muestras biológicas almacenadas y de los procedimientos asociados al funcionamiento de la calidad*", entendiéndose por trazabilidad como la capacidad de asociar un material biológico determinado con información registrada referida a cada paso en la cadena de su obtención, así como a lo largo de todo el proceso de investigación. Por tanto, es responsabilidad de la dirección que el biobanco establezca un programa o plan de aseguramiento de la calidad, que garantice el cumplimiento de este requisito legal.

Para ello es esencial que el biobanco sea capaz de rastrear cuidadosamente cada una de las muestras recibidas, procesadas y distribuidas. De acuerdo a la normativa, es fundamental garantizar el buen funcionamiento en todos los procesos relativos al uso de las muestras biológicas y de la información que éstas llevan asociada, desde su recepción, procesado y almacenamiento, hasta su cesión. Dichas muestras son frágiles y dotadas de un valor intrínseco, y deben ser procesadas y conservadas sin producir modificaciones.

Durante el funcionamiento de los procesos claves del biobanco, y dentro de un sistema adecuado de Gestión de Calidad, es necesario generar y mantener registros definidos por la dirección del mismo, que permitan controlar y analizar las actividades desarrolladas en el biobanco. Asimismo, la dirección del biobanco debe establecer los mecanismos para el correcto seguimiento y medición de estas actividades.

Dentro de los mecanismos de seguimiento y medición de los procesos, es necesario verificar que las muestras biológicas cumplen los requisitos de calidad determinados por el biobanco. Para este fin se deben establecer unos indicadores de calidad, con sus correspondientes valores de referencia, que permitan obtener evidencias del cumplimiento de dichos requisitos de calidad.

Durante la rutina diaria de funcionamiento del biobanco, hay multitud de variables (muchas de ellas de difícil control) que pueden hacer que los procesos que se llevan a cabo no se desarrollen de la forma adecuada, por lo que los subproductos obtenidos a partir de las muestras biológicas procesadas pueden no cumplir con los criterios de calidad establecidos. Por ello, el biobanco tiene que definir los procedimientos que le permitan valorar la calidad de las muestras biológicas durante las diferentes fases de su procesamiento, para garantizar que éstas cumplen los requisitos de calidad previamente establecidos, siendo necesario identificar los puntos críticos que pueden afectar a la calidad de cada tipo de muestra biológica, así como establecer los diferentes tipos de control de calidad que pueden aplicarse en función del tipo de muestras que alberga el biobanco.

Para el cumplimiento de estos requisitos se debe utilizar un conjunto de equipos y técnicas que proporcionen unos resultados medibles, que permitan aceptar o rechazar una muestra biológica para su posterior cesión a un investigador mediante su análisis y comparación con los estándares de calidad predefinidos. De esta manera, el biobanco debe diseñar los PNT necesarios para verificar que las muestras biológicas cumplen los requisitos. En estos protocolos de calidad se debe definir:

1. Procedimientos operacionales estándares escritos (protocolos) que aseguran que cada miembro de la organización obedezca a un único procedimiento.
2. Equipos de medida utilizados
3. Parámetros de control
4. Estándares de calidad y criterios de aceptación/rechazo de muestras
5. Registros que se conservan

Existe una gran cantidad de mecanismos de control aceptados por la comunidad científica, pero cada biobanco puede diseñar sus procedimientos para controlar la calidad de las muestras biológicas recibidas, procesadas y almacenadas en función de la cualificación de su personal y de la disponibilidad de recursos.

II. FASES DE MANIPULACIÓN DE MUESTRAS EN UN BIOBANCO Y EL CONTROL DE CALIDAD ASOCIADO

Los controles de calidad en un biobanco abarcan un rango muy amplio de procesos que empiezan en la recogida de las muestras y terminan en su cesión. Podemos clasificar los distintos pasos de control de la calidad del biobanco en función de los cinco procesos básicos asociados al trabajo del servicio:

1. **Recepción de muestras:** dentro de este proceso se incluyen las variables preanalíticas asociadas a la muestra. Las variables preanalíticas comprenden todas las variables que presenta la muestra desde su toma hasta que se analiza. Estas variables pueden ser muy diversas y de difícil control, su importancia en el valor de la muestra biológica es fundamental, ya que el 40% de los errores que se producen en el desarrollo, análisis y aplicación de biomarcadores derivados de investigación, realizados con muestras biológicas, corresponden a errores preanalíticos. Asimismo el control de estas variables es importante cuando se llevan a cabo estudios multicéntricos, para poder permitir la interconexión e interoperabilidad entre muestras de distintos biobancos.

   Las variables preanalíticas se dividen básicamente en tres grupos principales:

   - *Asociadas al paciente:* incluyen la dieta, la ingesta de alcohol, el estado físico del paciente o la medicación que toma, entre otras
   - *Asociadas a la toma de muestra:* incluyen el tipo de muestra obtenida, al sitio de obtención, el tipo de tubo usado o el tipo de transporte, por ejemplo
   - *Asociadas a la muestra:* incluyen el grado de hemólisis, bilirrubinemia o lipemia de la muestra, entre otras

   La primera medida de control de las variables preanalíticas es su recogida en una hoja de datos asociada a la muestra antes de que ésta sea procesada en el biobanco. Con esta hoja de datos se debe adjuntar el consentimiento informado firmado por el donante.

A través de la hoja de datos se pueden recoger múltiples parámetros, como la fecha y hora de extracción de la muestra, código identificativo del donante (que puede ser, por ejemplo, el número de historia clínica), la temperatura de conservación de la muestra, incluyendo cualquier tipo de incidencia que haya podido producirse durante la obtención de la muestra, entre otros. Resulta de gran utilidad que la información recogida en esta hoja de datos se incorpore en el sistema informático de gestión de datos del biobanco, para que pueda ser consultada por el personal del biobanco en cualquier momento, así como para mantener la trazabilidad y la calidad de los datos asociados a las muestras biológicas.

El Grupo de Trabajo de Derivados Hemáticos de la Red Nacional de Biobancos ha trabajado en la creación de una hoja de recogida de datos estándar con los parámetros mínimos que deberían ir asociados a la muestra, y que se puede consultar en el anexo de este libro (Anexo I).

2. **Registro de las muestras y datos recibidos:** las muestras biológicas recibidas y su información asociada se deben codificar de un modo eficiente que permita controlar su trazabilidad durante el procesamiento, almacenamiento y posterior cesión a investigadores. En este punto también resulta de gran utilidad que el sistema informático de gestión de muestras biológicas y datos del biobanco se encargue de asignar un código identificativo a cada muestra recibida en el biobanco, que sea único e inequívoco, para garantizar la trazabilidad.

   El registro se puede hacer de forma manual o automática, siendo esta última opción la más recomendable, para lo cual es necesario que el sistema informático de gestión de muestras y datos del biobanco disponga de conexión a sistemas de lectura de códigos de barras o de cualquier otro tipo, que permita el registro automático de las muestras y de su información asociada, evitando así posibles errores de identificación debido a una incorrecta lectura o interpretación del código por parte del personal del biobanco. Para ello resulta imprescindible que las muestras y datos que se recojan para ser incorporados a un biobanco estén identificados con etiquetas con código de barras o cualquier otro sistema que permita su lectura automática.

   Asimismo, los sistemas informáticos relacionados con el sistema de inventario y trazabilidad deben ser validados y estar sujetos a auditorías de aseguramiento de calidad.

   Como se ha descrito anteriormente, en el año 2010 surgió una iniciativa de codificación de muestras estándar que incluyera las principales variables preanalíticas que podían influir en la calidad de la muestra. Dicha iniciativa se desarrolló dentro del grupo de trabajo de la ciencia de muestras biológicas (*Biospecimen Science Working Group*) del ISBER (*International Society for Biological and Environmental Repositories*). Este código se conoce como código SPREC (*Standard PREanalytical Code*). Este código define 7 variables prenalíticas que se definen por letras separadas por guiones, y que en su conjunto definirán el código de la muestras.

   El código SPREC se aplica en muestras primarias y derivados simples (preparados a partir de una manipulación sencilla en el laboratorio), y en el

caso de bancos de derivados hemáticos los 7 elementos que se codifican son los siguientes:

a. Tipo de muestra
b. Tipo de recipiente primario
c. Condiciones de precentrifugación
d. Centrifugación
e. Segunda centrifugación
f. Condiciones de postcentrifugación
g. Condiciones de almacenamiento

Hay que tener en cuenta que el código de la muestra se asigna antes del almacenamiento, por lo que no se pueden definir sus características de duración, si ha habido distintos ciclos de congelación/descongelación, etc.

Por ejemplo, una muestra de suero recogida en un biobanco y definida con su código SPREC sería:

SER-SST-A-E-N-A-G

Este código significa que según las letras definidas por el código SPREC, se trata de una muestra de suero (SER), recogida en tubo SST (SST), con un tiempo precentrifugación menor a las 2 horas, a temperatura ambiente (A). La centrifugación se ha llevado a cabo a temperatura ambiente, de 3000 a 6000 g con freno (E), y sólo ha habido una centrifugación (N). El tiempo antes del almacenamiento ha sido menor a 1 h, a una temperatura entre 3°C y 7°C (A). Finalmente, la muestra se ha almacenado en varillas entre -60°C y -85°C (G).

En cualquier caso, debe tenerse en cuenta que el sistema de codificación que elijamos debe ser:

- **Flexible**: que permita elegir, entre múltiples opciones, la que mejor se adapte al concepto que queremos definir
- **Exacto**: que defina los conceptos de forma clara e inequívoca
- **Estable**: que no sea modificable y permita a los usuarios utilizar los mismos códigos para definir los mismos conceptos

3. **Procesamiento de las muestras:** una vez registradas y codificadas, las muestras se deben procesar siguiendo una política de gestión de calidad, la cual implica el uso de los PNT. El Grupo de Trabajo de Derivados Hemáticos de la Red Nacional de Biobancos ha confeccionado los distintos PNT para la manipulación de las muestras en este tipo de biobancos, y que se detallan en los distintos capítulos de este libro **(Anexo I)**.

   La correcta gestión de las muestras biológicas es un punto crítico y esencial para garantizar la calidad de los subproductos que se obtienen en el biobanco; en este sentido, el sistema informático de gestión de muestras y datos del biobanco debe adaptarse a la gran diversidad de tipos de muestras y de líneas de procesamiento que pueden existir, pero siempre manteniendo la trazabilidad de las muestras y de su información asociada.

Asimismo, el sistema informático debe proporcionar al usuario un seguimiento completo de la ejecución de todos los procesos que tiene que seguir una muestra de acuerdo al PNT previamente establecido: qué procesos se han llevado a cabo, cuáles no se han realizado aún y están pendientes, la fecha y hora de procesamiento, recordatorios al personal del biobanco que un proceso en particular debe llevarse a cabo, o incluso especificar el tiempo límite del que se dispone para hacerlo.

Una buena medida para garantizar la calidad y la trazabilidad de las muestras biológicas en un biobanco consiste en automatizar al máximo los procedimientos de trabajo en el laboratorio del biobanco. En este sentido, en la actualidad existen diferentes casas comerciales especializadas en la fabricación de robots de manejo de muestras líquidas, que permiten el procesamiento y/o alicuotado de muestras con las que habitualmente se trabaja en un biobanco de muestras líquidas, como sangre, suero, plasma, orina, células en suspensión, ácidos nucleicos o proteínas en suspensión,…etc. Para ello, resulta fundamental que el sistema informático de gestión se conecte al equipamiento del biobanco, eliminando así la probabilidad de error en la introducción de los datos obtenidos.

4. **Almacenamiento:** los biobancos deben garantizar el correcto almacenamiento de las muestras biológicas que albergan en las condiciones más óptimas, desde el momento en que se almacenan hasta que se envían a un investigador. La correcta gestión del almacenamiento es un proceso clave para todos los biobancos, y es fundamental establecer un sistema de gestión de calidad que permita garantizar la calidad del almacenamiento de las muestras mediante el control de los equipos de almacenamiento del biobanco (tareas de mantenimiento, validación de equipos, revisiones por parte de personal externo al biobanco, reparaciones, etc.), así como mantener un registro constante de las temperaturas de los diferentes sistemas de almacenamiento y un control exhaustivo de todas las incidencias y alarmas que se hayan registrado en el tiempo.

5. **Cesión de las muestras y/o datos asociados:** cada biobanco debe definir las condiciones de acceso a las muestras biológicas que alberga y a su información asociada, siempre asegurando su uso racional, eficaz, legal y ético, para a su vez garantizar los derechos de los donantes. La cesión de las muestras y/o datos por parte del biobanco implica el desarrollo de un documento estándar de solicitud. Cuando el biobanco recibe una solicitud por parte de un investigador, debe comprobar primero la disponibilidad de las muestras y/o datos solicitados, para posteriormente ser evaluada por los Comités Externos del biobanco (Científico y Ético). En el caso de que la evaluación resulte favorable, ello derivará en la obtención de un documento de "acuerdo de cesión" de muestras biológicas y/o datos asociados, los cuales se seleccionarán de acuerdo a lo solicitado por el investigador, y se enviarán una vez que se haya comprobado la correcta calidad de los productos.

   Esta interacción entre el usuario/investigador y el biobanco permite a este último establecer mecanismos de seguimiento y medición para analizar la satisfacción del cliente en relación con los productos y servicios ofrecidos (por ejemplo, a través de encuestas de satisfacción).

CONTROLES DE CALIDAD INTERNOS

Los controles de calidad internos son los que se llevan a cabo dentro de un laboratorio, y permiten monitorizar la variabilidad asociada a cualquier proceso. De este modo, se puede controlar que un proceso concreto se lleva a cabo correctamente en un determinado laboratorio, y que los equipos y reactivos usados son los adecuados para cumplir los objetivos de calidad establecidos por el biobanco. Asimismo, se debe determinar la **estabilidad** de las muestras, definida como su capacidad para preservar la cantidad inicial analizada de uno de sus componentes de manera indefinida, así como dentro de unos límites definidos cuando se almacena bajo determinadas condiciones.

Preferiblemente, estos controles de calidad deben ser sencillos de ejecutar y, en la medida de lo posible, deben poder interpretarse visualmente. Asimismo, los resultados obtenidos a partir de los controles de calidad de las muestras deben registrarse de forma continua y mediante análisis estadísticos, para garantizar la estabilidad del proceso.

De manera ideal, los parámetros de calidad que se deben medir deben de tener las siguientes características:

- **Universales:** los parámetros deben ser independientes del tipo de estudio, colección, patología, etc. analizados
- **Métodos accesibles:** los parámetros se deben medir con métodos de fácil implementación en un laboratorio, y/o bien adaptando los existentes
- **Respuesta "on"/"off":** se debe identificar de forma visual, clara y sin duda la calidad de las muestras y la presencia de incidencias en los procesos
- **Costes bajos:** los protocolos de control de calidad deben implicar un coste económico y temporal bajo, que no interfiera en el trabajo de rutina del biobanco
- **Periodicidad:** el seguimiento de los protocolos de calidad se debe ajustar a la rutina de trabajo del biobanco

Los criterios de "calidad" con respecto a muestras biológicas no pueden ser definidos de forma única porque va a depender de la propia finalidad de uso de la muestra, es decir, de sus posibles aplicaciones analíticas. Algunos ejemplos son la medición de la actividad de la proteína S en plasma para estudiar el efecto de su almacenamiento en el tiempo; o bien la cantidad de CD40L en suero para estudiar el efecto de su exposición a la temperatura ambiente; así como el uso del péptido liberador de progastrina (ProGRP) como marcador para el control de calidad en el procesamiento y almacenamiento de muestras de plasma.

I. CONTROLES DE CALIDAD EN MUESTRAS DE PLASMA/SUERO

Cuando se trata del control de calidad de este tipo de muestras biológicas debe considerarse:

1. **Tiempo que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su recepción, procesamiento y almacenamiento en el biobanco,** que debe ser el mínimo posible (idealmente las muestras deben procesarse durante los 30 primeros minutos tras su extracción, aunque para la mayoría de las proteínas se considera un rango de tiempo menor a 24h como aceptable).

2. **Temperatura de almacenamiento:** debe ser inferior a -70ºC y evitar en todo caso los ciclos de congelación-descongelación. Como medidas básicas de control de calidad, se debe almacenar un número suficiente de alícuotas de cada muestra en el volumen mínimo posible, establecer un registro constante de las temperaturas de almacenamiento, así como instaurar medidas de seguridad tanto preventivas (sistemas de alarma ante un aumento de temperatura, disponer de suficientes circuitos eléctricos, sistemas de liberación de CO_2), como correctivas (por ejemplo, disponer de congeladores vacíos a -80ºC para que en caso de fallo de un equipo se puedan trasladar las muestras sin que varíe su temperatura de almacenamiento).

3. **Marcadores de calidad:** su selección va a depender de la posible utilidad futura de las muestras y de la estabilidad de cada marcador. A pesar de los avances obtenidos en el estudio del proteoma del plasma y del suero, actualmente apenas hay marcadores proteicos que se puedan utilizar para analizar el estado de este tipo de muestras, por lo que es necesario disponer de un panel de marcadores proteicos que permitan establecer estándares mínimos de calidad con los que excluir de la fase analítica aquellas muestras que tengan alterada la integridad proteica o cuyo proteoma esté contaminado con péptidos derivados de una deficiente fase preanalítica. Aún y así se pueden utilizar metabolitos de uso clínico cuyos rangos normales están perfectamente establecidos (inorgánicos o proteínas).

II. CONTROLES DE CALIDAD EN MUESTRAS DE ADN

Para controlar la calidad de las muestras de ADN procesadas y almacenadas en un biobanco, han de tenerse en cuenta distintos aspectos:

1. **Pureza y concentración:** el grado de pureza de una muestra de ADN se puede determinar mediante espectrofotometría, teniendo en cuenta la capacidad que tiene cada sustancia para absorber específicamente y a una determinada longitud de onda una energía luminosa. Así, la relación de absorbancia entre 260 nm y 280 nm se utiliza de manera convencional en los laboratorios para establecer la pureza de una muestra de ADN.

   Otras medidas comúnmente empleadas incluyen la relación de absorbancia a 260 nm y 230 nm. Además de la pureza, la espectrofotometría permite calcular la concentración de la muestra de ADN.

2. **Integridad:** se puede analizar mediante electroforesis (una muestra de ADN íntegro se observará como una banda definida).

3. **Funcionalidad:** como en un biobanco no se conoce *a priori* para qué se va a utilizar una muestra de ADN, se debe elegir una o varias técnicas

suficientemente exigentes para comprobar si el ADN es óptimo para trabajar con él (por ejemplo, mediante digestión del ADN con enzimas de restricción, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), etc.).

4. **Trazabilidad:** como requisito fundamental de calidad se debe garantizar la trazabilidad de la muestra. Se puede analizar la trazabilidad de una muestra de ADN mediante la identificación del sexo del individuo a través de una PCR específica de los cromosomas X e Y, o por la identificación del perfil genético de ADN mediante su comparación con una muestra de referencia del mismo individuo, entre otras opciones.

III. CONTROLES DE CALIDAD EN MUESTRAS DE ARN

El control de calidad de muestras de ARN sigue, en cierta medida, pautas similares al ADN:

1. **Pureza y concentración:** al igual que en el caso del ADN, se pueden determinar mediante espectrofotometría.

2. **Integridad:** se puede analizar mediante electroforesis en gel de agarosa o mediante un electroferograma (análisis mediante densitometría e integración de áreas del resultado de una electroforesis del ARN en geles capilares). Esta última técnica presenta la ventaja de que permite analizar la calidad de ARN de pequeño tamaño (*small y microRNA*), que no es posible visualizar con otras técnicas.
3. **Funcionalidad:** el análisis funcional del ARN habitualmente se realiza traduciendo éste en ADN complementario (cDNA) mediante una retrotranscriptasa, y analizando secuencias específicas mediante RT-PCR o qRT-PCR. Esta metodología permite además conocer la pureza del ARN, ya que se puede detectar la presencia de contaminación con ADN genómico.

IV. CONTROLES DE CALIDAD EN CÉLULAS

El análisis de la calidad de cualquier tipo de células viables que se conservan en un biobanco CMSP, líneas celulares, cultivos celulares primarios obtenidos a partir de la disgregación de cierto tipo de tejidos,…etc.) debe incluir al menos el estudio de tres parámetros fundamentales:

1. **Presencia de contaminación celular:** los controles de calidad más comunes para detectar la presencia de hongos, levaduras y/o bacterias incluyen la observación de la muestra tanto a nivel macroscópico (turbidez, acidificación del medio), como microscópico (presencia de hifas o pequeñas células habitualmente en movimiento). Existen además kits comerciales que permiten la identificación de los microorganismos anteriormente mencionados y de micoplasmas (parásitos intracelulares) mediante PCR y/o ELISA.
2. **Viabilidad y estabilidad celular:** para preservar al máximo la viabilidad celular, se debe someter a las células que se desean conservar a un proceso de congelación lento entre -80ºC y -196ºC (idealmente disminuyendo la temperatura 1ºC por minuto hasta alcanzar -80ºC) en un medio crio-

protector (por ejemplo, DMSO) para mantener la estabilidad de la membrana celular y evitar así su ruptura por la formación de cristales de hielo durante el proceso de congelación. Para controlar la viabilidad celular, se puede descongelar una alícuota de las células que tenemos almacenadas (por motivos de seguridad, siempre se deben almacenar al menos dos alícuotas de cada muestra) y ponerlas en cultivo para analizar el porcentaje de supervivencia. Una viabilidad óptima se traduciría en un porcentaje de células vivas igual o superior al 90%, respecto al valor inicial previo al almacenamiento, tras su descongelación y posterior cultivo durante al menos dos días.

En cuanto a las líneas celulares, se debe controlar de manera exhaustiva el número de veces que la línea celular se ha dividido, ya que a medida que las células van envejeciendo, van acumulando mutaciones y cambios citogenéticos. Un control de calidad rápido y económico para comprobar si las células están en condiciones óptimas de crecimiento consiste en contar el número de cromosomas de las células mediante un análisis citogenético simple.

3. **Trazabilidad celular:** con el objeto de controlar la presencia de contaminación con otra muestra (por ejemplo, contaminación de una línea celular con otra), se debe establecer un protocolo de control de calidad que garantice la autenticidad de la muestra. En este caso, se podría realizar un análisis fenotípico de las células, analizando de manera visual al microscopio si la apariencia de las células es similar a una muestra de referencia de ese individuo (esto puede ser útil en el caso de que se comparen células de diferente origen como fibroblastos y células en suspensión). Asimismo, y como prueba definitiva, se podrían analizar marcadores genéticos de las células, desde marcadores de sexo, hasta el perfil genético del individuo de origen.

CONCLUSIÓN

Los biobancos permiten establecer colecciones de muestras tanto de donantes con una determinada patología como de controles sanos, cuyo uso ayuda a reducir los tiempos de realización y validación de diversas investigaciones, a la vez que facilitan el establecimiento de posibles colaboraciones y proyectos conjuntos entre diferentes investigadores. Sin embargo, el almacenamiento masivo de muestras biológicas plantea cuestiones técnicas complejas que afectan desde la propia recolección de la muestra, su transporte, su identificación, la trazabilidad, su conservación a diferentes temperaturas, la recuperación de la muestra guardada, el tratamiento informático de los datos, etc. Por lo tanto, para hacer eficaz la existencia de este tipo de establecimientos, es preciso tener una estandarización de los protocolos utilizados y es fundamental que se realicen controles internos de calidad de las muestras que se van a ceder a los investigadores solicitantes.

Bibliografia

1. A. FERNÁNDEZ, S. NOGUEIRA. GESTIÓN INFORMATIZADA DE BIOBANCOS. GESTIÓN Y REQUISITOS LEGALES. X CONGRESO VIRTUAL HISPANOAMERICANO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA. 2009. ISBN: 978-84-692-76778. PONENCIA Nº 1963. (HTTP://WWW.CONGANAT.ORG/10CONGRESO/TRABAJO.ASP?ID_TRABAJO=1963&TIPO=4).
2. BERNACKI S.H. ET AL. ESTABLISHMENT OF STABLY EBV-TRANSFORMED CELL LINES FROM RESIDUAL CLINICAL BLOOD SAMPLES FOR USE IN PERFORMANCE EVALUATION AND QUALITY ASSURANCE IN MOLECULAR GENETIC TESTING. J MOL DIAGN. 2003; 5(4): 227-230.
3. BETSOU F, LEHMANN S, ASHTON G ET AL. STANDARD PREANALYTICAL CODING FOR BIOSPECIMENS: DEFINING THE SAMPLE PREANALYTICAL CODE. CANCER EPIDEMIOL BIOMARKERS PREV. 2010 APR;19(4):1004-11.
4. BETSOU F: BIOBANK CERTIFICATION AND THE QUALITY OF BIOSPECIMENS. CTRNET BIOBANK CERTIFICATION WORKSHOP, JANUARY 27-28TH, 2011,VANCOUVER, CANADA.
5. CARDOSO S, VALVERDE L, ODRIOZOLA A, ELCOROARISTIZABAL X AND PANCORBO MM. QUALITY STANDARDS IN BIOBANKING: AUTHENTICATION BY GENETIC PROFILING OF BLOOD SPOTS FROM DONOR'S ORIGINAL SAMPLE. EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS (2010) 18, 848-851.
6. FREDSTED & VILLESEN 2004. FAST AND RELIABLE SEXING OF PROSIMIAN AND HUMAN DNA. A. J. PRIMATOL. 64: 345-350.
7. HORSMAN KM, HICKEY JA, COTTON RW, LANDERS JP AND MADDOX LO. DEVELOPMENT OF A HUMAN-SPECIFIC REAL-TIME PCR ASSAY FOR THE SIMULTANEOUS QUANTITATION OF TOTAL GENOMIC AND MALE DNA. J FORENSIC SCI, 51(4): 758-765 (2006).
8. J. BOOTHER. WHY DO WE NEED A LIMS? AUTOSCRIBE LTD. MAY 2011. (HTTP://WWW.AUTOSCRIBE.COM.UK).
9. J.C. BECK, C.M. BEISWANGER, E.M. JHON, E. SATURNIANO AND D. WEST. SUCCESFUL TRANSFORMATION OF CRYOPRESERVED LYMPHOCYTES: A RESOURCE FOR EPIDEMIOLOGICAL STUDIES. CANCER EPIDEMIOLOGY (2001), VOL. 10, 551-554. AUTHENTICATION.
10. KIM SY, KIM JS, HWANG SH, PARK HK, LEE JH, LEE DH, HAH SS, PARK DO Y. PROGASTRIN-RELEASING PEPTIDE IS A CANDIDATE MARKER FOR QUALITY CONTROL IN CLINICAL SAMPLE PROCESSING AND STORAGE. AM J CLIN PATHOL. 2012 FEB;137(2):277-82.
11. LENGELLÉ J, PANOPOULOS E, BETSOU F. SOLUBLE CD40 LIGAND AS A BIOMARKER FOR STORAGE-RELATED PREANALYTIC VARIATIONS OF HUMAN SERUM. CYTOKINE. 2008 NOV;44(2):275-82.
12. LEY 14/2007, DE 3 DE JULIO, DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA. BOE NÚM. 159 (28826-28848).
13. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL AND LABORATORY STANDARD. STATISTICAL QUALITY CONTROL FOR QUANTITATIVE MEASUREMENTS: PRINCIPLES AND DEFINITIONS; APPROVED GUIDELINE. NCCLS C24-A2. WAYNE: NCCLS; 1999.
14. NILSSON TK, BOMAN K, JANSSON JH ET AL. COMPARISON OF SOLUBLE THROMBOMODULIN, VON WILLEBRAND FACTOR, TPA/PAI-1 COMPLEX, AND HIGH-SENSITIVITY CRP CONCENTRATIONS IN SERUM, EDTA PLASMA, CITRATED PLASMA, AND ACIDIFIED CITRATED PLASMA (STABILYTE) STORED AT -70 DEGREES C FOR 8-11 YEARS. THROMB RES. 2005;116(3):249-54. EPUB 2005 JAN 12.
15. RED NACIONAL DE BIOBANCOS. GUÍA PARA LA IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD DEL BIOBANCO. MAYO 2012.
16. RIEGMAN P.H.J., DINJENS W.N.M., OOSTERHUIS J.W. BIOBANKING FOR INTERDISCIPLINARY CLINICAL RESEARCH. PATHOBIOLOGY 2007; 74(4): 239-244.
17. UNE-EN-ISO 9000:2005. SISTEMAS DE GESTIÓN DE LA CALIDAD. FUNDAMENTOS Y VOCABULARIO.
18. VAUGHT J, CABOUX E, HAINAUT P. INTERNATIONAL EFFORTS TO DEVELOP BIOSPECIMEN BEST PRACTICES. CANCER EPIDEMIOL BIOMARKERS PREV APRIL 2010 19:912-915.

19. 2008 BEST PRACTICES FOR REPOSITORIES. COLLECTION, STORAGE, RETRIEVAL AND DISTRIBUTION OF BIOLOGICAL MATERIALS FOR RESEARCH. CELL PRESERVATION TECHNOLOGY VOL 6, NUMBER 1, 2008.

CAPÍTULO 5

CONTROLES DE CALIDAD INTERBIOBANCOS

CONTROLES DE CALIDAD INTERBIOBANCOS

Irene Consuegra

Tatiana Díez

Inés Santiuste

Coordinadora del capítulo: Edurne Pedrosa

CONTROL DE LA CALIDAD

La consolidación de la calidad es el conjunto de acciones, planificadas y sistemáticas, que son necesarias para proporcionar la confianza adecuada de que un producto o servicio va a satisfacer los requisitos esperados. Aunque inicialmente el control de calidad se aplicó solo a la fabricación industrial, rápidamente extendió su radio de acción a la prestación de servicios, donde también podemos incluir el área de la salud, especialmente para los laboratorios de análisis clínicos y, por supuesto, para los biobancos con fines de investigación.

Un elemento fundamental en la filosofía del control de calidad es la utilización generalizada de procedimientos normalizados, incluyendo los métodos estadísticos, en la planificación, recogida de datos y análisis de los mismos, de tal forma que las decisiones no se sustenten en meras conjeturas. Las determinaciones en el laboratorio están sometidas a múltiples fuentes de error, que pueden evitarse o no, y en su conjunto determinan la calidad del análisis. Para controlar estos errores, el biobanco debe establecer su sistema de calidad basado en las buenas prácticas de laboratorio y los procedimientos de control interno, lo cual debe reforzarse con un control externo que se manifiesta en la participación en programas de calidad interlaboratorio, donde se puede evaluar la competencia técnica de cada biobanco participante.

Los controles de calidad interlaboratorio, también aquí denominados interbiobanco, se realizan con el interés de evaluar un método analítico, y definen los parámetros de precisión, exactitud, límite de detección y porcentaje de recuperación, entre otros. También sirven para medir la aptitud de diferentes biobancos por la comparación de sus resultados con valores establecidos o para determinar con cierto grado de precisión, una o varias características de un material de ensayo.

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO INTERBIOBANCO

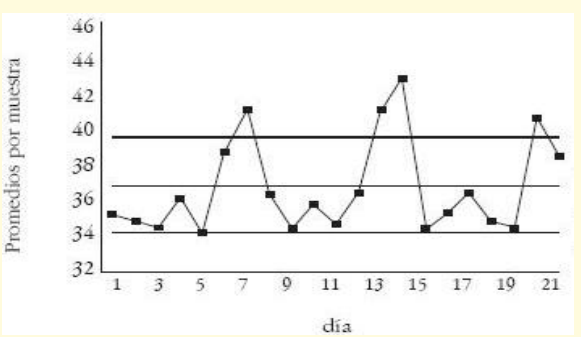
Compara los resultados de controles de calidad de un biobanco con los de otros biobancos que utilizan el mismo método, puede incrementar la confianza en los resultados de las pruebas y de la calidad del material biológico almacenado.

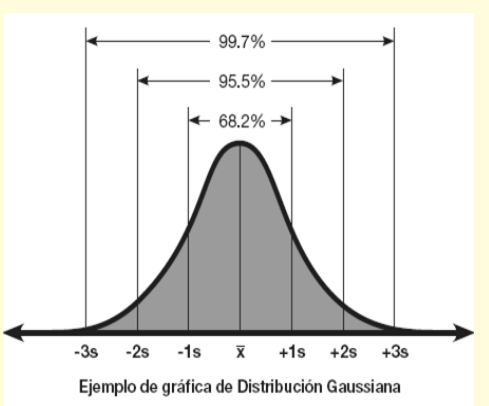
La participación en un programa de calidad interbiobanco que ofrezca comparación por grupos para sus controles de calidad, puede alertar oportunamente de cambios graduales o repentinos en la determinación de ensayos y/o en el material biológico almacenado.

Además, los informes y gráficas proporcionados por un programa bien establecido, que integre a todos los miembros de la RNBB, puede facilitar significativamente la tarea de administración y seguimiento de los datos de calidad de cada biobanco.

Por tanto, el programa de calidad externo permite que los datos obtenidos a través de la participación de cada uno de los biobancos, puedan adaptarse a un programa de calidad interbiobanco definido por la RNBB, registrándose los resultados de cada centro en un gráfico de Levey-Jennings de segundo nivel (Figura 1). De esta manera, se alcanza un control global para el grupo, que permite a cada biobanco contrastar la potencia y fiabilidad de su operativa.

Figura 1. Gráfica de Levey-Jennings





– **Procedimiento para elaborar un gráfico de Levey-Jennings de segundo nivel:**

Para la elaboración de un gráfico de Levey-Jennings se calcula el Índice de desviación estándar (IDS) para cada tipo de determinación analítica (Tabla 1) y se representan mediante una gráfica. Este índice incluye los límites deseables y el error total, operando a modo de "control de calidad externo", y permite observar a cada biobanco participante en el programa sus posibles fluctuaciones respecto al resto de los biobancos participantes.

Tabla 1. Cálculo del índice de desviación estándar

$$IDS = (X - \dot{X}) / DS$$

Donde:

X = Resultado del laboratorio

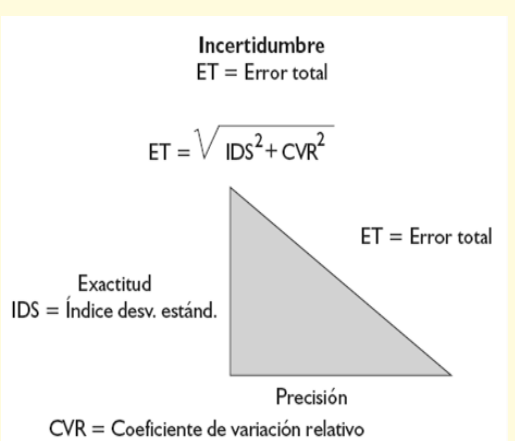
$\dot{X}$ = Resultado promedio del grupo o valor designado

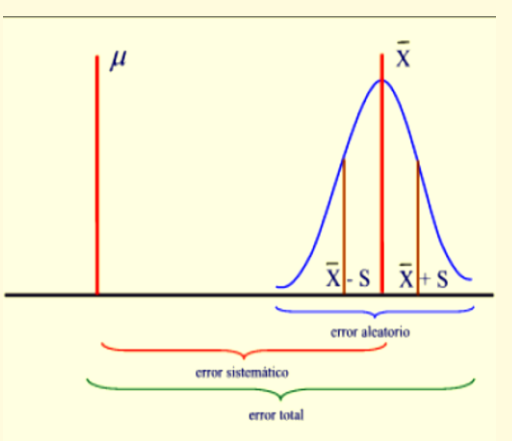
DS = Desviación estándar del grupo

I. TIPOS DE ERRORES EN LAS DETERMINACIONES ANALÍTICAS: ERROR ALEATORIO, ERROR SISTEMÁTICO Y ERROR TOTAL

En los resultados de cualquier biobanco o laboratorio, dentro de la variabilidad analítica, son dos las incertidumbres que se deben medir: la precisión y la exactitud. La precisión es la reproducibilidad de resultados bajo las mismas condiciones, y el error asociado se denomina "Error Aleatorio (EA)", impredecible e inherente a toda medición. La exactitud, medida de lo correcta que es una determinación, se ve afectada por el "Error Estándar o Sistemático (ES)" y cuantifica cuánto se alejan los valores obtenidos en el biobanco o laboratorio de sus correspondientes valores "verdaderos". De los resultados obtenidos se puede conocerse el "Error Total Máximo" (ET) (Figura 2).

Figura 2. Representación gráfica del ET y determinación del ET conforme al teorema de Pitágoras





EXACTITUD y ES: Se cuantifica mediante la fórmula: $DS/\sqrt{n}$

Dónde DS es la desviación estándar y n el número de medidas realizadas.

PRECISIÓN y EA: Se cuantifica a través del Coeficiente de Variación Relativo (CVR), el cual se estipula a un nivel de confianza del 95%:

$$CVR = 1{,}65CV$$

Dónde $CV = (DS/x)*100$

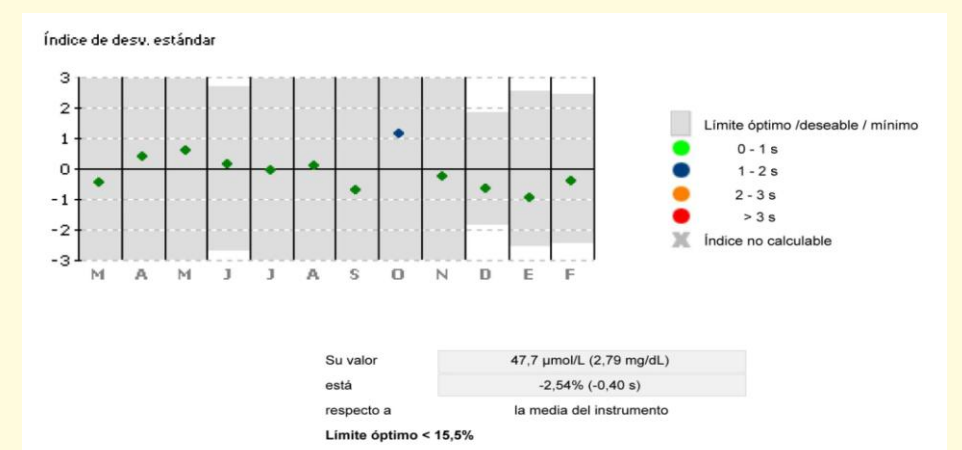
Siendo DS la desviación estándar

De esta forma, el ET también se puede expresar como:

$$\mathbf{ET: [1{,}65(DS/x)*100] + DS/\sqrt{n}}$$

Este ET muestra el límite deseable, ya sea mínimo u óptimo, que sirve para evaluar la operativa y la calidad de las muestras preservadas en cada biobanco, en referencia al resto de los biobancos que realizan la misma actividad. En función de estos datos se obtiene una gráfica por cada biobanco participante en el programa (Figura 3).

Figura 3. Ejemplo de gráfico de Levey-Jennings: representación de los resultados de un parámetro analítico obtenidos a través de un programa de calidad externo con límites inferiores y superiores ubicados a 1, 2 y 3 desviaciones estándar



El límite deseable u óptimo obtenido por el ET (área x $\pm$ ET) se muestra en la gráfica mediante un sombreado gris (Figura 3). Si la desviación propia del biobanco para aquel parámetro se encuentra dentro de los límites establecidos, la operativa y calidad de su producto queda asegurada. En caso contrario, habrían de revisarse los protocolos y las calibraciones de los equipos. Asimismo, cuando los resultados presentan un IDS superior a 2 en más de un 33% de los casos, se aconseja una revisión general de los protocolos de todos los centros participantes en el programa de calidad externo.

Bibliografía

1. BARNETT, R.N. CLINICAL LABORATORY STATISTICS. 2O ED.,BOSTON: LITTLE. BROWN AND COMPANY, 1979; 121-132.
2. BURGER D, TEULEN M, EERLAND J, HARTEVELD A, AARNOUTSE R, TOUW D. THE INTERNATIONAL INTERLABORATORY QUALITY CONTROL PROGRAM FOR MEASUREMENT OF ANTIRETROVIRAL DRUGS IN PLASMA: A GLOBAL PROFICIENCY TESTING PROGRAM. THER DRUG MONIT. 2011 APR; 33(2): 239-43.
3. HARRISON P, AULT KA, CHAPMAN S, CHARIE L, DAVIS B, FUJIMOTO K, HOUWEN B, KUNICKA J, LACOMBE F, MACHIN S, RAYNOR R, VAN HOVE L, VAN ASSENDELFT OW; INTERNATIONAL SOCIETY OF LABORATORY HEMATOLOGYTASK FORCE FOR THE REFERENCE PLATELET COUNT. AN INTERLABORATORY STUDY OF A CANDIDATE REFERENCE METHOD FOR PLATELET COUNTING. AM J CLIN PATHOL. 2001 MAR;115(3):448-59.
4. GRANT, E.L. AND R.S. LEAVENWORTH (1988). "STATISTICAL QUALITY CONTROL", SIXTH EDITION, MCGRAW-HILL BOOK COMPANY.
5. PINEAU A, OTZ J, GUILLARD O, FAUCONNEAU B, DUMONT G, FRANÇOISE-BURG. INTERLABORATORY COMPARISON STUDY ON LEAD IN BLOOD, IN EXTERNALQUALITY ASSESSMENT SCHEMES SINCE 1996: A PROGRESS REPORT. TOXICOL MECH METHODS. 2014 SEP;24(6):396-403.
6. VAN DER MEER PF, DIJKSTRA-TIEKSTRA MJ, MAHON A, DE WILDT-EGGEN J; BEST COLLABORATIVE. COUNTING PLATELETS IN PLATELET CONCENTRATES ON HEMATOLOGYANALYZERS: A MULTICENTER COMPARATIVE STUDY. TRANSFUSION. 2009 JAN;49(1):81-90. DOI: 10.1111/J.1537-2995.2008.01930.X. EPUB 2008 OCT 2.
7. WESTGARD, J.O., P.L. BARRY, AND M.R. HUNT (1981). "A MULTI-RULE SHEWHART CHART FOR QUALITY CONTROL IN CLINICAL CHEMISTRY,"CLINICAL CHEMISTRY, VOL. 27, PP. 493-501

CAPÍTULO 6

PLASMA RICO EN PLAQUETAS, PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO Y LISADO PLAQUETAR

PLASMA RICO EN PLAQUETAS, PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO Y LISADO PLAQUETAR

Almudena García

Sonia Pérez

Anna Bosch

Coordinadora del capítulo: Irene Consuegra

INTRODUCCIÓN

Cuando un tejido es agredido, el organismo inicia una serie de reacciones tisulares complejas orientadas a la resolución de la lesión. El resultado final es la formación de un tejido afuncional en la zona traumatizada a consecuencia de la división celular y la síntesis proteica implicada en la resolución. Esto se conoce a menudo con el nombre de cicatrización. Durante el largo proceso de recuperación de la zona afectada el tejido lesionado puede evolucionar de dos formas: regenerándose o reparándose. Se entiende por reparación la restauración de un tejido, con células de distinta morfología a las originales y en consecuencia de distinta función. En este caso el tejido afecto normalmente ve limitada su función normal por la formación de tejido fibrótico (cicatriz).

La regeneración celular sin embargo, es un mecanismo de resolución de la lesión de un tejido dónde las células a reparar son sustituidas por células similares, con propiedades análogas a las anteriores, no alterándose ni la arquitectura ni la función del tejido original. En la actualidad gran número de investigaciones biomédicas se dedican a la identificación de mecanismos implicados en la regeneración y reparación tisular, destacando el papel activo de los factores de crecimiento y de las proteínas plaquetarias y plasmáticas en la restitución celular.

Más allá de su uso terapéutico directo, el plasma rico en factores de crecimiento se está probando como sustituto de sueros de origen animal en cultivos de células mesenquimales con resultados prometedores. En estos artículos, se habla de lisado plaquetar en vez de plasma rico en factores de crecimiento (PRFC).

Para profundizar en el conocimiento del comportamiento biológico de los factores de crecimiento plaquetarios en la reparación tisular es necesario realizar estudios experimentales en plasma rico en plaquetas (PRP). Estos estudios deben incluir la determinación y cuantificación de los factores de crecimiento *in situ* en la aplicación del PRP permitiendo profundizar en el conocimiento del comportamiento biológico de los factores de crecimiento plaquetarios en la reparación tisular. Hay que determinar por qué los productos ricos en plaquetas son muy efectivos en casos determinados, pero ineficaces en otros.

CARACTERÍSTICAS

- El PRP es una suspensión concentrada de la sangre centrifugada que contiene elevadas concentraciones de trombocitos (plaquetas)
- El PRFC es una suspensión de plasma en el que se encuentran libres los factores de crecimiento plaquetarios, que puede ser congelado y empleado con posterioridad
- El Lisado Plaquetar es PRFC al que se han retirado mediante filtración los restos celulares de las plaquetas

Durante los últimos años, estos compuestos han aparecido de forma repetida en publicaciones científicas como productos que por sus características inducen la curación y regeneración de los tejidos. La hipótesis de trabajo que ha conducido al desarrollo de la utilización del PRP es que en un producto con mayor concentración de plaquetas, los niveles de factores de crecimiento aumentarían en relación lineal con el número de plaquetas. Así pues, el objetivo de tener un PRP es favorecer la concentración de factores de crecimiento y a su vez promover la regeneración y crecimiento celular. Los factores de crecimiento predominantes en el plasma son:

- PDGF *(Plateled derived Growth Factor)*
- TGF-beta *(Transformed beta Growth Factor)*
- FGF (*Fibroblast Growth Factor)*
- IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*)
- VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*)
- EGF (*Epidermal Growth Factor*)…

Los factores de crecimiento son proteínas secretadas que al entrar en contacto con la membrana celular estimulan un receptor específico y afectan a funciones celulares tales como la migración, diferenciación y proliferación celular durante el crecimiento y desarrollo del tejido, así como en las agresiones o lesiones y en la reparación (Figura 1). Existen tres tipos de efectos: paracrino, autocrino y endocrino. Los efectos de los factores de crecimiento pueden ser descritos atendiendo también a la respuesta mediada por el tipo de receptor:

- Receptores tirosinquinasa
- Receptores asociados a proteína G
- Receptores serin/treonin quinasas43

Cada uno de estos factores realiza una serie de funciones concretas como pueden ser la activación de la angiogénesis, proliferación de fibroblastos y células mesenquimales, síntesis de colágeno y migraciones de células endoteliales. Los factores de crecimiento tienen un elevado coste económico, y son necesarias dosis repetidas para conseguir un efecto terapéutico clínicamente evidente. Por este motivo, la hipótesis de trabajo que ha conducido al desarrollo del PRP es que en

un producto con mayor concentración de plaquetas, los niveles de factor de crecimiento aumentarían en relación lineal con el número de plaquetas. La producción de un gel constituido por PRP permitiría una liberación sostenida de los factores de crecimiento.

Figura 1. Factores de crecimiento generados por las plaquetas y sus efectos fisiológicos

Fuente: Elaboración propia

Por tanto el PRP se emplea asiduamente en tratamientos regenerativos y es por ello es útil su criopreservación para cesión en estudios que tengan relación con alguna las áreas:

- Proyectos de regeneración ósea, ya que favorecen la proliferación de osteocitos
- Neovascularización por su efecto angiogénico
- Cirugía de cualquier tipo para regeneración de heridas. Actualmente se emplea mayoritariamente en cirugía maxilofacial y estética
- Proliferación celular
- Oftalmología por regeneración de nervio óptico
- Trasplantes, ya que permite la autotransfusión de PRP minimizando los tiempos de regeneración de tejido y disminuyendo los problemas de rechazo

Las plaquetas están implicadas en la aceleración de la regeneración ósea mediante la proliferación de los osteoblastos, aumentando hasta 50 veces la síntesis de ADN en cultivos de hueso humano. El aumento de la actividad mitogénica, aumenta la presencia de tejido mineralizado. Por la propia acción de estos compuestos, se debe considerar que hay estudios para los que se desaconseja su uso, dentro de los que estarían los relacionados con:

- Metástasis y carcinogénesis, debido a un efecto mitogénico
- Determinadas coágulopatías, ya que se pueden generan anticuerpos contra los factores de coagulación V y XI

Tabla 1. Principales respuestas a un aumento de la concentración de factores de crecimiento

	PROLIFERACIÓN PRE/OSTEOBLASTOS	PROLIFERACIÓN FIBROBLASTOS	QUIMIOTAXIS	SÍNTESIS DE MATRÍZ EXTRACELULAR	VASCULARIZACIÓN
PDGF	++	++	+	+	*
TGFβ	+/-	+/-	+	++	*
EGF	-	++	+	*	-
IGF	++	+	++	++	-
VEGF	+		-	-	++

++: Gran aumento; +: Aumento; -: Sin efecto; *: Efecto indirecto

Fuente: Elaboración propia

Un punto importante a tener en cuenta en la reparación de tejidos es cuando la cantidad de factores de crecimiento pueden generar un efecto catabólico en vez de un efecto anabólico como correspondería esperar. Dicha actividad anabólica es debida a la neovascularización provocada por los efectos angiogénicos del PRP, y puede generar una artrofibrosis. Así, al promover la neovascularización y el crecimiento de nuevos vasos produce un exceso de actividad anabólica dando como resultado una artrofibrosis.

La aparición de focos de osificación heterotrópica es debida a una diferenciación aberrante de condrocitos y fibroblastos, situación que se ve favorecida por la acumulación de los efectos producidos por la concentración plaquetaria. Asimismo, El PRFC podría actuar como promotor en la carcinogénesis, favoreciendo la división y promoción de células previamente mutadas o "iniciadas" en la carcinogénesis. Probablemente los campos de la medicina menos reticentes y dónde actualmente más se comienza a utilizar esta técnica con respecto a los tratamientos convencionales son la implantología oral, cirugía estética y la traumatología.

En este último campo se ha mejorado en gran medida la calidad de vida de pacientes, que mediante la implantación de prótesis articulares se ha evitado el uso de sillas de ruedas de por vida. Otro colectivo de pacientes que comienzan a beneficiarse de la aplicación de PRP son los afectados por la diabetes, quienes han visto reducido en más del 50% el tiempo de curación de úlceras en miembros inferiores y disminuido el número de amputaciones a ese nivel, aumentando de esta forma la calidad de vida.

OBTENCIÓN

I. PLASMA RICO EN PLAQUETAS

El PRP es un volumen de plasma extraído a partir de una muestra de sangre. Si esta sangre es del propio paciente se aporta la ventaja adicional de que no es tóxico ni inmunoreactivo para el receptor. Este plasma contiene una cantidad de plaquetas de tres a cinco veces mayor que la que se encuentra en la sangre normal (idealmente debemos alcanzar la cifra de 1.000.000 plaq/µL).

El plasma a aplicar debe tener una concentración plaquetaria no inferior a 300-350.000 plaq/µL, siempre que el plasma no contenga leucocitos; mientras que se ha demostrado que concentraciones superiores a 1.000.000 plaq/µL no tienen efecto o, en el caso de que lo haya, dicho efecto es negativo. Uno de los factores a tener en cuenta previos a la obtención de estas muestras es el tipo de anticoagulante a ser empleado. El compuesto idóneo para obtener este tipo de muestras es el citrato sódico al 3,8%, ya que el EDTA produce un hinchamiento en las plaquetas que las hace perder su forma discoidal para transformarlas en esféricas, mientras que el ACD, al poseer un pH más bajo de 6,5 interfiere en la agregación plaquetaria.

La muestra se obtiene por los mecanismos clásicos de venopunción, ("PNT Obtención de muestras sanguíneas", Anexo 1) en tubos de ensayo estériles con citrato sódico al 3,2% como anticoagulante. Mantener la muestra en reposo durante 90 min y después resuspender preferentemente en agitador durante 10 min. Existe gran variabilidad en el proceso de centrifugación que oscilan de 200 a 2000 g durante 5 a 20 min. Hay que tener en cuenta el inconveniente de que los resultados son poco reproducibles ya que están influenciados por el hematocrito y la cifra de plaquetas inicial. Una de las opciones más habituales es realizar una centrifugación de 1300-1500 g durante 10 min.

En la parte más superficial, y siguiendo un recorrido hacia el fondo del tubo, nos encontramos con: una fracción de plasma pobre en plaquetas, seguido de una cantidad de plasma con el mismo contenido de plaquetas que en una muestra de sangre normal, un concentrado de plasma rico en plaquetas e inmediatamente después una concentración de los hematíes existentes en la muestra, interponiéndose entre los dos últimos la serie blanca (Figura 2).

Para obtener el PRP se debe tomar la parte de plasma más cercana a la capa leucocitaria, ya que es dónde se concentran estos factores de crecimiento, si se quiere obtener un plasma pobre en plaquetas y factores de crecimiento ha de evitarse esta zona y recoger la más externa. Mediante una pipeta se extraen por aspiración las porciones de plasma pobre en plaquetas que al estar situados encima de PRP impiden el libre acceso a éste.

Con otra pipeta estéril se aspira con sumo cuidado, para no contaminar éste con los hematíes inferiores, el concentrado de plasma rico en plaquetas y se transfiere a un tubo estéril de 15 ml. Con este plasma se realiza una segunda centrifugación a 2500 g durante 15 min. ("PNT Extracción procesado y almacenaje de muestras de plasma", Anexo 1).

Figura 2. Separación de la muestra sanguínea en sus distintos componentes

Con este proceso se obtiene en el tubo una fracción superior de sobrenadante color amarillo claro, que contiene fibrinógeno y una concentración muy baja de plaquetas, y una franja inferior generalmente de color rojizo formada por PRP muy concentrado, con aproximadamente el triple de la concentración de plaquetas y factores de crecimiento que un plasma fisiológicamente normal.

Para realizar el recuento de plaquetas posterior, es conveniente dejar la muestra en reposo durante al menos 60 min, de forma que se estabilice y disminuir el sesgo de contaje por la alta concentración y agregados tras la centrifugación. Otra opción es diluir la muestra con suero fisiológico en la proporción 1:5.

Como recomendaciones finales, la esterilidad ha de ser un factor muy importante en la manipulación de este tipo de muestras, puesto que estos preparados son un medio perfecto para el crecimiento bacteriano. Cuando se preparen en circuito abierto deberá disponerse de cabina de flujo laminar 2A en un entorno clase D. Además, debido a su efecto proliferativo, son perfectos como inductores de tumores, por lo que se debe evitar su contacto mantenido.

A continuación se detalla una colección de métodos de obtención de plasma rico en plaquetas, algunos de ellos emplean distintos anticoagulantes y medios de sedimentación, si bien se aconseja el citrato sódico y la centrifugación como método estándar.

Tabla 2. Plasma Rico en Plaquetas vs Plasma rico en factores de crecimiento

TABLA 2: MÉTODOS DE OBTENCIÓN PRP/PRF			
AUTORES	ANTICOAGULANTE	MÉTODO DE SEDIMENTACIÓN	ACTIVACIÓN
Fukaya et al. 2014	ACD-A	• Consultar artículo "A New Economic Method for Preparing Platelet-rich Plasma". • PMID: 25289355 - PubMed	Prostaglandina E1 (PGE1)
Sarkar et al. 2010	Citrato sódico	• 840 g - 10 min • 1310 g - 10 min	Se añade colágeno tipo I
Sánchez et al. 2009	Citrato sódico al 3,8%	• 640 g - 8 min • PRP + membrana de fibrina	10% CaCl2/ml
Hatakeyama et al. 2008	Citrato sódico al 3,8%	• Método Anitua • Método Sonnletner	10% CaCl2/ml
Anitua et al. 2007	Citrato sódico al 3,8%	• 460 g – 8 min PRP • 4500 g – 12 min PPP	10% CaCl2/ml
Chang et al. 2007	Citrato dextrosa 1:10	•3650 rpm – 6 min •3000 rpm – 6 min	Trombina 1000U 10%CaCl2/ml
Fdez Barbero et al. 2006	Citrato sódico al 3,8%	• 1500 rpm – 6 min	CaCl2 + baño caliente 20 minutos
Ranly et al. 2005	-	•Harvest preparation	Trombina
Jakse et al. 2003	Citrato dextrosa 1:10	• 800 g – 15 min	-
Gruber et al. 2002	Citrato dextrosa 1:10	• 1400 g – 10 min •Plaquetas resuspendidas en wash tyrode buffer pH6,4	Trombina

Fuente: elaboración propia

Los preparados comerciales diseñados para la obtención de PRP más utilizados actualmente son:

- RGF System II.BRI®
- Curasan system®
- Fibrinet® Autolgous Fibrin etplatelet System
- Plateltex®
- Friadent-Schützer®
- PDGF 90-1
- Plaquetar®

II. PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO

Permite obtener más volumen de sangre por extracción y de esta forma más dosis de tratamiento. Cada unidad de plasma rico en plaquetas se obtendrá de una sola donación de sangre total de 150-450 ml. El plasma rico en plaquetas se

preparará de acuerdo a los procedimientos estándares habituales en un centro de transfusión:

- 2000 g x 3 min + 2000 g x 10 min o 5000 gx6 o 580 x 20. AABB
  Una centrifugación 400-500 g x 5 min.

  1ª centrifugación 4100 g x 15 + 2ª 300 g x 6 + 3ª 4600 g x 15.
- 1ª centrifugación 1000 gx15 + 3000 gx10

Para conseguir la liberación de los factores de crecimiento de los gránulos plaquetarios al plasma, se debe romper la membrana celular mediante congelación a -30° en un sistema apto durante al menos 24h. Es conveniente congelar el máximo número de alícuotas posible según la dosis deseada. De esta forma el PRFC se puede mantener hasta 6 meses entre -20 y -40ºC o hasta 5 años si se mantiene entre -40 y -80ºC. Cuando se utilice una alícuota, se llevará a cabo una descongelación lenta (1-6ºC) y se atemperará inmediatamente antes de su administración. En el caso que las alícuotas no se hubieran realizado con anterioridad, se realizarían en este momento.

III. LISADO PLAQUETAR PARA CULTIVOS CELULARES

Se obtiene a partir de PRFC al que se ha retirado los desechos celulares de las plaquetas. Mediante centrifugación se retira la mayor parte de las membranas. Se recomienda 3500 g x 30 min y se deben considerar las siguientes indicaciones:

- El plasma se pasará por un filtro de 0.22-0.8 µm
- Las alícuotas se pueden conservar durante 2 años a temperaturas inferiores a -30ºC
- Este proceso se realizará en las máximas condiciones de esterilidad posibles

MANEJO DE LAS MUESTRAS DE PRP/PRFC

El PRP contiene dos tipos de componentes uno fibrilar y otro celular, las plaquetas. Una vez que van a ser utilizadas las muestras de PRP es necesario iniciar la activación y agregación plaquetaria. Si este servicio va a ser realizado por el biobanco deben tenerse en cuenta ciertas cuestiones.

El coágulo (la parte fibrilar) se compone de fibrina, fibronectina, y vitronectina, que son moléculas de adhesión celular requeridas para la migración celular como la que se aprecia en la osteoconducción y la epitelización de lesiones. En la parte celular, los gránulos alfa de las plaquetas contienen más de 30 proteínas bioactivas, muchas de las cuales tienen un papel fundamental en la hemostasia y/o reparación de los tejidos.

Con la activación plaquetaria se inicia la liberación de los factores de crecimiento, es decir, de las proteínas que acelerarán el proceso de regeneración celular, además de la coagulación del fibrinógeno.

Para producir el coágulo es necesario Ca^{2+}, que actúa como cofactor en la activación plaquetaria. El calcio es el principal responsable de la transformación de la protombina en trombina y ésta es la responsable de iniciar la cascada de la coagulación hasta la formación del coágulo, mediante una red de fibrina que sirve de anclaje a las plaquetas. Esto es un dato importante a tener en cuenta, ya que se recomienda no añadir en cloruro de calcio hasta 10 minutos antes de la aplicación. No obstante se pueden acortar los plazos con baño térmico a 37°C.

Cuando es necesario que la formación del coágulo sea de una forma más rápida, en vez de utilizar calcio, se opta por el uso directo de trombina. En este caso, el coágulo se forma en 1-2 min.

En caso de que la muestra tenga como destino estudios relacionados con la regeneración tisular en tejido óseo, el PRP puede asociarse a un material osteoconductor, como injertos autógenos, aloinjertos o incluso a materiales de osteosíntesis como la hidroxiapatita reabsorbible.

Por último, en cuanto a la bioseguridad relacionada biobancos que trabajen con muestras de PRP, ha de tenerse en cuenta que no se recomienda la manipulación o extracción de este tipo de muestras por parte de personal que presente infecciones activas, gangrena o neoplasias, ya que este tipo de muestras constituye un formidable caldo de cultivo para la proliferación de bacterias y un potente estimulador de la mitosis en células cancerígenas. En el caso de que la activación del PRP tras su obtención se realice por personal del biobanco, debe tenerse en consideración que se utiliza trombina bovina, la cual ha sido relacionada con el desarrollo de anticuerpos contra el factor V y XI, dando lugar a la aparición de coágulopatías mortales. Además este fenómeno no parece ser un fenómeno dosis-dependiente, lo cual lo hace más peligroso debiendo ser reforzadas las medidas de protección y la atención del personal encargado de su manipulación.

BIBLIOGRAFÍA

1. ANDIA I, SÁNCHEZ M, MAFFULLI N. JOINT PATHOLOGY AND PLATELET-RICH PLASMA THERAPIES. EXPERTOPINBIOLTHER. 2012 JAN;12(1):7-22.
2. ANITUA E, SÁNCHEZ M, NURDEN AT, NURDEN P, ORIVE G, ANDÍA I. NEW INSIGHTS INTO AND NOVEL APPLICATIONS FOR PLATELET-RICH FIBRIN THERAPIES. TRENDS BIOTECHNOL. 2006;24:227–234.
3. ANITUA E. UN NUEVO ENFOQUE EN LA REGENERACIÓN ÓSEA. PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO (P.R.G.F). EDITORIAL: PUESTA AL DÍA PUBLICACIONES, S.L. 2000 VITORIA-ESPAÑA.
4. BECA T, HERNÁNDEZ G, MORANTE S, BASCONES A. PLASMA RICO EN PLAQUETAS. UNA REVISÓN BIBLIOGRÁFICA. AV PERIODON IMPLANTOL. 2007; 19, 1: 39-52.
5. BONETE LLUCH D. TESIS DOCTORAL "VALORACIÓN DE LA REGENERACIÓN ÓSEA EN UN MODELO ANIMAL: UTILIZACIÓN DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS EN LA CURACIÓN DE LOS DEFECTOS ÓSEOS. ESTUDIO PRELIMINAR PARA UN DISEÑO EXPERIMENTAL EN CONEJOS". UNIVERSIDAD DE VALENCIA 2006
6. B. GÓMEZ MARTÍN, R. BECERRO DE BENGOA VALLEJO, M. E. LOSA IGLESIAS, R. SÁNCHEZ GÓMEZ. PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO (PRGF). REVISTA INTERNACIONAL DE CIENCIAS PODOLÓGICAS ISSN: 1887-7249. VOL. 1, NÚM. 1, 2007, 7-10
7. CHRISTELLEDOUCET, ISABELLE ERNOU, YIZHOU ZHANG, JEAN-ROCHLLENSE, LAURENT BEGOT, XAVIER HOLY AND JEAN-JACQUES LATAILLADE. PLATELET LYSATES PROMOTE MESENCHIMAL STEM CELL EXPANSION: A SAFETY SUBSTITUTE FOR ANIMAL SAERUM

IN CELL-BASED THERAPY APPLICATIONS. JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY 2005; 205: 228-236.

8. COLE BJ, SEROYER ST, FILARDO G, BAJAJ S, FORTIER LA. PLATELET-RICH PLASMA: WHERE ARE WE NOW AND WHERE ARE WE GOING?. SPORTS HEALTH. 2010 MAY;2(3):203-10.
9. C. CAPELLI, M DOMENGHINI, G BORLERI, P BELLAVITA, R POMA, ACAROBBIO, C MICO, A RAMBALDI,J GOLA1 AND M INTRONA.HUMAN PLATELET LYSATE ALLOWS EXPANSION AND CLINICAL GRADE PRODUCTIONOF MESENCHYMAL STROMAL CELLS FROM SMALL SAMPLES OF BONE MARROW ASPIRATES OR MARROW FILTER WASHOUTS. BONE MARROW TRANSPLANTATION 2007; 40, 785–791.
10. C.-Y. SU, Y. P. KUO, Y. C. LIN, C.-T. HUANG,Y. H. TSENGAND T. BURNOUF. A VIRALLY INACTIVATED FUNCTIONAL GROWTH FACTOR PREPARATION FROMHUMAN PLATELET CONCENTRATES. VOXSANGUINIS2009;97, 119–128.
11. FILARDO G, KON E, DI MARTINO A, DI MATTEO B, MERLI ML, CENACCHI A, FORNASARI PM, MARCACCI M. PLATELET-RICH PLASMA VS HYALURONIC ACID TO TREAT KNEE DEGENERATIVE PATHOLOGY: STUDY DESIGN AND PRELIMINARY RESULTS OF A RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL. BMC MUSCULOSKELETDISORD. 2012 NOV 23;13:229
12. GOBBI A, KARNATZIKOS G, MAHAJAN V, MALCHIRA S. PLATELET-RICH PLASMA TREATMENT IN SYMPTOMATIC PATIENTS WITH KNEE OSTEOARTHRITIS: PRELIMINARY RESULTS IN A GROUP OF ACTIVE PATIENTS. SPORTS HEALTH. 2012 MAR;4(2):162-72.
13. GONSHOR A. TECNICAS PARA PRODUCIR PLASMA RICO EN PLAQUETAS Y CONCENTRADO PLAQUETARIO: ANTECEDENTES Y PROCESO. REVISTA INTERNACIONAL DE ODONTOLOGÍA RESTAURADORA Y CONSERVADORA. 2002; 6 (6):583-93.
14. J. CARRASCO, D. BONETE, F. GOMAR. PLASMA RICO EN PLAQUETAS VS. PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO. REVISTA ESPAÑOLA DE CIRUGÍA OSTEOARTICULAR. N.º 239. VOL. 46. JULIO - SEPTIEMBRE 2009.
15. J. CRANIOF SURG 2005; 16:1043-54.
16. MANUAL DE AABB: MANUAL TÉCNICO SOCIEDAD AMERICANA DE BANCOS DE SANGRE. 15ª EDICIÓN.
17. NATALIE FEKETEL, MELANIE GADELORGE, DANIEL FURSTL, CAROLINE MAURERL,JUUADAUSENDL, SANDRINE FLEURY-CAPPELLESS0, VOLKER MALLANDERL,RAMINLOTFJI, ANITA IGNATIUS, LUC SENSEBE, PHILIPPE BOURIN,HUBERT SCHREZENMEIERL& MARKUS THOMAS ROJEWSKIL. PLATELET LYSATE FROM WHOLE BLOOD-DERIVED POOLED PLATELET CONCENTRATESAND APHERESIS-DERIVED PLATELET CONCENTRATES FOR THE ISOLATION ANDEXPANSION OF HUMAN BONE MARROW MESENCHYMAL STROMAL CELLS:PRODUCTION PROCESS, CONTENT AND IDENTIFICATION OF ACTIVE COMPONENTS. CYTOTHERAPY, 2012; EARLY ONLINE, 1-15.
18. PATEL S, DHILLON MS, AGGARWAL S, MARWAHA N, JAIN A. TREATMENT WITH PLATELET-RICH PLASMA IS MORE EFFECTIVE THAN PLACEBO FOR KNEE OSTEOARTHRITIS: A PROSPECTIVE, DOUBLE-BLIND, RANDOMIZED TRIAL. AM J SPORTS MED. 2013 FEB;41(2):356-64.
19. PIETRZAK WS, EPPLEY BL. PLATELET RICH PLASMA: BIOLOGY AND NEW TECHNOLOGY.
20. SMELTER E, HOCHBERG MC. NEW TREATMENTS FOR OSTEOARTHRITIS. CURROPINRHEUMATOL. 2013 FEB 16.
21. SPAKOVÁ T, ROSOCHA J, LACKO M, HARVANOVÁ D, GHARAIBEH A. TREATMENT OF KNEE JOINT OSTEOARTHRITIS WITH AUTOLOGOUS PLATELET-RICH PLASMA IN COMPARISON WITH HYALURONIC ACID. AM J PHYS MED REHABIL. 2012 MAY;91(5):411-7.
22. S. KAZEMNEJAD, A. ALLAMEH, A. GHAREHBAGHIAN, M. SOLEIMANI, N. AMIRIZADEH& M. JAZAYERI. EFFICIENT REPLACING OF FETAL BOVINE SERUM WITH HUMAN PLATELETRELEASATEDURING ROPAGATION AND DIFFERENTIATION OF HUMANBONE MARROW-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS TO FUNCTIONAL HEPATOCYTES-LIKE CELLS. VOXSANGUINIS2008;95, 149–158.

23. VORA A, BORG-STEIN J, NGUYEN RT. REGENERATIVE INJECTION THERAPY FOR OSTEOARTHRITIS: FUNDAMENTAL CONCEPTS AND EVIDENCE-BASED REVIEW. PM R. 2012 MAY;4(5 SUPPL):S104-9.

CAPÍTULO 7

INTERFERENCIA EN LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS POR HEMÓLISIS, LIPEMIA E ICTERICIA

INTERFERENCIA EN LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS POR HEMÓLISIS, LIPEMIA E ICTERICIA

LLuis Gallart

Mª Antonia Fortuño

Maribel García

Coordinadora: Rosario Martínez

INTERFERENCIA EN LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS POR HEMÓLISIS, LIPEMIA E ICTERICIA

"La sustancia interferente es un componente distinto del constituyente que puede provocar un error o interferir en el resultado final".

En este capítulo se define lo que es una interferencia, en concreto la interferencia por hemólisis, lipemia e ictericia en el procesado de derivados hemáticos, así como los factores que pueden causarla.

Existen muchos estudios sobre estas interferencias, pero casi todas dirigidas a la pre-clínica, su influencia en el diagnostico clínico y las alteraciones que provocan ciertos analitos en su interpretación. En este caso, no se debe rechazar las muestras sino documentarlas en la donación, e informar de las posibles incidencias a los investigadores solicitantes.

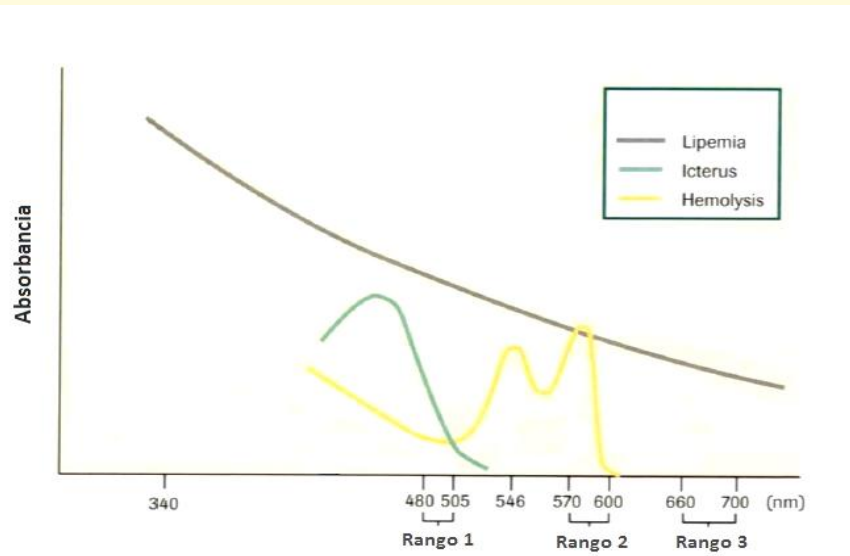
El método ideal para detectar y semicuantificar las tres interferencias mencionadas es realizar un espectro de absorción con distintas longitudes de onda y analizar el patrón del mismo (Figura 1).

Los establecimientos especializados en almacenar muestras biológicas, tienen que intentar estandarizar la información de estas interferencias de una manera sencilla, objetiva y fiable. Hay que tener en cuenta que no todos los biobancos, tienen acceso a laboratorios con bioanalizadores, con profesionales especialistas de los derivados hemáticos (Bioquímicos, Hematólogos, Analistas, etc.), o directamente a la documentación que contenga los resultados de las distintas pruebas analíticas.

La inspección ocular del tubo EDTA, HEPARINIZADO Y SECO en reposo puede utilizarse (si no se dispone de otros medios) para analizar el plasma y el suero, mediante dicha observación se podrá detectar la presencia de muestras con hemólisis, ictéricas y lipemicas, teniendo en cuenta que, la luz artificial o natural del laboratorio, puede variar. Aunque hay consenso entre todos lo autores en que éste no es el método más recomendado para la detección de interferencias, ya que el personal que trabaja en los biobancos debe de estar adiestrado para informar objetivamente de este tipo de muestras, el uso de escalas colorimétricas

y la repetición rutinaria de estos análisis puede resultar suficiente para etiquetar las muestras afectadas antes de su almacenamiento (Figura 4).

Figura 1. Espectro de absorción de muestras con lipemia, ictericia y hemólisis



Adapatado de: De Abajo Olea S. Epidemiología, definición, clasificación, despistaje y diagnóstico de las dislipemia. Semergen 2009; 35 (3): 3-9

El índice hemolítico es un sistema de cuantificación espectrofotométrica de la hemoglobina libre a partir de mediciones a distintas longitudes de onda. Se basa en un cálculo de la medición de absorbancia que ofrece una representación semicuantitativa del nivel de hemólisis presente en la muestra de suero/plasma (Figura 2)

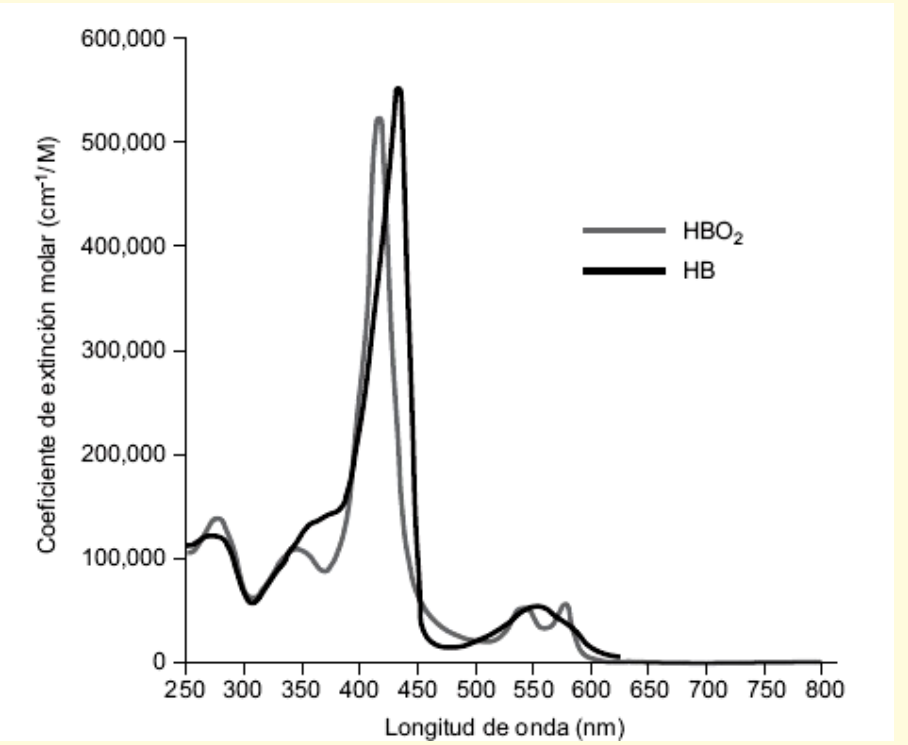
HEMÓLISIS

I. DEFINICIÓN

Se define la hemólisis como el proceso de destrucción de los hematíes, que conlleva a la liberación del contenido intraeritrocitario en el plasma alterando su composición. La aparición en plasma de más de 0.3 g/l de hemoglobina se considera la concentración mínima detectable visualmente.

La hemoglobina es la principal molécula intraeritrocitaria. Tiene un espectro de absorción característico del grupo Hem, con un pico de 405 nm y varios picos entre 500-600 nm, lo que produce un color rojizo en el plasma proporcional a la hemoglobina liberada (Figura 2).

Figura 2. Espectro de absorción de la hemoglobina



HB: deoxihemoglobina; HbO_2: oxihemoglobina

En la práctica, la variabilidad en la coloración del plasma normal debido a la presencia de otros pigmentos (bilirrubina, carotenos, etc.) hacen muy difícil la detección fiable de hemoglobina de forma visual cuando su concentración es inferior a 2 g/l. Tanto es así que hay que distinguir las situaciones en que la hemólisis es un componente de variabilidad biológica no controlable, debido a un proceso patológico en el paciente, de las ocasiones en que trata de un x factor de variabilidad controlable producido a consecuencia de la técnica de obtención o procesamiento de la muestra.

II. ETIOLOGÍA

Los factores que pueden producir hemólisis se agrupan en factores intrínsecos al paciente, generalmente patologías vasculares, sanguíneas o infecciosas, y factores extrínsecos al paciente relacionados por lo general con los procesos de extracción.

1. Factores Intrínsecos

En la mayoría de las enfermedades que cursan con destrucción acelerada de los hematíes, esta se produce en la red microvascular y en las áreas especializadas en la recuperación de los elementos intraeritrocitarios, como el bazo (extravascular).

Solamente en las enfermedades que producen una destrucción masiva, que sobrepasa la capacidad de los sistemas de recuperación, se encuentra hemoglobina libre en el plasma (hemólisis intravascular; Tabla 1).

Tabla 1. Causas de hemólisis intravascular

- Hemoglobinuria paroxística nocturna
- Enfermedades asociadas a fragmentación eritrocitaria:
  - Anormalidades cardiacas/vasculares
    a. Circulación extracorpórea, hemodiálisis, ultrafiltración
    b. Prótesis vasculares
    c. Valvulopatia, coartación de la aorta
  - Microangiopatias:
    a. Síndrome hemolítico urémico
    b. Purpura trombótica trombocitopénica
    c. Coagulación intravascular diseminada
    d. Preeclampsia, Síndrome HELLP (enzimas hepáticas elevadas y plaquetas bajas)
    e. Hipertensión maligna
    f. Hemoglobinuria de la marcha
    g. Microangiopatía de base autoinmune
    h. Hemangiomas, Cáncer diseminado
- Anemia hemolítica inmunológica
  - Reacción transfusional
  - Anemia hemolítica autoinmune
  - Anemia hemolítica asociada a fármacos
  - Hemoglobinuria a frigore
- Infecciones Bacterianas
  - Bacterianas: Sepsis por *Clostridium, Bartonella*
  - Parasitarias: *Plasmodium*
- Agentes químicos
  - Venenos de serpiente, arañas
  - Envenenamiento por arsénico
  - Choque osmótico (inyección o hemodiálisis con agua destilada)
  - Agentes desencadenantes de una crisis hemolítica en pacientes con déficit de G6PDH (glucosa 6 fosfato deshidrogenasa)

Adapatado de Blank; Argüeso R, Díaz L, Díaz JA, Rodríguez A, Castro M, Diz-Lois F. Lípidos, colesterol y lipoproteínas. Galicia Clin 2011; 72 (Supl. 1): S7-S17

2. Factores extrínsecos

Con gran diferencia, la causa más frecuente de aparición de muestras hemolizadas es el deterioro producido durante la obtención de las muestras, pero también durante su transporte y procesamiento (Tabla 2). **ESTE TIPO DE**

INTERFERENCIAS SON LAS ÚNICAS EVITABLES, y debería ser un estándar de calidad medible en la práctica diaria de los profesionales que tienen contacto con este tipo de muestras.

Tabla 2. Causas de hemólisis Extravascular

- Flebotomía:
  - Tipo de catéter
  - Vía con perfusión
  - Calibre de la aguja 24G
  - Exceso de velocidad de succión de la muestra
  - Punción con jeringa y trasvase al tubo de vacio
  - Lugar de punción, aumentada en mano y antebrazo
  - Por no dejar evaporar el antiséptico
  - Tiempo del torniquete
  - Punción traumática a través de hematomas, canalización y desgarro de la vena
  - Tipo de tubos, mayor problema cuando aumenta el volumen (10 ml)
  - Llenado incompleto del tubo de vacio
  - Movimiento del tubo: Excesivos o escasos
  - Experiencia del personal que realiza la venopunción
- Transporte:
  - Tubo neumático, afecta más al suero
  - Transporte por carretera: Agitación y temperatura
- Proceso de la muestra:
  - Tiempo entre la recogida y la centrifugación
  - Temperatura de centrifugación, aumenta cuando se realiza en frío
  - No seguir las recomendaciones de centrifugado
  - Fallos en el gel separador
  - Centrifugación de muestras parcialmente coaguladas (suero)
  - Recentrifugación de muestras

Adaptado de Ruben; Gómez R, Alsina MJ, Álvarez V, Barba N, Cortés M et al. Hemólisis en las muestras para diagnóstico. Rev Lab Clin. 2009; 2(4): 185-195.

III. MECANISMOS DE INTERFERENCIA DE LA HEMÓLISIS

La hemólisis puede interferir en las determinaciones posteriores por 4 vías diferentes:

a) Aditivo: la liberación de sustancias intracelulares por la hemólisis son co-medidas con el analítico presente en el plasma o en el suero (por ejemplo: K, AST)

b) Espectral: debida al espectro de absorción de la hemoglobina, principalmente a 415, 540 y 570 nm

c) Químico: por reacción cruzada de la hemoglobina u otros componentes celulares con el analito de interés, o algunos de los compuestos intermedios de la determinación

d) Dilución: por contaminación de los fluidos intracelulares del suero o el plasma

En la tabla 3 se muestran los principales analitos que pueden ver afectada su concentración por efecto directo de la hemólisis.

Tabla 3. Principales analitos que pueden ver afectadas su concentración por efecto directo de la hemólisis

Determinación	Efecto (punto de corte de hemólisis a partir del cual se observa, expresado como g/l de Hb)			
Na	↓ (0,2)	↔		
K	↑ (0,2)	↑ (0,5)		↑ (0,3)
Cl	↔	↔		
BUN/urea	↑ (2)	↔	↔	↑ (3,7)
Glucosa	↓ (10)	↔	↔	↔
Colesterol		↔	↑ (2)	↑ (5)
Triglicéridos		↔	↑ (2)	↔
Ácido úrico	↔	↑ (1)	↓ (5)	↔
Calcio	↔	↔	↔	↔
Fósforo	↑ (2,5)	↔	↑ (2)	↑ (0,7)
Magnesio	↑ (1,3)	↑ (2)		↑ (1,5)
Proteínas totales		↔	↑ (1)	↑ (3,7)
AST	↑ (0,2)	↑ (0,5)	↑ (0,5)	↑ (0,7)
ALT	↑ (2,5)	↑ (1)	↑ (5)	↑ (3,7)
GGT	↓ (2,5)	↓ (1)	↑ (2)	↔
LDH	↑ (0,2)	↑ (0,5)		↑ (0,3)
FAL	↓ (2,5)	↑ (1)	↓ (0,5)	↓ (3,7)
CK	↑ (0,2)	↑ (1)		↑ (3,7)
Albúmina	↓ (2,5)	↔	↑ (1)	
Hierro	↑ (0,6)	↑ (0,5)	↓ (5)	↑ (0,5)
Creatinina	↑ (1,3)	↔	↓ (0,5)	↔
Bilirrubina	↔	↑ (0,5)		
Amilasa		↑ (1)		↔

Entre paréntesis está el punto de corte (en g/l de Hg) que define el error significativo producido por la hemólisis. ↓: infraestimación; ↑: sobreestimación; ↔: sin efecto; ALT: alanina-aminotransferasa; AST: aspartato-aminotransfersa; BUN: nitrógeno ureico CPK: creatinfosfocinasa; FAL: fosfatasa alcalina; GGT: gammaglutamil transpeptidasa; Hb: hemoglobina; HiCN: cianometahemoglobina; LDH: lactatodeshidrogenasa.

LIPEMIA

I. DEFINICIÓN

Este término se usa para describir muestras de suero o plasma con una apariencia turbia y/o lechosa, producida por un exceso de lípidos (hiperlipemia), principalmente colesterol y/o triglicéridos en la sangre, que en algunos casos se hace evidente. En otras ocasiones, el suero o el plasma es de apariencia normal y la única evidencia de la hiperlipemia son los valores altos en las concentraciones de colesterol y/o triglicéridos.

El aumento de colesterol y/o triglicéridos se debe a anormalidades en los niveles de las lipoproteínas, que son las responsables del transporte del colesterol y los triglicéridos (Figura 3).

Figura 3. Estructura de triglicéridos (A) y colesterol (B)

Las lipoproteínas son macromoléculas que estructuralmente están formadas por una parte lipídica y una proteica (Figura 3). En la tabla 4 se muestra la clasificación de estas moléculas.

Tabla 4. Clasificación según la densidad, proporciones y formación de las lipoproteínas

Lipoproteínas	Densidad	Proporciones	Formación
Quilomicrones	0.90-0.96 g/mL	• 85-95% de triglicéridos exógenos • 5% de colesterol • 7% fosfolípidos • 1-2% Apo B 48	Intestino
VLDL (muy baja densidad)	0.96-1.006 g/mL	• 60% triglicéridos • 12% colesterol • 20% fosfolípidos • 8-10% Apo B 100	Hígado
IDL (densidad intermedia)	1.006-1.019 g/mL	• 29% colesterol • 60-70% Apo B 100 y Apo E	Endotelio capilar
LDL (baja densidad)	1.019-1.063 g/mL	• 50% colesterol • 22% fosfolípidos • 22% Apo B 100 • 6% Triglicéridos	Membrana plasmática
HDL (alta densidad)	1.063-1.125 g/mL	• 50% Apo A-1 y Apo A-2 • 22% Colesterol • 33% fosfolípidos • 5% triglicéridos	Hígado

En la Tabla 5 se muestran los valores de referencia de lipemia.

Tabla 5. Valores de referencia Lipemia

Parámetro	Valor deseable	Valor limite	Valor elevado
Colesterol total	≤ 200 mg/dl	239 mg/dl	≥ 240 mg/dl
Triglicéridos	≤ 200 mg/dl		
LDL	≤ 130 mg/dl	159 mg/dl	≥ 160 mg/dl
HDL	≥ 40 mg/dl		

II. ETIOLOGÍA

Las lipemias se pueden clasificar de forma simple, en hipercolesterinemia, hipertriglicerinemia y dislipemias mixtas, pero desde un punto de vista etiológico se clasifican en primarias (extracción de la muestra post-ingesta o sin causa evidente o genética) (Tabla 6) o secundarias (metabólicas y farmacológicas), (Tabla 7).

Tabla 6. Clasificación de las lipemias primarias

- Alteraciones monogénicas
  - Hipercolesterinemia familiar monogénica
  - Hiperquilomicronemia familiar
  - Disbetalipoproteinemia
  - Hiperlipidemia familiar combinada
- Alteraciones poligénicas
  - Hipertrigliceridemia familiar
  - Hiperlipidemia mixta

Sánchez M, Rodríguez AL, Martínez LL. Desórdenes lipídicos: una puesta al día. Rev Cubana Endocrinol 2003; 14(1).

Tabla 7. Clasificación de las lipemias Secundarias

- Alteraciones metabólicas
  - Diabetes mellitus
  - Hipotiroidismo
  - Síndrome nefrótico
  - Enfermedades obstructivas del hígado
  - Mieloma múltiple
  - Lupus eritematoso sistémico
  - Alcoholismo
  - Hipotiroidismo
  - Obesidad
  - Pancreatitis aguda
  - Tabaquismo
  - Uremia
  - Hipercolesterinemia aislada
  - Hipertrigliceridemia aislada
  - Dislipedemia mixta
  - Colesterol HDL bajo aislado

- Alteraciones Farmacológicas
  - Esteroides anabólicos
  - Progestágenos
  - Beta bloqueadores sin actividad simpaticominética intrínseca
  - Resinas de intercambio iónico
  - Glucocorticoides
  - Tiacidas
  - Ticlopidina

Adaptado de: De Abajo Olea S. Epidemiología, definición, clasificación, despistaje y diagnóstico de las dislipemia. Semergen 2009; 35 (3): 3-9

III. MECANISMO DE INTERFERENCIA

Espectral: por la presencia de un exceso de lípidos interfiere principalmente en las determinaciones fotométricas.

ICTERICIA

I. DEFINICIÓN

Es un concepto clínico que se aplica a la coloración amarillo-verdoso de piel y mucosa debido a la alta tasa de bilirrubina circulante. Aplicado a las muestras de suero y plasma se refiere a la interferencia de color que se produce en estos hemoderivados por un exceso de bilirrubina en sangre.

La bilirrubina procede de la destrucción de los hematíes maduros, de la eritropoyesis ineficaz y el catabolismo de las proteínas tisulares. Se forma en las células retículo-endoteliales, principalmente en el hígado y bazo, es insoluble en agua por lo que precisa unirse a la albumina para ser transportada por la sangre.

Existen dos tipos de bilirrubina la conjugada o directa que se encuentra conjugada a proteínas hepáticas, y la no conjugada o indirecta que viaja por el torrente sanguíneo en su mayoría asociada a la albúmina. Los valores normales de bilirrubina en sangre se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Referencia de la bilirrubina

Bilirrubina	mg/dl	µmol/L
Directa	0-0.3	0-5.1
Indirecta	0.1-1.0	1.7-17.1
Total	0.1-1.2	1.7-20.5

La elevación de bilirrubina en suero o plasma se pone de manifiesto por un color amarillo intenso de estos derivados. Normalmente existe una cifra media de 0.5 mg de bilirrubina por 100 ml de sangre (una unidad de Van Den Bergh).

Habitualmente las concentraciones de bilirrubina por encima de 35 µmol/L son clínicamente definidas como hiperbilirrubinemia, mientras que las muestras ictéricas tienen concentraciones de bilirrubina superiores a 100 µmol/L.

II. ETIOLOGÍA

El aumento de la bilirrubina se puede producir por aumento de su formación, disminución de su depuración hepática u obstrucción de la vía biliar. Según donde se situé la alteración puede aumentar la fracción directa, indirecta o ambas. En la tabla 9 se localizan las causas del aumento de bilirrubina.

Tabla 9. Causas de aumento de la bilirrubina

- Hiperbilirrubinemia indirecta o no conjugada con función hepática normal:
  - Por aumento de la Bilirrubina
    - Hemólisis
    - Eritropoyesis ineficaz
    - Transfusiones
    - Reabsorción de grandes infartos
    - Hematomas titulares
  - Por déficit en el transporte plasmático y la captación hepática
    - Rifampicina
    - Contrastes radiológicos
    - Probenecid
  - Por alteraciones en la conjugación de la bilirrubina
    - Ictericia fisiológica del recién nacido
    - Enfermedad de Cliger-Najar
    - Enfermedad de Gilbert
- Hiperbilirrubinemia directa o conjugada con función hepática normal:
  - Enfermedad de Dubin-Johson
  - Enfermedad de Rotor
  - Síndrome nefrótico
  - Enfermedades obstructivas del hígado
  - Mieloma múltiple
  - Lupus eritematoso sistémico
  - Alcoholismo
  - Hipotiroidismo
  - Obesidad
  - Pancreatitis aguda
  - Tabaquismo
  - Uremia
  - Hipercolesterinemia aislada
  - Hipertrigliceridemia aislada
  - Dislipedemia mixta
  - Colesterol HDL bajo aislado
- Alteraciones Farmacológicas
  - Esteroides anabólicos
  - Progestágenos
  - Beta bloqueadores sin actividad simpaticominética intrínseca
  - Resinas de intercambio iónico
  - Glucocorticoides
  - Tiacidas
  - Ticlopidina

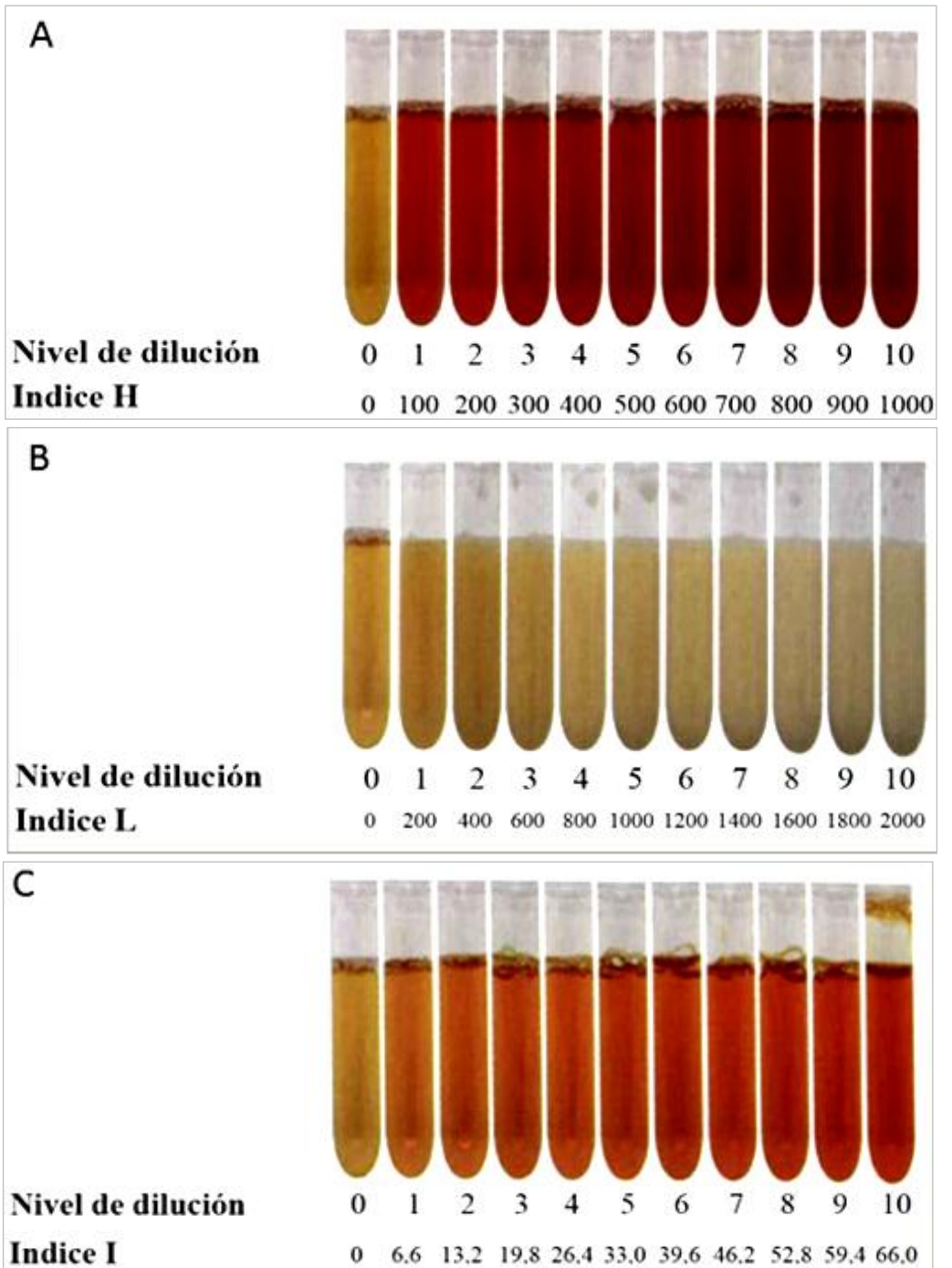
III. MECANISMO DE INTERFERENCIA

a) Espectral: por la absorbancia de la bilirrubina a 456 nm

b) Química: por interacción de la bilirrubina en la reacción para la determinación , por ejemplo en las determinaciones mediadas por la peroxidasa.

En resumen, una muestra hemolítica, lipémica o ictérica será válida o no para su cesión en función de las determinaciones que se desean realizar en ella. En la bibliografía se han descrito diferentes métodos para solventar estas interferencias en el supuesto de que fuese imprescindible realizarlas en este tipo de muestras.

Figura 4. A: Escala visual de muestras hemolíticas. (Aumento del nivel de interferencia en intervalos de 100, comenzando desde 0). B: Escala visual de muestras Lipémicas. (Incremento del nivel de interferencia en intervalos de 200 comenzando desde 0). C: Escala visual de muestras Ictéricas. (Incremento del nivel de interferencia en intervalos de 6.6 comenzando desde 0)



Adaptado de "*Serum Indices: reduction of clinical in laboratory medicine. Going straight to answer*", Roche.

Bibliografía

1. ARGÜESO R, DÍAZ L, DÍAZ JA, RODRÍGUEZ A, CASTRO M, DIZ-LOIS F. LÍPIDOS, COLESTEROL Y LIPOPROTEÍNAS. GALICIA CLIN 2011; 72 (SUPL. 1): S7-S17.
2. DE ABAJO OLEA S. EPIDEMIOLOGÍA, DEFINICIÓN, CLASIFICACIÓN, DESPISTAJE Y DIAGNÓSTICO DE LAS DISLIPEMIA. SEMERGEN 2009; 35 (3): 3-9.
3. GARCÍA GD, PICO MA, QUINTANA L, CABRERA A, LORENZO M, AGUILAR JA. UTILIDAD DE LOS ÍNDICES SÉRICOS PARA LA VALORACIÓN DE LAS INTERFERENCIAS CAUSADAS POR LA HEMÓLISIS Y LA BILIRRUBINA EN LA MEDICIÓN DE DISTINTOS CONSTITUYENTES BIOQUÍMICOS. QUÍMICA CLÍNICA 2007; 26 (4) 196-201.
4. GOCE DIMESKI**.** INTERFERENCE TESTING. CLIN BIOCHEM REV VOL 29 SUPPL (I) AUGUST.
5. GÓMEZ R, ALSINA MJ, ÁLVAREZ V, BARBA N, CORTÉS M ET AL. HEMÓLISIS EN LAS MUESTRAS PARA DIAGNÓSTICO. REV LAB CLIN. 2009; 2(4): 185-195.
6. IBORRA J, CALLEJA JL. PROTOCOLO DIAGNÓSTICO DE LA HIPERBILIRRUBINEMIA. MEDICINE 2000;08 (13):717-21.
7. LEYVA A, SARIOL AR, ROSQUETE G, LARQUIN JI. INTERVENCIÓN EDUCATIVA PARA DISMINUIR LAS AFECTACIONES PRODUCIDAS POR LA LIPEMIA EN EL ENVÍO DE PLASMA PARA FRACCIONAMIENTO. REVISTA ARCHIVO MÉDICO DE CAMAGÜEY. 2010; 14 (4).
8. SÁNCHEZ M, RODRÍGUEZ AL, MARTÍNEZ LL. DESÓRDENES LIPÍDICOS: UNA PUESTA AL DÍA. REV CUBANA ENDOCRINOL 2003; 14(1).
9. SERUM REDUCTION OF CLINICAL ERRORS IN LABORATORY MEDICINE. GOING STRAIGHT TO THE ANSWER. ROCHE

ABREVIATURAS

- ACD: Anticoagulante formado por Ácido Citrato Dextrosa
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- APO: Apolipoproteina
- ARN: Ácido ribonucleico
- ATP: Adenosín Trifosfato
- 2,3-DPG: 2,3-difosfoglicerato
- cDNA: Ácido Desoxiribonucleico complementario
- CIBERER: Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras
- CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica
- CO_2 : Dióxido de Carbono
- CPD: Anticoagulante formado por Citrato Fosfato Dextrosa
- CPDA: Anticoagulante formado por Citrato-Fosfato-Dextrosa-Adenina
- CSISP: Centro Superior de Investigación en Salud Pública
- CV: Coeficiente de Variación
- CVR: Coeficiente de Variación Relativo
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- DS: Desviación Estándard
- EA: Error Aleatorio
- EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético
- EGF: Epidermal growth factor
- ELISA: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

- ES: Error Estándar o Sistemático
- ET: Error Total Máximo
- FGF: Fibroblast growth factor
- G6PDH: Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa
- HDL: Lipoproteínas de alta densidad
- h: hora
- HELLP: (H) hemólisis, (EL) enzimas hepáticas elevadas y (LP) recuento bajo de plaquetas
- I+D+i: Investigación, desarrollo e innovación
- IDIBAPS: Biobanco del Hospital Clínico de Barcelona
- IDL: Lipoproteína de densidad intermedia
- IDS: Índice de desviación estándar
- IGF: Insulin-like growth factor-1
- INCLIVA: Biobanco del Hospital Clínico de Valencia
- ISBER: International Society for Biological and Environmental Repositories
- ISCIII: Instituto de Salud Carlos III.
- ISO: International Organization for Standarization
- LDL: Lipoproteínas de baja densidad
- LIB: Ley de Investigación Biomédica
- min: minuto
- MPLA: Multiplex Probe Ligation Amplification.
- NP: No Presenta
- PBMC: Peripheral Blood Mononucleated Cell
- PCR: Polymerase Chain Reaction

- PDGF: Growth factor derived from platelets
- PNT: Protocolo Normalizado de Trabajo
- PPP: Plasma Pobre en Plaquetas
- ProGRP: Péptido Liberador De Progastrina
- PRFC: Plasma Rico en Factores de Crecimiento
- PRP: Plasma Rico en Plaquetas
- qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa
- RNBB: Red Nacional de BioBancos o Plataforma "Red de Biobancos".
- RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
- SELDI-TOF: Surface Enhanced Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry
- SP: Sangre Periférica
- SPREC: Standar PREanalytical Code
- SST: Tubo tipo Vacutainer ®
- TGF-beta: Transformed beta growth factor
- VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
- VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana
- VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

ANEXO I

OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

Protocolo Normalizado de Trabajo

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

RED NACIONAL DE BIOBANCOS

24 de Abril de 2012

Grupo de Trabajo en Derivados Hemáticos

REVISIÓN	REALIZADO	FECHA	APROBADO	FECHA	ENTRADA EN VIGOR
00	GRUPO DE DERIVADOS HEMÁTICOS	24/04/2012	Dirección	24/04/2012	24/04/2012
Modificaciones:					

Instituto de Salud Carlos III

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

Protocolo Normalizado de Trabajo

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS
2. DEFINICIONES
3. OBJETO
4. ALCANCE
5. MATERIALES Y SERVICIOS
6. DESARROLLO
7. DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA
8. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

1. ABREVIATURAS

El presente documento no contiene abreviaturas.

2. DEFINICIONES

SANGRE PERIFÉRICA: Fluido orgánico fácilmente accesible mediante venopunción.

AYUNO POSTPRANDIAL: no ingesta de alimentos tras un estado postprandial, en el cual la disponibilidad de nutrientes es superior a la demanda, y en el que se da una síntesis neta de la sustancias de reserva.

Instituto de Salud Carlos III

3. OBJETO

El objeto de este procedimiento es definir la actuación y establecer las directrices básicas de calidad, ya sea tanto en la obtención de muestras de sangre periférica que serán enviadas a los biobancos para su procesado, y describir las principales causas de variabilidad biológica asociadas a la extracción.

4. ALCANCE

Este procedimiento es aplicable a todas las muestras de sangre periférica que sean extraídas con la finalidad de ser procesadas y almacenadas en un biobanco.

5. MATERIALES

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

-Algodón.

-Batea.

-Antiséptico.

-Jeringa (según cantidad de muestra), mariposa o sistema Vacutainer.

-Aguja I.V.

-Ligadura.

-Esparadrapo.

-Guantes.

-Tubos de recogida de muestras.

-Etiquetas identificativas.

-Contenedor de objetos punzantes.

6. DESARROLLO

6.1-Consideraciones previas:

6.1.1- Obtención del consentimiento informado: previa a la obtención de una muestra de sangre periférica destinada exclusivamente a Biobanco, se deberá comprobar que el paciente expresó su consentimiento de forma válida según la legislación vigente. De no ser así, se desistirá de la toma de muestra.

6.1.2-Posición del donante: el cambio de la posición del donante de boca arriba (supina) a una sentada o de pie provoca un traspaso del agua corporal desde el interior de los vasos sanguíneos hacia los espacios intersticiales, lo que nos provocará un aumento significativo en los valores de pruebas para lípidos, enzimas y proteínas, ya que éstos no podrán filtrarse.

6.1.3-Dieta: Se recomienda la extracción tras ayuno postpandrial de al menos 8 horas. Con esto se pondrán realizar determinaciones sobre el metabolismo basal sin las variaciones que provocan el aumento transitorio de glucosa y lípidos en sangre tras la ingesta.

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

6.1.4-Método de extracción: por motivos de seguridad e higiene se recomienda usar sistemas de extracción con mariposa y tubos al vacío. No obstante el sistema de vacío debe evitarse en menores y ancianos dado que sus venas podrían no resistir la presión negativa de este tipo de tubos.

6.1.5-Zona de extracción: de forma rutinaria el lugar de punción serán las venas superficiales de la cara anterior del antebrazo**.**

En el caso de donantes hospitalizados es recomendable evitar utilizar las vías para la obtención de muestras, realizándose una nueva punción, cuando sea posible, en el otro brazo. Si no se pudiese realizar una segunda punción descartar los primeros 10 mL de sangre obtenidos de la vía**.**

6.1.6-Momento de la extracción: dado que diversos compuestos (ej:hormonas) pueden ver alterada su concentración debido a los ritmos circadianos, se recomienda que, en la medida de lo posible, todas las extracciones se realicen en la misma franja horaria o, como mínimo, se registre la hora de extracción**.**

6.2-Procedimiento:

6.2.1- Identificación del paciente: el personal encargado de realizar la extracción de sangre deberá comprobar la identidad del donante antes de llevar a cabo la venopunción.

6.2.2- Verificar la disponibilidad de todo el material requerido para la extracción así como la correcta selección de los tubos necesarios.

6.2.3-Explicar el procedimiento al donante y preguntarle si está en ayunas, o cualquier otro dato necesario previo a la extracción.

6.2.4-Seleccionar la zona de inserción de la aguja por palpación con el dedo índice, palpando con suavidad y firmeza. Las venas tienen una mayor consistencia esponjosa y rebotará bajo la presión del dedo. Las arterias se encuentran a mayor profundidad y palpitan. Los tendones están duros y son resistentes a la presión.

6.2.5-Aplicar el torniquete entre 7'5 y 10 cm por encima del punto de punción. Ver indicaciones para torniquete.

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

6.2.6-Colocar el brazo hiperextendido de manera que la mano este más baja que el codo.

6.2.7-Confirmar el punto de punción.

6.2.8-Desinfectar el área con isopropanol u otro antiséptico aplicándolo con una torunda de forma circular desde el interior hacia el exterior. Dejar secar al aire.

6.2.9-Realizar la venopunción fijando la vena con el dedo pulgar de 2,5 a 5 cm por debajo del sitio e insertar la aguja, con el bisel hacia arriba, con un ángulo de 15º entre la aguja y la piel.

6.2.10-Recolectar los tubos e invertir de inmediato cada tubo después de la recolección. El orden de recogida aconsejado es: tubos estériles para hemocultivo, tubos sin aditivos y finalmente los tubos con aditivos.

6.2.11-Liberar el torniquete y asegurar que el paciente tiene la mano abierta.

6.2.12-Una vez rellenado todos los tubos colocar una gasa sobre la punción, sin presionar.

6.2.13-Retirar la aguja con un movimiento rápido y suave hacia atrás y presionar la gasa sobre el punto de punción durante al menos un minuto, manteniendo el brazo recto.

6.2.14-Desechar el material de extracción en un contenedor apropiado.

6.2.15-Colocar una tirita estéril sobre la punción y despedir al donante.

6.2.16-Identificar correctamente los tubos y derivarlos en la mayor brevedad posible al Biobanco.

6.3-Indicaciones para torniquete:

6.3.1-Realización del torniquete: colocar la ligadura alrededor del brazo con los dos extremos hacia nosotros; cruzar el extremo izquierdo sobre el derecho y tirar del extremo izquierdo hacia el hombro, mantener la tensión mientras que se hace el lazo en la sección del torniquete que rodea el brazo; de esta forma se podrá liberar con una sola mano.

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

6.3.2-Tensión del torniquete: debe asegurarse que la tensión sea la suficiente para que las venas se pongan prominentes, pero que no comprometan la circulación**.** Si está muy apretado la piel se pondrá blanca alrededor, y si está muy flojo se escurrirá, se deberá entonces soltarlo y asegúralo otra vez.

6.3.3-Tiempo del torniquete: la ligadura no debe ponerse más de un minuto, y si en ese tiempo no se localiza la vena, se deberá soltar y ponerlo de nuevo pasados 3 minutos.

En el caso de trastorno de la piel o excesivo vello la ligadura se puede poner encima de la manga.

6.4-Recomendaciones generales:

-No sondear. Es doloroso para el paciente y puede provocar un hematoma. Si no se pudiese extraer la sangre, se retiraría el torniquete y la aguja. Aunque no se hubiese podido extraer sangre debe de controlarse el sitio de punción y presionar la zona.

-Nunca punzar dos veces en el mismo sitio. Volver a poner el torniquete puede provocar una hemorragia y producir un hematoma.

-Nunca punzar en una zona azulada.

-Nunca volver a punzar a un paciente si no es capaz de localizar de nuevo la vena.

-Nunca punzar a un enfermo más de dos veces. Explicar al paciente que no se ha podido extraer una muestra de sangre completa y que lo tiene que volver a hacer. Usar un equipo limpio que incluya jeringuilla, tubos, antisépticos y algodón. Si el segundo intento no tuviera éxito, que otro flebotomista obtenga la muestra de sangre.

-No verter sangre de un tubo a otro, se podría contaminar la muestra.

6.5-Problemas generales en una extracción:

6.5.1-Cuando la recogida de sangre es insuficiente o no se puede obtener sangre. Las posibles soluciones son:

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

-Mover la jeringuilla ligeramente hacia delante (puede no estar en la luz), o hacia atrás (puede haber atravesado la vena).

-Ajustar el ángulo del aparato (el bisel debe mirar a la pared superior de la vena).

-Aflojar el torniquete (puede estar demasiado apretado, obstruyendo el flujo de la sangre).

-Intentarlo con otro tubo (puede que no haya vacío en ese).

-Volver a sujetar la vena (a veces las venas se apartan de la punta de la jeringuilla y del sitio de punción).

6.5.2-Si la sangre dejase de fluir:

-La vena podría haberse colapsado; asegurar el torniquete para aumentar la repleción venosa. Si esta maniobra no tiene éxito, retirar la jeringuilla, fijarse en el sitio de la punción, y volver a introducir la jeringuilla.

-El ensamblaje de la aguja/adaptador/tubo podría no estar bien hecho y cada vez que se cambie de tubo la jeringuilla se saldría de la vena. Agarrar firmemente el equipo y colocar los dedos en el brazo del paciente, usar el reborde para hacer palanca al sacar y meter los tubos.

6.5.3-Otros problemas:

-Se podría formar una protuberancia azulada debajo de la piel en el sitio de la punción; probablemente se tratase de un hematoma, aflojar el torniquete inmediatamente y retirar la jeringuilla. Presionar la zona durante un tiempo prudencial manteniendo estirado el brazo del paciente. En el futuro evitar usar cualquier zona azulada.

-Si la sangre es roja y brillante en lugar de roja oscura (sangre venosa) esto indicaría una punción arterial. Una vez terminada la flebotomía, presionar la zona durante más de cinco minutos, mantener recto el brazo del paciente.

6.5.4-Zonas a evitar para hacer la punción venosa:

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

-Excesivas cicatrices de quemaduras o de suturas quirúrgicas.

-En el mismo lado de una mastectomía (los resultados de la prueba pueden alterarse por el éxtasis linfático).

-En hematomas azulados, además de ser doloroso, puede producir resultados erróneos.

-En terapia intravenosa/transfusiones sanguíneas el líquido puede diluir la muestra. La sangre se debe extraer en el otro brazo. Si esto es imposible, colocar el torniquete por debajo de la cánula intravenosa y extraiga la sangre.

-En general la sangre nunca debe extraerse de un brazo con una fístula o cánula.

-Extremidades edematosas (los tejidos con acumulación de líquidos alteran los resultados).

7. DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA

- *Hematología: Fundamentos y aplicaciones clínicas. Bernadette F. Rodak. Ed.Panamericana. 2ª Edición.*

- *Ple-15. Toma de muestras de sangre mediante punción venosa. Hospital Regional Universitario Carlos Haya.*

8. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA

- *Guía de tubos. BD Vacutainer*

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

OBTENCIÓN, PROCESADO Y ALMACENAJE DE MUESTRAS DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (CMSP)

Protocolo Normalizado de Trabajo

Red Biöbancos
Instituto de Salud Carlos III

RED NACIONAL DE BIOBANCOS

13 de Junio de 2011

Grupo de Trabajo en Derivados Hemáticos

REVISIÓN	REALIZADO	FECHA	APROBADO	FECHA	ENTRADA EN VIGOR
00	GRUPO DE DERIVADOS HEMÁTICOS	16/06/2011	Dirección	16/06/2011	19/07/2011
Modificaciones:					

Instituto de Salud Carlos III

RsTBioH

Red Biöbancos
Instituto de Salud Carlos III

OBTENCIÓN, PROCESADO Y ALMACENAJE DE MUESTRAS DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (CMSP)

Protocolo Normalizado de Trabajo

ÍNDICE

1. **ABREVIATURAS**
2. **DEFINICIONES**
3. **OBJETO**
4. **ALCANCE**
5. **MATERIALES Y SERVICIOS**
6. **DESARROLLO**
7. **DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA**
8. **DOCUMENTACIÓN RELACIONADA**

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

1. ABREVIATURAS

- **DMSO**: Dimetilsulfóxido (CH_3SOCH_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

RdTBioH
Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III
Instituto de Salud Carlos III

- **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

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

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*	*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 substancias 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)*

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

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 -80ºC 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:

Red Biobancos Instituto de Salud Carlos III
Instituto de Salud Carlos III

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) Criopreservación de hematíes: Citrato ACD, CPD-A o CPD

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

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

6.2.1. 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)

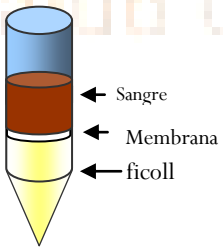
6.3.2. Centrifugar el tubo Leucosep que contiene el ficoll a 1000xg durante 1 min. Retirar el Ficoll sobrante por decantación o con pipeta.

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".

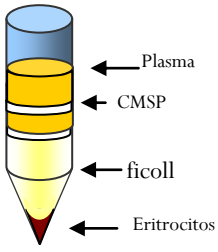
6.3.5. Aspirar 2 ml de la capa de células mononucleares y depositarla en un tubo falcon de 15 ml que contenga 4 ml de PBS. Invertir el tubo para mezclar bien la solución.

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 ºC sin frenos

.



- A partir de aquí continuar en el punto 6.5

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

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.

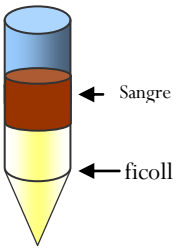
6.4.1. Añadir un volumen de Ficoll por cada dos volúmenes de sangre (Ficoll: Sangre 1:2)

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

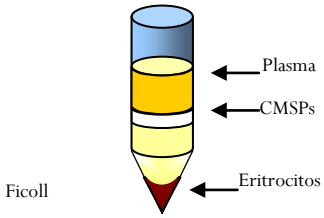
6.4.3. Aspirar el plasma sin coger células mononucleadas que forman una capa blanca por encima de los eritrocitos y granulocitos y descartarlo o alicuotarlo según el PNT "Obtención de plasma". Opción: añadir PBS en cantidad igual al volumen de plasma retirado. Homogeneizar la sangre con el PBS y pasar al paso 6.4.5.

6.4.4. 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.

6.4.5. 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.



6.4.6. 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

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

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 ºC.

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 contaje.

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

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)

  - Realizar la dilución oportuna para conseguir una concentración deseada:
    - Para congelación 7 – 15 x 10^6cel. /ml.

6.5.7. Congelar o poner en cultivo.

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

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

Red Biobancos Instituto de Salud Carlos III
Instituto de Salud Carlos III

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 Biöbancos
Instituto de Salud Carlos III

OBTENCIÓN, PROCESADO Y ALMACENAJE DE MUESTRAS DE ERITROCITOS

Protocolo Normalizado de Trabajo

Red Biobancos

RED NACIONAL DE BIOBANCOS

26 de Mayo de 2011

Grupo de Trabajo en Derivados Hemáticos

REVISIÓN	REALIZADO	FECHA	APROBADO	FECHA	ENTRADA EN VIGOR
00	GRUPO DE DERIVADOS HEMÁTICOS	26/05/2011	Dirección	26/05/2011	19/07/2011
Modificaciones:					

Instituto de Salud Carlos III

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

OBTENCIÓN, PROCESADO Y ALMACENAJE DE MUESTRAS DE ERITROCITOS

Protocolo Normalizado de Trabajo

ÍNDICE

1. **ABREVIATURAS**
2. **DEFINICIONES**
3. **OBJETO**
4. **ALCANCE**
5. **MATERIALES Y SERVICIOS**
6. **DESARROLLO**
7. **DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA**
8. **DOCUMENTACIÓN RELACIONADA**

Red Biobancos

1. ABREVIATURAS

- **BHT:** Hidroxitoluenobutilado
- **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 g respectivamente en 120 ml de agua destilada. Se emplea en 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.

RsTBioH
Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III
Instituto de Salud Carlos III

2. DEFINICIONES:

- **Solución de congelación:** Composición: 28% (v/v) o 35% (w/v) glicerol, 3% Manitol, 0,65% ClNa, H_2O_{bd}.
- **Eritrocito:** son los elementos más numerosos de la sangre, su objetivo es transportar el oxígeno hacia los diferentes tejidos del cuerpo. La cantidad considerada normal fluctúa entre 4.500.000 (en la mujer) y 5.000.000 (en el hombre) por milímetro cúbico (o microlitro).

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 eritrocitos que serán depositadas en los biobancos pertenecientes a cualquier centro u hospital adscrito a la Red Nacional de BioBancos.

4. ALCANCE

Red Biobancos

Este procedimiento es aplicable a todas las muestras de eritrocitos 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 Y SERVICIOS

- *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 substancias 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.*
- *Jeringuillas o material para la extracción de sangre*
- *Guantes*
- *Tubo de PP de 15mL*
- *Pipetas de transferencia de 3,5 mL estériles*
- *Criotubos de 2 mL*
- *PBS 1X*
- *BHT 1 mM (butylatedhydroxytoluene)*
- *Solución de congelación*
- *Micropipetaautomática (volumen 0,5-10 µL)*
- *Puntas estériles para micropipeta*
- *Centrífuga*
- *Balanza analítica*

Red Biöbancos

6. DESARROLLO

6.1. COORDINACIÓN PARA LA CORRECTA OBTENCIÓN Y RECEPCIÓN DE MUESTRAS SANGUINEAS EN EL BIOBANCO

6.1.1. La sangre debe extraerse con posterioridad a que el paciente haya firmado el consentimiento informado de donación de muestras al biobanco.

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. 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) EDTA con K2 o K3 si de la muestra se van a extraer otros tipos de derivados, como plasma o suero.
b) Heparina si la muestra también se destina a estudios de proliferación celular.
c) ACD si sólo se van a extraer eritrocitos.

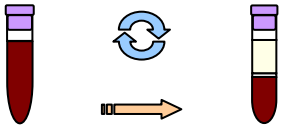
6.1.3. En el momento de la extracción se aconseja recoger la máxima información posible relativa a la muestra:

- Fecha y hora de extracción.
- Tipo de anticoagulante.
- Incidencias ajenas al protocolo.

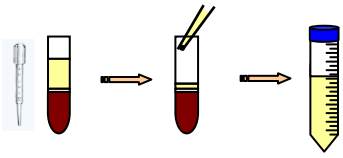
Red Biobancos

6.2. SEPARACIÓN DE ERITROCITOS A PARTIR DE SANGRE TOTAL

6.2.1. Centrifugar el tubo a 2.500g durante 15 minutos a temperatura ambiente.



6.2.2. Aspirar el plasma con una pipeta de transferencia, evitando aspirar leucocitos (forman una fina capa blanca por encima de los eritrocitos), y transferirlo a un tubo de 15 mL. Si se requiere almacenar el plasma, procesarlo de inmediato aplicando el PNT correspondiente.

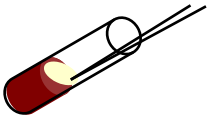


6.2.3. Rellenar el tubo con PBS 1X a temperatura ambiente y agitar por inversión. Centrifugar a 2500 g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Descartar el

sobrenadante, evitando aspirar leucocitos (forman una fina capa blanca por encima de los eritrocitos).

6.2.4. Repetir el lavado con PBS 1X

6.2.5. Aspirar la capa blanca de leucocitos y parte de los eritrocitos con una pipeta de transferencia y transferirlo a un tubo de 15 mL. El volumen aspirado ha de ser de 1,5 mL y se corresponde con un pellet rojo. Si se requiere, procesar los leucocitos.

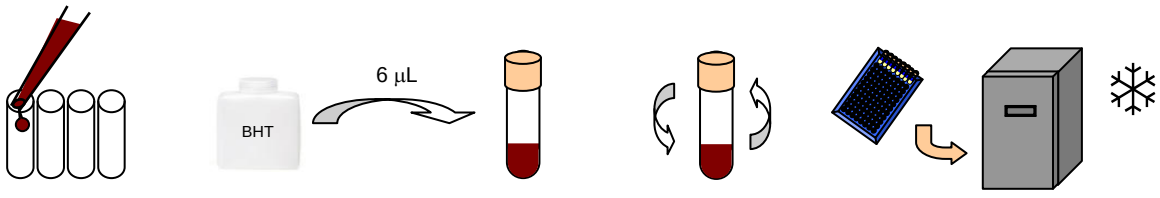


6.3. PROCESADO DE ERITROCITOS PARA ESTUDIOS DE DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS DE MEMBRANA

Red Biobancos

6.3.1. Hacer alícuotas de 600 µL de eritrocitos en criotubos de 2 mL convenientemente etiquetados y añadir 6□ µL de BHT 1 mM a cada alícuota. Agitar suavemente por inversión.

6.3.2. Congelar a -80ºC



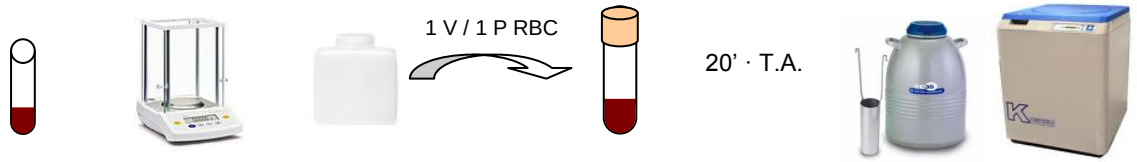
6.4. PROCESADO DE LA MUESTRA PARA MANTENER LA INTEGRIDAD DE LOS ERITROCITOS

6.4.1. Pesar el paquete de eritrocitos remanente y añadir el mismo volumen de Solución de Congelación que el peso del paquete.

RsTBioH
Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III
Instituto de Salud Carlos III

6.4.2. Dejar estabilizar 20 minutos a temperatura ambiente (22ºC).

6.4.3. Congelar por inmersión en N_2 líquido y mantener congelado en N_2 líquido o en su fase vapor.



6.5. 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

Red Biobancos

7. DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA

- *Norma UNE-EN-ISO 9001:2008*. Sistemas *de gestión para la calidad. Requisitos.*

8. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA

- *Protective Effect of Quaternary Piperidinium Salts on Lipid Oxidation in the Erythrocyte Membrane. HalinaKleszczyn´skaa, et al. Z. Naturforsch. 54c, 424Ð428 (1999).*

- *Cryopreservation of Erythrocytes, Thrombocytes and Lymphocytes. Andreas Sputtek, et al. Transfus Med Hemother 34:262-267 (2007)*

OBTENCIÓN, PROCESADO Y ALMACENAJE DE MUESTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO EXTRAÍDO MEDIANTE PUNCIÓN LUMBAR

Red Biobancos

Protocolo Normalizado de Trabajo

RED NACIONAL DE BIOBANCOS

9 de febrero de 2012

Grupo de Trabajo en Derivados Hemáticos

REVISIÓN	REALIZADO	FECHA	APROBADO	FECHA	ENTRADA EN VIGOR
01	GRUPO DE DERIVADOS HEMÁTICOS	20/02/2012	Dirección		
Modificaciones:					

Instituto de Salud Carlos III

ReTBioH

Red Biöbancos
Instituto de Salud Carlos III

OBTENCIÓN, PROCESADO Y ALMACENAJE DE MUESTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO EXTRAÍDO MEDIANTE PUNCIÓN LUMBAR

Protocolo Normalizado de Trabajo

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS
2. DEFINICIONES
3. OBJETO
4. ALCANCE
5. MATERIALES Y SERVICIOS
6. DESARROLLO
7. DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA
8. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA

Red Biobancos

1. ABREVIATURAS

LCR: Líquido cefalorraquídeo

PL: Punción lumbar

IATA: International Air Transport Association

OACI/ICAO: International Civil Aviation Organization

SAE: Sistema de administración de energía

g: aceleración gravedad (unidad de medida de la FCR:Fuerza Centrífuga Relativa)

2. DEFINICIONES

PUNCIÓN LUMBAR: es un procedimiento invasivo, tanto diagnóstico como terapéutico, de suma importancia en el manejo de diversas patologías, tanto neurológicas como neuroquirúrgicas. Se realiza para extraer líquido cefalorraquídeo (LCR) al paciente. La punción se realiza de manera aséptica en el espacio subaracnoideo de la región lumbar. Puede requerirse su realización tanto de forma urgente como reglada y en un entorno hospitalario o ambulatorio.

LCR TURBIO: una muestra de LCR presenta turbidez cuando contiene un elevado número de células. El grado de turbidez depende del número que contenga. Es ligera cuando contiene entre 500 y 1000 células/ml. Es evidente con pleocitosis por encima de esa cifra. Es purulento cuando hay varios millares de polimorfonucleares por ml. Se presenta en patologías como meningitis aguda bacterianas, abscesos, especialmente tras su ruptura, reacciones meníngeas agudas secundarias a contrastes y fármacos.

LCR HEMORRÁGICO: si la punción ha sido dificultosa puede haber un líquido hemorrágico falsamente positivo (PL traumática). Para diferenciarla de una hemorragia subaracnoidea real se realiza la prueba de los tres tubos. Se recoge la muestra en tres tubos consecutivos diferentes. Si la coloración debida al traumatismo provocado por la punción desaparece, la hemorragia no era previa a la PL.

LCR XANTOCRÓMICO: en este caso, el LCR muestra un color amarillento debido a la elevación de las proteínas totales y/o la presencia de restos de degradación de los hematíes. Se puede observar un LCR de estas características en una gran cantidad de procesos, siendo los principales los hematomas subdurales, algunos tumores, meningitis y aracnoiditis crónicas y en ciertas polirradiculoneuritis.

Red Biobancos

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 líquido cefalorraquídeo que sean 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 líquido cefalorraquídeo que sean obtenidas mediante punción lumbar 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 Y SERVICIOS

- *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 mayor información remitirse al punto Documentación Relacionada (1)*

Red Biobancos

- *Para muestras no infecciosas: Bolsa o contenedor de transporte interno en el centro hospitalario.*
- *Para muestras infecciosas o peligrosas : Contenedor de transporte de substancias 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 LCR.*
- *Tubo estéril para la recogida del LCR*
- *-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 crioalmacenaje*
- *-Etiquetas adecuadas al tipo de criotubos*
- *Puntas estériles con o sin filtro adaptables al tipo de pipetas utilizadas*

- *Pipetas (Que recojan volúmenes entre 0,2 y 1mililitro)*
- *Papel de filtro*
- *Centrífuga con los adaptadores adecuados para el tipo de tubos de recolección utilizados*
- *Impresora para etiquetado de muestras*
- *Ultracongelador de -80ºC 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

- Se aconseja un volumen de extracción de 10 a 12 ml de muestra. La concentración de los biomarcadores pueden variar con el volumen de extracción, siendo menor cuando es menor o igual a 2 ml.
- Almacenar distintas muestras de LCR obtenidas a lo largo de la PL puede inducir a errores en los resultados. Se aconseja el uso de los 2 primeros ml para el análisis básico del LCR que forma parte del diagnóstico. El resto de la muestra extraída en los distintos tubos se debe unir antes de ser dividida en alícuotas.
- Cuando un LCR se presenta hemorrágico hay que tener en cuenta que la presencia de eritrocitos en el LCR puede dar falsos positivos cuando se estudian biomarcadores. Además el contenido en sangre puede alterar los patrones proteicos del LCR cuando se estudian mediante técnicas proteómicas. Mediante el proceso de centrifugación que se realiza previo a la conservación de las muestras (apartado 6.4), se suelen recuperar las células de la sangre. El contaje de los glóbulos rojos es por tanto fundamental antes de congelar la muestra. No es aconsejable usar para estudios de biomarcadores una muestra de LCR con una cantidad de eritrocitos igual o superior a 550/µl.
- No existen evidencias de que el tipo de aguja empleada en la PL pueda alterar las concentraciones de biomarcadores. No obstante se aconseja el uso de agujas atraumáticas pues son mejor toleradas por los pacientes, los cuales presentan menor riesgo de padecer cefalea postpunción.

Red Biobancos

- Se recomienda el uso de tubos de polipropileno con cierre hermético tipo rosca, por el bajo potencial de adhesión de proteínas a sus paredes y por la seguridad a la hora de evitar el derrame de la muestra.
- La concentración de biomarcadores en sangre a menudo influencia la composición de los mismos en el LCR. Es aconsejable por tanto almacenar muestras de suero, plasma y ADN junto a las de LCR del paciente. Deben ser extraídas en el mismo momento. En muchos estudios el suero del paciente se usa como muestra comparativa de la composición del LCR.
- Se aconseja una cuantificación mediante nefelometría de cada muestra almacenada, como medida de control de calidad de la misma a lo largo del tiempo. Se pueden realizar cuantificaciones en determinados periodos como medida de calidad, verificando el estado de la muestra al menos a nivel de su proteína mayoritaria, la albúmina.
- Los ciclos de congelación-descongelación pueden alterar la concentración de ciertos Biomarcadores. De tal forma que muestras con repetidos ciclos de congelación-descongelación (dos o más ciclos) deberían no ser utilizadas en determinados estudios y separadas para su control.

Red Biobancos

6.2. EXTRACCIÓN DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

6.2.1. Se realizará mediante punción lumbar, tras la firma del consentimiento informado por parte del paciente (bien de estudio específico y/o biobanco)

6.2.2. La recogida del LCR se realiza en los tubos específicos para ello. Tubos estériles de 12 ml con tapón de rosca y sin ningún tipo de aditivo.

6.2.3. Tras la obtención, la muestra se puede mantener entre 4ºC en nevera y 22 ºC (temperatura ambiente) hasta su procesado y almacenamiento. No existen evidencias actuales que demuestren una preferencia en la temperatura a la que se debe de mantener la muestra previa a su procesamiento. Mantener el tubo en posición vertical durante el traslado, ya que el cierre del tubo no es hermético.

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 de LCR y la congelación a -80ºC esté dentro del intervalo entre 1 y 2 horas tras la extracción. En el caso de que se vayan a conservar las

células o se realicen estudios de citometría, se aconseja que el procesamiento de la muestra se realice en el menor tiempo posible, pues el número de células decrece rápidamente (1 hora).

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 (tener en cuenta en estudios de biomarcadores influenciados por el ritmo circadiano).
- Sospecha diagnóstica
- Edad del paciente (la disfunción de barrera del paciente está íntimamente relacionada con la edad del mismo)
- Volumen total de extracción (necesario para el contaje celular)
- Anomalía visual del LCR (un LCR normal es claro como el agua de roca).
- Incidencias ajenas al protocolo.

Red Biobancos

* *Existen diversos modelos de Hoja de Recogida de Datos dependiendo del biobanco receptor de las muestras, adaptados a las características específicas de su funcionamiento y a su operativa interna.*

6.4. PROCESAMIENTO DEL LCR Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

6.4.1. El procesamiento del LCR consiste en separar las células que pudiera contener con el fin de: contarlas, analizarlas mediante citometría de flujo, conservarlas en condiciones de Biobanco y evitar su interferencia en los análisis diagnósticos que se lleven a cabo.

6.4.2. Una vez recibida la muestra en el laboratorio, se pasa a un tubo falcón de 15 ml para su centrifugación. Si las células van a ser preservadas para aislar posteriormente ARN, se recomienda centrifugar a 400 g durante 10 min a temperatura ambiente para evitar la rotura celular. Si el volumen de LCR es inferior a 4 ml se puede centrifugar en dos eppendorf, retirar el sobrenadante y almacenar las células. Con este proceso se gestiona de forma óptima el espacio en el congelador. Si no se prevé extracción de ARN, se aconseja centrifugar a 2000 g durante el mismo tiempo y a la misma temperatura.

6.4.3. Tras la centrifugación, se retira con cuidado el sobrenadante y se pasa a un tubo recolector limpio y estéril (ya sea otro tubo tipo Falcon, o un tubo de las mismas características que el utilizado para la recogida del LCR cuando va fluyendo tras la PL). Es importante que quede el menor volumen de líquido posible en el fondo. Las células se congelan directamente a -80ºC o bien se añade el tampón adecuado para el procesamiento que posteriormente se desea hacer y se congelan a -80ºC. El número de células se calcula en función del volumen de muestra almacenada en el biobanco, teniendo en cuenta el contaje de células realizado en el laboratorio con el volumen de LCR que se ha destinado al diagnóstico.

6.4.4. Alicuotar en fracciones de 0.3-0.5 ml en viales de criocongelación adecuados, debidamente etiquetados e identificados hasta transferir todo el LCR. Sellar correctamente los tubos para conseguir un cierre hermético. Registrar el número de alícuotas obtenidas para cada muestra. Almacenar en un tiempo igual o inferior a 2 horas a -80ºC.

6.4.5. 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).

Red Biobancos

8. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA

1. *Instrucciones Técnicas para el transporte sin riesgos de mercancías peligrosas por vía aérea-OACI 2009. http://www.traficoadr.com/oaci/oaci_2006.htm*

2. *Australasian Biospecimen Network, 2007. Guidelines for Biorepository Protocols.*

3. *Teunissen CE, et al.., 2009. A consensus protocol for the standarization of cerebral fluid collection and biobanking. Neurology 73:1914-1922.*

4. *Deisenhammer F, Bartos A, Egg R, et al. Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis: report from an EFNS task force. Eur J Neurol 2006;13:913–922.*

5. *Reiber H. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. Clin Chim Acta 2001;310:173–186.*

6. *Berven FS, Kroksveen AC, Berle M, et al. Pre-analytical influence on the low molecular weight cerebrospinal fluid proteome. Proteomics Clin Appl 2007;1:699 –711*

7. *Chaigneau C, Cabioch T, Beaumont K, Betsou F. Serum biobank certification and the establishment of quality controls for biological fluids: examples of serum biomarker stability after temperature variation. Clin Chem Lab Med 2007;45:1390 –1395*

8. *Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. Arch Neurol 2005;62:865– 870.*

9. *Sample Handing and Storage Subgroup and Recommendations. 2004. the UK Biobank.*

10. *NCI. NCI best practices for biospecimen resources. June 2007. Available at: www.nci.nih.gov. Last accessed February 23, 2011.*

11. *ISBER Best Practices for repositories: Collection, storage, retrieval and distribution of biological materials for research. Cell Preservation Technology 6(1), 3-58, 2008 http://www.isber.org/Pubs/BestPractices2008.pdf*

Red Biobancos

OBTENCIÓN, PROCESADO Y ALMACENAJE DE MUESTRAS DE LÍQUIDO PLEURAL

Protocolo Normalizado de Trabajo

Red Biöbancos

RED NACIONAL DE BIOBANCOS

05 de Junio de 2013

Grupo de Trabajo en Derivados Hemáticos

REVISIÓN	REALIZADO	FECHA	APROBADO	FECHA	ENTRADA EN VIGOR
00	GRUPO DE DERIVADOS HEMÁTICOS	05/06/2013			
Modificaciones:					

Instituto de Salud Carlos III

ReTBioH

Red Biöbancos
Instituto de Salud Carlos III

OBTENCIÓN, PROCESADO Y ALMACENAJE DE MUESTRAS DE LÍQUIDO PLEURAL

Protocolo Normalizado de Trabajo

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS
2. DEFINICIONES
3. OBJETO
4. ALCANCE
5. MATERIALES
6. DESARROLLO
7. DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA
8. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA

Red Biobancos

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.

Red Biobancos

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 substancias 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 crioalmacenaje*
- *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 -80ºC 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*

Red Biobancos

- *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 4ºC 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 -80ºC 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.

Red Biobancos

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 4ºC**.

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 sin tocar el botón celular.

Red Biobancos

6.4.4. El botón celular se congela en medio de congelación *(SBF+10% DMSO)* a -80ºC 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 -80ºC.

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 Handing 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.*

Red Biobancos

- *Porcel JM. Handling of pleural fluid samples for routine analysis. Plevra Bülteni 2013 (in press)*

Red Biöbancos

OBTENCIÓN, PROCESADO Y ALMACENAJE DE MUESTRAS DE PLASMA

Protocolo Normalizado de Trabajo

Red Biöbancos

RED NACIONAL DE BIOBANCOS

26 de Mayo de 2011

Grupo de Trabajo en Derivados Hemáticos

REVISIÓN	REALIZADO	FECHA	APROBADO	FECHA	ENTRADA EN VIGOR
01	GRUPO DE DERIVADOS HEMÁTICOS	26/05/2011	Dirección	16/12/2014	16/12/2014
Modificaciones: Se modifican las condiciones de la primera centrifugación. Punto 6.3.4					

Instituto de Salud Carlos III

ReTBioH

Red Biöbancos
Instituto de Salud Carlos III

OBTENCIÓN, PROCESADO Y ALMACENAJE DE MUESTRAS DE PLASMA

Protocolo Normalizado de Trabajo

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS
2. DEFINICIONES
3. OBJETO
4. ALCANCE
5. MATERIALES
6. DESARROLLO
7. DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA
8. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA

Red Biobancos

1. ABREVIATURAS

- **EDTA**: Acido etilendiamintetraacético.
- **ACD**: Ácido citrato dextrosa.
- **CMSPs**: Células mononucleares de sangre periférica.

2. DEFINICIONES

- **Plasma sanguíneo**: fracción líquida y acelular de la sangre.

RaTBioH
Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

- **Pellet**: botón celular de color blanco (aunque en ocasiones puede tener color rojizo debido a la presencia de algunos eritrocitos). Se debe de evitar la presencia de eritrocitos, pero no es motivo suficiente para descartar la muestra
- **EDTA**: Acido etilendiamintetraacético. Agente anticoagulante que bloquea la cascada de la coagulación de la sangre mediante la atracción de calcio iónico.
- **ACD**: solución anticoagulante de dextrosa, citrato sódico y ácido cítrico que inhibe la coagulación mediante la atracción de iones.
- **Heparina**: agente anticoagulante que prolonga el tiempo de coagulación de la sangre a través de la activación de la antitrombina III.
- **Lipemia**: presencia de lípidos en sangre. El plasma adquiere una apariencia turbia o lechosa.
- **Ictericia**: unión de bilirrubina a la albúmina del plasma, dando lugar a plasma amarillo intenso.
- **Hemólisis**: fenómeno de desintegración de los eritrocitos que provoca que el plasma tenga un color rosado o rojo.

Red Biobancos

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 plasma 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 plasma 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 substancias 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.*
- *Tubo de extracción venosa con sistema tipo vacutainer que contenga anticoagulante (K_2 o K_3 EDTA, citrato o heparina)*
- *Gradillas para tubos de extracción sanguínea*
- *Centrífuga con los adaptadores adecuados para el tipo de tubos de recolección utilizados (tubos de 5ml, 10 ml y tubos Falcon de 15 ó 50mL)*
- *Guantes para protección en la manipulación*
- *Pipetas Pasteur estériles de 1 a 5 mililitros*
- *Pipetas que recojan volúmenes entre 0,2 y 1mililitro)*
- *Puntas estériles con o sin filtro adaptables al tipo de pipetas utilizadas*
- *Tubo Falcon 15 ml con tapón de rosca*
- *Criotubos estériles (desde 0.5 a 2 mililitros)*
- *Gradillas para criotubos*
- *Cajas de crioalmacenaje*
- *Etiquetas adecuadas al tipo de criotubos*
- *Impresora para etiquetado de muestras*

Red Biobancos

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

- *Ultracongelador de -80ºC 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 (Maxwell, Bio-e Bank, NorayBanks…)*

6. DESARROLLO

6.1. CONSIDERACIONES PREVIAS

- **Elección del anticoagulante**: En caso de que la muestra de sangre total 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.
  - EDTA con K2 ó K3: debido a sus características no se aconseja su uso para la obtención muestras de plasma en las que se van a realizar ensayos que midan presencia de iones o que incluyan cationes divalentes como intermediarios de la reacción. Por el contrario, es aconsejable utilizarlo si la muestra de sangre se ha obtenido para obtener CMSPs o pellet celular.
  - ACD: debido a sus características no se aconseja su uso para la obtención de muestras de plasma en las que se van a realizar inmunoensayos, ya que disminuye los valores esperados. Se aconseja utilizarlo si la muestra de sangre se ha obtenido para obtener eritrocitos.
  - Heparina: por sus características no es recomendable para obtener plasma en el que se vayan a hacer análisis peptídicos o proteómicos porque puede interferir en algunos análisis de espectrometría de masas. Su uso es recomendable en caso de que la muestra se haya obtenido para realizar estudios celulares.
- **Tiempo:** Se recomienda ajustar el tiempo óptimo de procesamiento de la muestra al tipo de ensayo que se vaya a hacer con la muestra o sus productos derivados. Según la experiencia, el tiempo máximo recomendable:
  - Para estudios de biomarcadores en plasma, se aconseja centrifugar la sangre lo más rápido posible (idealmente dentro de los 30 minutos post-extracción) para evitar alteraciones en la composición del plasma debidas a los cambios de expresión que ocurren en las células sanguíneas como consecuencia de la hipoxia.

Red Biobancos

- Para ensayos celulares: 1,5 horas
- Para estudios virológicos: 24 horas

- **Temperatura:** Para decidir la temperatura que minimice la alteración de la muestra deberemos tener en cuenta principalmente el tiempo que estimamos que se va a tardar en procesar (ver punto 6.3.2).
- **Número de centrifugaciones:** Se estima que por lo menos el 14% de los péptidos que componen el plasma proceden de las plaquetas debido a su activación post-extracción o a la existencia de plaquetas residuales tras la centrifugación de la sangre. El mejor método para reducir la cantidad de plaquetas en plasma hasta <10/nL es hacer una doble centrifugación. En cualquier caso, hay que tener en cuenta las necesidades del estudio para el cual se está haciendo el muestreo y adaptar el PNT, en caso de que sea requerible, del siguiente modo:

  - Como recomendación general y para la medición de biomarcadores libres en plasma será recomendable eliminar las plaquetas y minimizar la liberación de su contenido mediante doble centrifugación. Es lo que se ha tenido en cuenta en este PNT.
  - Excepcionalmente, para la medición de biomarcadores secuestrados en plaquetas o para estudios específicos de hematología y cardiología relacionados con la función plaquetaria, será necesario adaptar las condiciones de centrifugación a las necesidades del estudio.

- **Tiempo de almacenamiento:** Es recomendable tener en cuenta el tiempo y la temperatura a la que han estado almacenadas las muestras, puesto que muchos componentes del plasma son inestables incluso a -80ºC y dejan de ser detectables con el tiempo.
- **Registro de datos:** Es muy importante anotar y registrar los valores de las variables preanalíticas consideradas en este punto con el fin de tener las muestras bien documentadas. De este modo, se podrán restringir los valores de los parámetros de búsqueda a las necesidades del estudio para el cual se ha solicitado la muestra, lo que nos permitirá seleccionar muestras más homogéneas que darán resultados más reproducibles.

Red Biobancos

6.2. RECEPCIÓN DE LA MUESTRA EN EL BIOBANCO

6.2.1. 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.

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

6.2.3. 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
- Condiciones de transporte hasta la recepción en el biobanco: temperatura y tiempo transcurrido desde su extracción.
- Volumen de sangre recibida
- Tipo de tubo y de anticoagulante
- Grado de hemólisis
- Grado de Lipemia
- Grado de Ictericia
- Nivel de coagulación
- Tiempo de procesamiento
- Fecha y hora de congelación

6.2.4. Registrar en el sistema informático la entrada de la muestra y datos asociados.

6.3. OBTENCIÓN DEL PLASMA Y CONSERVACIÓN DE LAS ALÍCUOTAS

6.3.1. Partimos de sangre total extraída por venopunción. El procesamiento de sangre total para la obtención de plasma consiste en separar la fracción celular de la sangre con el fin de obtener alícuotas de plasma que sean lo más representativas posible del estado fisiológico del donante en el momento que se le ha extraído y conservarlas en condiciones de Biobanco, evitando interferencias en los análisis diagnósticos que se lleven a cabo.

Red Biobancos

6.3.2. **Temperatura**:

- Si la muestra de sangre va a ser centrifugada inmediatamente (dentro de los 30 minutos posteriores a la extracción), lo aconsejable es mantenerla a temperatura ambiente (16-24ºC) hasta el momento de su procesado, para minimizar la activación plaquetaria que se produce a bajas temperaturas provocando la liberación de proteínas que alteran la composición del plasma de manera irreversible.
- Si sabemos que el procesamiento de la muestra se va a demorar, es aconsejable mantenerla refrigerada (2-6ºC) hasta el momento de su procesado con el fin de evitar la degradación de componentes de la muestra sensibles a la temperatura.

6.3.3. **Tiempo de procesamiento**:

Se recomienda que el tiempo transcurrido entre la extracción de la sangre y su congelación sea **inferior a 2 horas,** minimizando en lo posible la demora en la primera centrifugación**.** El tiempo máximo aceptable para ciertos estudios es de hasta 72 horas si la muestra ha estado conservada a 4ºC.

6.3.4. Centrifugar la muestra a **1300-1500g durante 10-15min.** Para elegir la temperatura, seguiremos el mismo criterio que en el punto 6.3.2.

6.3.5. Con esta primera centrifugación se consigue separar el plasma de la fracción celular de la sangre. Encontraremos en el tubo 3 fases:

Red Biobancos

- La fracción superior, con aspecto claro y transparente, de color amarillo corresponde al plasma.
- La fase intermedia, que es muy fina y de color gris claro, es donde encontramos los leucocitos
- La fracción inferior, de color rojo oscuro, corresponde a los eritrocitos.

6.3.6. Aspirar cuidadosamente con una pipeta el plasma (fase superior amarilla) y transferirlo a un tubo de 15ml estéril convenientemente identificado/etiquetado.

6.3.7. Centrifugar el material transferido a **2500g durante 15min** a la misma temperatura utilizada en el punto 6.3.4. Con esta segunda centrifugación se consigue eliminar la mayoría de las plaquetas contenidas en el plasma.

6.3.8. Alicuotar en fracciones de al menos 0.5 ml en viales de criocongelación adecuados, debidamente etiquetados e identificados. Sellar correctamente los tubos para conseguir un cierre hermético. Registrar el número de alícuotas obtenidas para cada muestra. Almacenar en un tiempo inferior o igual a 2 horas. Una vez obtenido el plasma pobre en plaquetas, es recomendable mantenerlo a 4ºC si no se va a guardar inmediatamente a -80ºC.

6.3.9. Registrar la ubicación de la muestra en el software de gestión de muestras que maneje el biobanco, así como la información detallada en el punto 6.2.3

7. DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA

- *Norma UNE-EN-ISO 9001:2008.* Sistemas *de gestión para la calidad. Requisitos.*

- ***Specimen collection and handling: standardization of blood sample collection**. Tammen H. Methods Mol Biol. 2008;428:35-42*

- ***Immunoassay and antibody microarray analysis of the HUPO Plasma Proteome Project reference specimens: systematic variation between sample types and calibration of mass spectrometry data.** Haab BB, Geierstanger BH, Michailidis G, Vitzthum F, Forrester S, Okon R, Saviranta P, Brinker A, Sorette M, Perlee L, Suresh S, Drwal G, Adkins JN, Omenn GS. Proteomics. 2005 Aug;5(13):3278-91*

- ***HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: towards the standardization of parameters for plasma proteome samples.** Rai AJ, Gelfand CA, Haywood BC, Warunek DJ, Yi J, Schuchard MD, Mehigh RJ, Cockrill SL, Scott GB, Tammen H, Schulz-Knappe P, Speicher DW, Vitzthum F, Haab BB, Siest G, Chan DW. Proteomics. 2005 Aug;5(13):3262-77*

- ***Standard Operating Procedures.** Australia's Healthy Ageing Biobank. October 2009, version 2.*

- ***The UK Biobank sample handling and storage protocol for the collection, processing and archiving of human blood and urine.** Paul Elliott, Tim C Peakman. International Journal of Epidemiology 2008;37:234–244.*

- ***Stability of plasma analytes after delayed separation of whole blood: implications for epidemiological studies***. *Sarah Clark, Linda D Youngman, Alison Palmer, Sarah Parish, Richard Peto, Rory Collins. International Epidemiological Association 2003;32:125-130.*

- ***Serum biobank certification and the establishment of quality controls for biological fluids: examples of serum biomarker stability after temperature variation***. *Chrastine Chaigneau, Thomas Cabioch, Katy Beaumont and Fotini Betsou. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2007; 45 (10): 1390-1395*

- ***Human Biospecimen Research: Experimental Protocol and Quality Control Tools***

- ***Biospecimen Reporting for Improved Study Quality (BRISQ)***

- ***Issues on fit-for-purpose validations of a panel of ELISAs for application as biomarkers in clinical trials of anti-Angiogenic drugs***

- ***Reversible alterations in platelet morphology produced by anticoagulants and cold***

- ***Peptidomic analysis of human blood specimens: Comparison between plasma specimens and serum by differential peptide display.*** *Harald Tammen, Imke Schulte, Rudiger Hess, Christoph Menzel, Markus Kellmann, Thomas Mohring and Peter Schulz-Knappe. Proteomics 2005, 5, 3414–3422*

8. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA

- *PNT sobre extracción de sangre*
- *Hoja de recogida de datos asociados a la muestra*
- *PNT control de calidad*

Red Biobancos

OBTENCIÓN, PROCESADO Y ALMACENAJE DE MUESTRAS DE SUERO

Protocolo Normalizado de Trabajo

Red Biobancos

RED NACIONAL DE BIOBANCOS

6 de Junio de 2011

Grupo de Trabajo en Derivados Hemáticos

REVISIÓN	REALIZADO	FECHA	APROBADO	FECHA	ENTRADA EN VIGOR
00	GRUPO DE DERIVADOS HEMÁTICOS	26/05/2011	Dirección	26/05/2011	19/07/2011
Modificaciones: 1/12/2011					

Instituto de Salud Carlos III

ReTBioH

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

OBTENCIÓN, PROCESADO Y ALMACENAJE DE MUESTRAS DE SUERO

Protocolo Normalizado de Trabajo

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS
2. DEFINICIONES
3. OBJETO
4. ALCANCE
5. MATERIALES Y SERVICIOS
6. DESARROLLO
7. DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA
8. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA

Red Biobancos

1. ABREVIATURAS

IATA: International Air Transport Association

OACI/ICAO: International Civil Aviation Organization

SAE: Sistema de administración de energía

g: aceleración gravedad (unidad de medida de la FCR:Fuerza Centrífuga Relativa)

Red Biobancos Instituto de Salud Carlos III

Instituto de Salud Carlos III

2. DEFINICIONES

SUERO SANGUÍNEO O SUERO HEMÁTICO**:** Fracción de sangre resultante tras la coagulación y eliminación del coágulo de fibrina y otros componentes. Equivalente al plasma sanguíneo sin las proteínas que intervienen en la coagulación.

MUESTRA HEMOLIZADA**:** es la ruptura de los hematíes que libera hemoglobina y otras sustancias en el plasma/suero debido al cual adquiere un color entre rosa y rojo.

MUESTRA COAGULADA: se produce debido a una extracción difícil de larga duración, por no mezclar la sangre en los tubos adecuadamente o por las características del paciente.

MUESTRA CON ICTERICIA**:** suero o plasma que contiene un aumento en los niveles de bilirrubina y que le da al mismo una coloración amarilla más intensa.

MUESTRA LIPÉMICA: suero o plasma que contiene un alto contenido en grasa y aspecto lechoso y/o turbio y se puede presentar en muestras de pacientes que no han guardado el ayuno recomendado y con una ingesta copiosa de alimentos.

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 suero que sean depositadas en los biobancos pertenecientes a cualquier centro u hospital adscrito a la Red Nacional de BioBancos.

Red Biobancos

4. ALCANCE

Este procedimiento es aplicable a todas las muestras de suero 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 Y SERVICIOS

- *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 mayor información remitirse al punto Documentación Relacionada (1)*

- *Para muestras no infecciosas: Bolsa o contenedor de transporte interno en el centro hospitalario.*
- *Para muestras infecciosas o peligrosas : Contenedor de transporte de substancias 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.*
- *Nevera portátil 4ºC*
- *Tubo de extracción de sangre por sistema de vacío con tapón de seguridad y gel separador*
- *-Guantes para protección en la manipulación*
- *-Pipetas Pasteur estériles de 1 mililitro*
- *Criotubos estériles (desde 0.5 a 2 mililitros)*
- *-Gradillas para tubos de extracción sanguínea*
- *-Gradillas para criotubos*
- *-Cajas de crioalmacenaje*
- *-Etiquetas adecuadas al tipo de criotubos*
- *Puntas estériles con o sin filtro adaptables al tipo de pipetas utilizadas*
- *Pipetas (Que recojan volúmenes entre 0,2 y 1mililitro)*
- *Papel de filtro*
- *Centrífuga con los adaptadores adecuados para el tipo de tubos de extracción utilizados*
- *Impresora para etiquetado de muestras*
- *Ultracongelador de -80ºC con sistema de registro de temperatura, sistema de mantenimiento de temperatura en caso de corte de corriente eléctrica (inyección de CO_2, sistema de administración de energía (SAE) interno, sistema electrógeno) y sistema de alarma telefónica*

Red Biobancos

- *Software de gestión de muestras aplicable a cada centro (Ejemplos: aplicación BBUN (Maxwell), aplicación Bio-e Bank, etc…)*

6. DESARROLLO

6.1. CONSIDERACIONES PREVIAS

- El tipo de centrifuga utilizada puede influir en la estabilidad de la barrera de gel. El uso de una centrífuga con rotor oscilante, en lugar de una centrífuga con rotor angular, permite la obtención de una barrera de gel más estable. La centrifugación debería realizarse en una centrífuga refrigerada (15-24ºC).
- Re-centrifugación de los tubos con gel separador está terminantemente prohibida, ya que podría provocar cambios en los resultados analíticos (por ejemplo potasio)
- Para investigación en Biomarcadores
    - El tiempo de extracción de la muestra es especialmente importante en el estudio de Biomarcadores influenciados por el ritmo circadiano.
    - Los procesos de degradación en el suero son tiempo-dependiente y temperatura-dependiente. Para la investigación de Biomarcadores que son altamente sensibles a estos dos factores es fundamental procesar la muestra en un tiempo mínimo. Es el caso de estudios enfocados a búsqueda de biomarcadores mediante metabolómica y/o proteómica.
- Los ciclos de congelación-descongelación pueden alterar la concentración de ciertos Biomarcadores. De tal forma que muestras con repetidos ciclos de congelación-descongelación (dos o más ciclos) deberían no ser utilizadas en determinados estudios y separadas para su control.

6.2. EXTRACCIÓN DE SANGRE

6.2.1. Se realizará tras la firma del consentimiento informado por parte del paciente (bien de estudio específico y/o biobanco)

6.2.2. La obtención se realiza en tubos de extracción sanguínea con gel y partículas activadoras de la coagulación como aditivo. Hay distintos formatos de tubos desde 5 ml hasta 8,5 ml que pueden ser utilizados (Vacuette; Vacutainer, etc…).

Red Biobancos

6.2.3. Tras la obtención es necesario invertir el tubo varias veces suavemente para favorecer la coagulación al poner en contacto la sangre con las partículas activadoras de la misma (4 veces máximo). Mantener el tubo en posición vertical posteriormente.

6.2.4. La muestra perfectamente etiquetada y la petición se transporta 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 sanguínea y la congelación a -80ºC 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.

6.3. RECEPCIÓN DE LA MUESTRA EN EL LABORATORIO

Red Biobancos

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.
- Incidencias ajenas al protocolo.

* *Existen diversos modelos de Hoja de Recogida de Datos dependiendo del biobanco receptor de las muestras, adaptados a las características específicas de su funcionamiento y a su operativa interna.*

6.4. PROCESAMIENTO: OBTENCIÓN DE SUERO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

6.4.1. El procesamiento de la sangre periférica para la obtención de suero, debe hacerse en el menor tiempo posible, estableciéndose un tiempo de procesado óptimo de 1.5 h ± 30 min.

6.4.2. Para evitar la activación plaquetaria, las muestras deben mantenerse a temperatura ambiente tras la extracción y hasta su centrifugación evitando la exposición directa a la luz.

6.4.3. Una vez recibida la muestra en el laboratorio, mantener el tubo de sangre en vertical en una gradilla para su coagulación durante 30 min contado desde el momento de la extracción. Si la muestra no se centrifuga seguidamente transcurrido este tiempo, deberá mantenerse a 4ºC en posición vertical hasta su procesamiento y almacenamiento posterior (máximo 2 h), anotando la incidencia en la hoja de laboratorio.

6.4.4. Centrifugar la muestra entre 1500-2000 g a temperatura ambiente, durante 10 min.

6.4.5. Aspirar cuidadosamente la fracción superior de aspecto claro y transparente, de color amarillento (suero) con ayuda de una pipeta Pasteur estéril o una micropipeta de volumen adecuado sin tocar el gel de la interfase.

6.4.6. Alicuotar en fracciones de, al menos, 0.3-0.5 ml en viales de congelación adecuados, debidamente etiquetados e identificados hasta transferir todo el suero. Sellar correctamente los tubos para conseguir un cierre hermético. Registrar el número de alícuotas obtenidas para cada muestra.

6.4.7. Registrar la ubicación de la muestra en el software de gestión de muestras que maneje el biobanco.

Red Biobancos

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

1. *Instrucciones Técnicas para el transporte sin riesgos de mercancías peligrosas por vía aérea-OACI 2009. http://www.traficoadr.com/oaci/oaci_2006.htm*
2. *Australasian Biospecimen Network, 2007. Guidelines for Biorepository Protocols.*
3. *Teunissen CE, et al.., 2009. A consensus protocol for the standarization of cerebral fluid collection and biobanking. Neurology 73:1914-1922.*
4. *Sample Handing and Storage Subgroup and Recommendations. 2004. the UK Biobank.*
5. *Holland NT., Smith MT., Eskenazi b., Bastaki M. Biological sample and processing for molecular epidemiological studies. Mutation Research 2003; 543:217-34*
6. *Bernini P, Bertini I, Luchinat C, Nincheri P, Staderini S, Turano P. Standar operating procedures for pre-analytical handling of blood and urine for metabolic studies and biobanks. J Biomol NMR, 2011 49:231-243.*
7. *Sheldon E, Kim Chi MS, McIntire RA, Aghajanova D, Zelenko Z, Irwin JC, Linda C Biobanking human endometrial tissue and blood specimens: standard operating procedure and importance to reproductive biology research and diagnosis development.. Fertility and Sterility Vol 95, Nº6 May 2011.*
8. *NCI. NCI best practices for biospecimen resources. June 2007. Available at: www.nci.nih.gov. Last accessed February 23, 2011.*
9. *Kisand K, Kerna I, Kumn J, Jonsson H, Tamm A. Impact of cryopreservation on serum concentration of matrix metalloproinases (MMP)-7, TIMP-1, vascular growth factors (VEGF) and VEGF-R2 in Biobank samples. Clin Chem Lab Med 2011;49(2):229-235*
10. *ISBER Best Practices for repositories: Collection, storage, retrieval and distribution of biological materials for research. Cell Preservation Technology 6(1), 3-58, 2008 http://www.isber.org/Pubs/BestPractices2008.pdf*
11. *HIV/AIDS Network Coordination (HANC). http://www.hanc.info*

Red Biobancos

OBTENCIÓN, PROCESADO Y ALMACENAJE DE MUESTRAS DE SANGRE TOTAL

Protocolo Normalizado de Trabajo

Red Biöbancos
Instituto de Salud Carlos III

RED NACIONAL DE BIOBANCOS

24 de Mayo de 2011

Grupo de Trabajo en Derivados Hemáticos

REVISIÓN	REALIZADO	FECHA	APROBADO	FECHA	ENTRADA EN VIGOR
00	GRUPO DE DERIVADOS HEMÁTICOS	24/05/2011	Dirección	24/05/2011	19/07/2011
Modificaciones:					

Instituto de Salud Carlos III

RETBioH

Red Biöbancos
Instituto de Salud Carlos III

OBTENCIÓN, PROCESADO Y ALMACENAJE DE MUESTRAS DE SANGRE TOTAL

Protocolo Normalizado de Trabajo

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS
2. DEFINICIONES
3. OBJETO
4. ALCANCE
5. MATERIALES Y SERVICIOS
6. DESARROLLO
7. DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA
8. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

1. ABREVIATURAS

- **EDTA**: Ácido etilendiamintetraacético. El EDTA atrae a los iones de calcio bloqueando la cascada de coagulación. (sal dipotásica K2 ó K3)
- **ACD:** Ácido citricoCitrato y Dextrosa en una proporción de 0.9, 2 y 2 gr respectivamente en 120 ml de agua destilada. Se emplea en 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

2. DEFINICIONES

- **Anticoagulante**: Sustancia que impide la coagulación de la sangre.
- **Lipemia** : Presencia de lípidos (colesterol, triglicéridos y fosfolípidos) en la sangre, que en condiciones normales suele oscilar entre 400 y 700 mg cada 100 ml de sangre.
- **Ictericia**: exceso de bilirrubina en sangre para poder ser eliminada.

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 sangre total 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.

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

5. MATERIALES Y SERVICIOS

- *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 substancias 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.*
- *Tubo de extracción sanguínea para hemograma y/o hematología, con:*

- *EDTA como anticoagulante (tapón lila) (En caso de que se necesite determinación de metales como Plomo, Cadmio, Zinc etc. el tubo con anticoagulante deberá estar exento de estos metales, así como todo el material que entre en contacto con la sangre)*
- *Citrato como anticoagulante (tapón amarillo)*
- *Heparina como anticoagulante (tapón verde)*

- *Pipetas pasteur estériles*
- *Gradillas para tubos de extracción sanguínea*
- *Gradillas para criotubos*
- *Criotubos de 1,5 a 2ml, estériles*
- *Marcadores y bolígrafos*
- *Guantes para proteger al personal de manipulación de sangre y/o materiales de riesgo biológico*
- *Papel de filtro*
- *Bata de protección frente a derrames y salpicaduras*
- *Etiquetas suficientes y adecuadas para tubos de recogida*
- *Impresora de etiquetaje*
- *Cajas de crioalmacenaje*
- *Ultracongelador -80ºC*

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

6. DESARROLLO

6.1. COORDINACIÓN PARA LA OBTENCIÓN Y PROCESADO DE MUESTRAS SANGUINEAS

6.1.1. La sangre debe extraerse con posterioridad a que el paciente haya firmado el consentimiento informado de donación de muestras al biobanco. Se recomienda que el tiempo transcurrido entre la extracción sanguínea y la congelación a -80ºC 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.

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

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. 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

6.2.1. Verificar la información del paciente, siempre manteniendo la privacidad y ética garantizadapor laLey 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.

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

6.2.2. Etiquetar o rotular un tubo de extracción sanguínea con anticoagulante para obtener alícuotas de sangre total. 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) Criopreservación de hematíes: Citrato ACD, CPD-A o CPD

6.3. OBTENCIÓN DE SANGRE TOTAL

6.3.1. Inmediatamente tras la extracción, invertir suavemente el tubo 5 veces para favorecer que la sangre se mezcle bien con el anticoagulante correspondiente.

6.3.2. Transportarla al laboratorio para su procesado en un tiempo no superior al máximo óptimo definido para cada estudio tras la extracción de la muestra,

manteniendo las pautas de seguridad de transporte de material biológico establecidas por cada centro. La sangre ha de ser trasladada al biobanco a temperatura ambiente, nunca en frío.

6.3.3. En el biobanco se prepararan criotubos para el almacenaje de sangre total, debidamente etiquetados e identificados. En función de la edad,de las incidencias o de la situación física del paciente, puede variar el volumen de sangre que se recibe, si bien las extracciones deben aproximarse a unos valores de referencia que permitan su procesado y aprovechamiento, siendo:

EDAD DEL PACIENTE	VOLUMEN MEDIO DE SANGRE
0-2 AÑOS	0,5 – 2 mL
3-5 AÑOS	2,5 – 5 mL
6-11 AÑOS	5-10 mL
> 12 AÑOS	10-15 mL
>18 AÑOS	<25 mL

Figura 1: Tabla de relación edad – volumen de extracción.

6.3.4. Cuidadosamente transferir,al menos, 0,5ml de sangre total en el/los criotubo/s debidamente etiquetado/s e identificado/s.

6.3.5. Seguidamente, almacenar los criotubos en cajas de crioalmacenaje y guardarlas en un ultracongelador de -80ºC.

6.3.6. Registrar la ubicación de la muestra guardada en el software correspondiente para cada biobanco.

Red Biobancos Instituto de Salud Carlos III

6.4. MANTENIMIENTO DE LA TRAZABILIDAD Y LOS 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

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

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

- *Declaration of Helsinki.* http://ohsr.od.nih.gov/helsinki.php3http://www.wma.net/e/policy/b3.htm
- *Tri-Council Policy Statement; Ethical Conduct for Research Involving Humans; Medical Research Council of Canada; Natural Sciences and Engineering Council of Canada; Social Sciences and Humanities Research Council of Canada, August 1998.* http://www.pre.ethics.gc.ca/english/policystatement/policystatement.cfm
- *Human Tissue and Biological Samples for use in Research. Operational and Ethical Guidelines. Medical Research Council Ethics Series.* http://www.mrc.ac.uk/pdftissue_guide_fin.pdf

- *Best Practices for Repositories I. Collection, Storage and Retrieval of Human Biological Materials for Research. International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER).* http://www.isber.org
- *National Bioethics Advisory Commission: Research involving human biological materials: Ethical issues and policy guidance, Vol. I: Report and recommendations of the National Bioethics Advisory Committee. August 1999.* http://bioethics.georgetown.edu/nbac/hbm.pdf
- *US National Biospecimen Network Blueprint*http://www.ndoc.org/about_ndc/reports/NBN_comment.asp
- *Blood Collection: Routine Venipuncture and Specimen Handling.* http://medlib.med.utah.edu/WebPath/TUTORIAL/PHLEB/PHLEB.html

Red Biöbancos
Instituto de Salud Carlos III

HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

Formato Unificado de Volante

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

RED NACIONAL DE BIOBANCOS

30 de Octubre de 2012

Grupo de Trabajo en Derivados Hemáticos

REVISIÓN	REALIZADO	FECHA	APROBADO	FECHA	ENTRADA EN VIGOR
00	GRUPO DE DERIVADOS HEMÁTICOS	30/10/2012	Dirección	30/10/2012	30/10/2012
Modificaciones:					

Instituto de Salud Carlos III

RetBioH

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

Formato Unificado de Volante

ÍNDICE

1. **ABREVIATURAS**
2. **DEFINICIONES**
3. **OBJETO**
4. **ALCANCE**
5. **MATERIALES Y SERVICIOS**
6. **DESARROLLO**
7. **DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA**
8. **DOCUMENTACIÓN RELACIONADA**
9. **ANEXOS**

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

1. ABREVIATURAS

- **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.

2. DEFINICIONES

- **Heparina:** Anticoagulante, cofactor de la antitrombina III, que es el inhibidor natural de la trombina.

RsTBioH
Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III
Instituto de Salud Carlos III

- **Ictericia:** La ictericia es la coloración amarillenta de la piel y mucosas debida a un aumento de la bilirrubina.
- **Hemólisis:** La hemólisis (eritrocateresis) es el fenómeno de la desintegración de los eritrocitos (glóbulos rojos o hematíes).
- **Lipemia:** Presencia de lípidos (colesterol, triglicéridos y fosfolípidos) en la sangre.
- **Bilirrubina:** La bilirrubina es un pigmento biliar de color amarillo anaranjado que resulta de la degradación de la hemoglobina de los glóbulos rojos muertos.
- **Triglicérido:** tipo de lípidos, formados por una molécula de glicerol, que tiene esterificados sus tres grupos hidroxílicos por tres ácidos grasos, ya sean saturados o insaturados.

3. OBJETO

El objeto de este formato es definir los datos básicos y las características intrínsecas que deben acompañar a todas las muestras recibidas en los centros u hospitales adscritos a la Red Nacional de Biobancos. Dichos datos deben recogerse y registrarse en la operativa diaria de gestión de muestras, para cumplir con las directrices básicas de calidad, ya sea tanto en la obtención y manejo, como en el procesamiento de las muestras de sangre total, con el fin de garantizar la trazabilidad del material biológico donadas, así como asegurar la mayor exactitud y riqueza de la información registrada en las bases de datos de cada centro u hospital adscrito a la Red Nacional de Biobancos.

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

4. ALCANCE

Este formato es aplicable a todas las muestras sanguíneas que sean extraídas con la finalidad de ser procesadas y almacenadas en un biobanco.

5. MATERIALES Y SERVICIOS

- *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 substancias peligrosas que cumpla con la legislación vigente: Real Decreto 664/97, siguiendo la "Instrucción de embalaje 620 (IATA – OACI 602)"*

6. DESARROLLO

Contenido recogido en páginas 4,5 y 6.

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

- *WHO/HSE/EPR/2008.10. Guia sobre la reglamentación relativa al Transporte de sustancias infecciosas.2009–2010. Organización Mundial de la Salud*

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

RsTBioH
Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III
Instituto de Salud Carlos III

HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

DATOS BÁSICOS

HOSPITAL/DEPARTAMENTO

ESTUDIO/COHORTE

HISTORIA CLÍNICA/COD.PACIENTE

NUMERO DE MUESTRA

Red Biobancos

COMPROBACION PREVIA A LA EXTRACCION
☐ El paciente está convenientemente informado. Tres copias de Consentimiento Informado: primera copia se guarda en historia clínica; segunda copia se entrega al paciente; tercera copia se entrega al BioBanco
☐ Identidad del paciente comprobada y coincide con la que figura en el Consentimiento Informado

Instituto de Salud Carlos III

MATERIAL ENVIADO			
MUESTRA	☐ SANGRE	☐ LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO	☐ SUERO

INCIDENCIAS DURANTE LA OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

MÉTODO DE ENVÍO Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

A. Sangre. Tubo EDTA-K3 (código de color morado) ☐

B. Sangre. Tubo con ACD (código de color celeste) ☐

C. Sangre. Tubo con Heparina (código de color verde) ☐

D. Sangre. Tubo sin anticoagulante (código de color rojo) ☐

TEMPERATURA DE ENVÍO : ☐ **Ambiente** ☐ **En hielo seco** ☐ **Otras: _____ ºC**

SEXO DEL DONANTE: **Hombre** ☐ **Mujer** ☐	FIRMA DEL PERSONAL DE BIOBANCO QUE PROCESA LA MUESTRA:

Viabilidad (rellenar por BioBanco): _____viales de_____millones de células

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

FECHA Y HORA DE ENVIO, RECEPCIÓN Y PROCESADO

PROCESO	FECHA	HORA
OBTENCIÓN DE LA MUESTRA		
RECEPCIÓN DE LA MUESTRA		
PROCESAMIENTO		

RsTBioH
Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III
Instituto de Salud Carlos III

CARATERÍSTICAS DE LA MUESTRA

☐ ICTERICIA (Anexo I) ☐ HEMÓLISIS (Anexo II) ☐ LIPEMIA (Anexo III)

GRADO DE ICTERICIA	GRADO DE HEMÓLISIS	GRADO DE LIPEMIA
• 1-3 ud de Van Den Bergh • 4-6 ud de Van Den Bergh	• Grado 1 • Grado 2 • Grado 3 • Grado 4	• > 1000 mg/dL • > 300 mg/dL • > 600 nm

INCIDENCIAS DURANTE EL PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Red Biöbancos
Instituto de Salud Carlos III

ANEXO I: GRADO DE ICTERICIA

DETERMINACIÓN VISUAL DE MUESTRAS ICTERICAS

- Plasma/suero no ictérico → 0,5 mg/ 100mL de bilirrubina

↓

1 UNIDAD DE VAN DEN BERGH

- Plasma o suero ictérico → >25 mg/mL de bilirrubina
  Medición a 450 y 575 nm

↓

4-6 UNIDADES DE VAN DEN BERGH

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

ANEXO II: GRADO DE HEMÓLISIS

ESCALA VISUAL PAR EL CÁLCULO DEL GRADO DE HEMÓLISIS

LEVE	MODERADA	ALTA
• **GRADO 1+:** Color rojo tirando a rosa pálido, que permite leer claramente un periódico colocado detrás del tubo de sangre	• **GRADO 2+:** Color rojo tirando a rosa, el periódico ya no puede leerse tan nítidamente • **GRADO 3+:** Color rojo tirando a rosa oscuro	• **GRADO 4+:** Color rojo caoba oscuro, que no permite leer el periódico

RdTBioH
Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III
Instituto de Salud Carlos III

ANEXO III: GRADO DE LIPEMIA

ESCALA VISUAL DEL GRADO DE LIPEMIA

- Sangre total → > 1000 mg/dL (11.3 mmol/L) de triglicéridos
- Plasma o suero → > 300 mg/dL (>3.4 mmol/L) de triglicéridos
  → > 600 nm (v.gr. 660/700 nm)

Red Biöbancos
Instituto de Salud Carlos III

GRUPO DE TRABAJO EN DERIVADOS HEMÁTICOS

Herramientas y parámetros para el control de calidad en un Biobanco

Red Biöbancos

RED NACIONAL DE BIOBANCOS

28 de Septiembre de 2011

Grupo de Trabajo en Derivados Hemáticos

Instituto de Salud Carlos III

ReTBioH

Red Biöbancos
Instituto de Salud Carlos III

GRUPO DE TRABAJO EN DERIVADOS HEMÁTICOS

Herramientas y parámetros para el control de calidad en un Biobanco

CONTROL DE LA CALIDAD:

La consolidación de la calidad es el conjunto de acciones, planificadas y sistemáticas, que son necesarias para proporcionar la confianza adecuada de que un producto o servicio va a satisfacer los requisitos dados. Aunque inicialmente el control de calidad se aplicó solo a la fabricación industrial, rápidamente extendió su radio de acción a la prestación de servicios, donde también podemos incluir el área de salud, especialmente para los laboratorios de análisis clínicos (hematología, bioquímica y microbiología) o los bancos de sangre.

Un elemento fundamental en la filosofía del control de calidad es la utilización generalizada de procedimientos científicos, incluidos los métodos estadísticos, en la planificación, recogida de datos y análisis de los mismos, de tal forma que las decisiones no se sustenten en meras conjeturas.

Red Biobancos

HERRAMIENTAS PREANALÍTICAS

I. HOJA DE CONTROL, DE RECOGIDA DE DATOS O VOLANTE:

- Herramienta manual en la que se clasifican datos e incidencias acontecidos durante la extracción y todo el proceso previo a la llegada de la muestra al biobanco.
- Las informaciones básicas relativas a la calidad que debe recoger la hoja de control son:
  - Consentimiento informado firmado por el donante
  - Fecha de extracción
  - Centro u hospital remitente y responsable del envío
  - Historia clínica
  - N° de identificación de la muestra
  - Estudio al que pertenece el paciente
  - Control / Enfermo
  - Tipo de anticoagulante
  - Temperatura de conservación
  - Incidencias durante su obtención

RaTBioH
Red Biöbancos
Instituto de Salud Carlos III
Instituto de Salud Carlos III

- **HERRAMIENTAS ANALÍTICAS**

II. BASE DE DATOS:

- Herramienta informática que permite registrar toda la información recibida en la etapa preanalítica, así como la derivada del procesamiento.
- Los puntos básicos que han de registrarse como consecuencia del tratamiento de las muestras son:
  - Fecha y hora de procesamiento
  - Características "de visu":
    - Grado de lipemia
    - Grado de ictericia
    - Hemólisis
    - Grado de coagulación
  - Volumen de sangre recibido
  - Responsable de procesamiento
  - Tipos de muestra obtenidos y datos asociados :
    - Nº de alícuotas
    - Millones de CMSPs
    - Volumen
  - Incidencias durante el procesado

Red Biobancos

- **HERRAMIENTAS POSTANALÍTICAS:**

III. ANÁLISIS CUANTITATIVOS:

1. CONTROL DE CALIDAD INTERNO : GRÁFICO DE LEVEY-JENNINGS Y REGLAS MULTIVARIANTES DE WESTGARD

La finalidad de los gráficos de control es monitorizar la variabilidad asociada a cualquier proceso, para controlar su buen funcionamiento y para detectar rápidamente cualquier anomalía respecto al patrón correcto, puesto que alcanzar un estado de control, así como mantenerlo, supone un éxito.

Mediante los gráficos de control este análisis se efectúa de forma visual, para detectar la presencia de un exceso de variabilidad no esperable por puro azar, y probablemente atribuible a alguna causa específica que se podrá investigar y corregir.

Así pues, el control estadístico de la calidad tiene como objetivo monitorizar de forma continua, mediante técnicas estadísticas, la estabilidad del proceso. El interés de los gráficos de control radica en que son fáciles de usar e interpretar, y lo que es más importante: la utilización de criterios estadísticos permite que las decisiones se basen en hechos y no en intuiciones o en apreciaciones subjetivas.

Los gráficos de control representan el estado del proceso que estamos monitorizando a lo largo del tiempo, el más extendido en la práctica habitual es el "*gráfico de Levey-Jennings*", en el cual los resultados de control son expresados en el eje de ordenadas (X) con respecto al tiempo en el eje de abscisas (Y). Además, se incluyen otras dos líneas horizontales: los límites superior e inferior de control, escogidos éstos de tal forma que la probabilidad de que una observación esté fuera de estos límites sea muy baja; si el proceso está en estado de control, es habitualmente inferior a 0,01.

Construcción del gráfico de Levey-Jennings:

- Se toma la muestra y se van anotando los resultados del análisis según la frecuencia temporal deseada (por ejemplo, diaria o semanalmente). Cuando tengamos como mínimo 20 determinaciones se inicia la construcción del gráfico. El "Clinical and Laboratory Standards Institute" establece que, "*Una evaluación inicial puede hacerse con al menos 20 mediciones del material control, para cada nivel, en días separados*".

- Paso 1: Cálculo de la media [x]: La media (o promedio) proporciona la mejor estimación sobre el valor real de la muestra analizada para un nivel específico del control.
- Paso 2: Cálculo de la desviación estándar [s]: La desviación estándar cuantifica la cercanía de los valores numéricos entre cada uno de ellos y es utilizada para evaluar la precisión del sistema de prueba.
- Paso 3: Establecer límites de decisión: Usando la media y la desviación estándar, el laboratorio puede establecer límites de decisión. Estos límites son utilizados para definir qué resultado del control es considerado aceptable. Los límites de decisión son establecidos a ±1s, 2s y 3s de la media.
- Paso 4: Creación de la gráfica Levey-Jennings: Usando la media y un rango de ±3s, se crea una gráfica Levey-Jennings para cada tipo de muestra, que permite al laboratorio monitorizar la calidad de sus procesos.

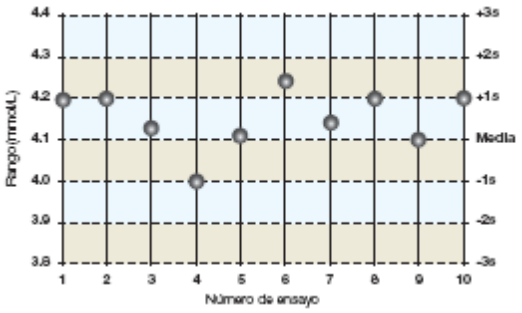


Figura 1: Gráfica de Levey-Jennings

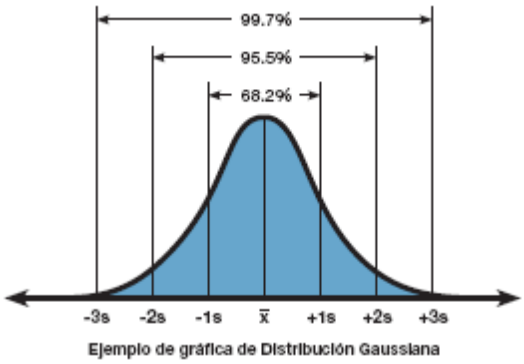


Figura 2: Distribución gaussiana

Red Biobancos

RaTBioH
Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III
Instituto de Salud Carlos III

El fundamento de los gráficos de control se basa en la asunción de la normalidad de los resultados de medida: cuando se lleva a cabo algún proceso de forma sistemática, es decir, bajo las mismas fuentes de influencia o variación, el proceso se verá afectado por errores aleatorios que conducirán a una distribución normal de los resultados. Esta afirmación es una consecuencia del teorema del límite central. Se dirá que el método analítico está bajo control si los resultados obtenidos con este método siguen las características de una distribución normal. Cuando un proceso analítico está en control, los datos registrados formarán una distribución *gaussiana*, donde aproximadamente el 99,7% de los resultados caerán dentro de los límites de ±3s.

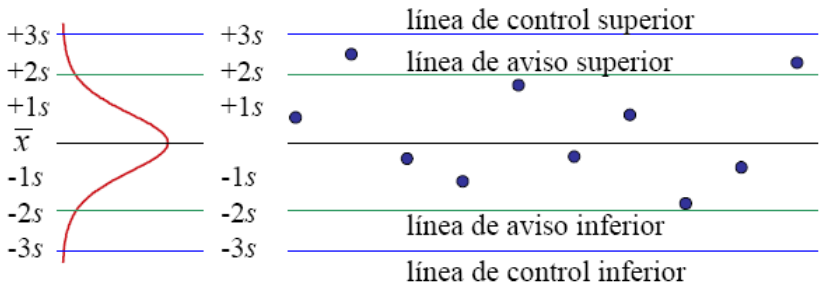


Figura 3: Límites 1S, 2S y 3S en una gráfica de Levey-Jennings

Red Biobancos

Interpretación de los resultados – Reglas multivariables de Westgard:

Los gráficos de control de calidad son una representación visual de las medidas obtenidas y permiten determinar si se está funcionando correctamente, y gracias a la aplicación de una serie de reglas puede analizarse y extraerse información útil y predictiva:

a. Tendencia o deriva: Cuando los resultados, a pesar de estar dentro del rango aceptable, se van alejando del valor objetivo, por lo que los resultados pronto serán incorrectos. Es necesario tomar alguna acción para corregirlo.

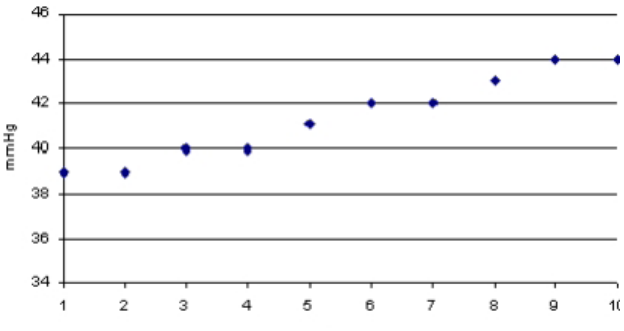


Figura 4: Tendencia de los datos en una gráfica temporal

b. Desplazamiento: Si se observa que, pese a que los valores obtenidos se encuentran en el rango aceptable, hay algo anormal. Los datos se encuentran entre el valor objetivo y el límite superior o inferior.

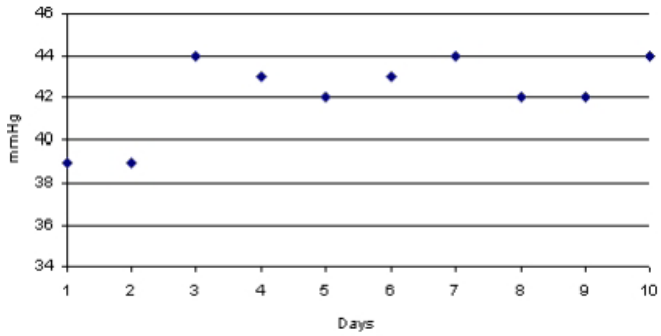


Figura 5: Desplazamiento de los datos en una gráfica temporal

c. Imprecisión: Se puede ver que hay algo que está afectando el correcto funcionamiento ya que la dispersión de los datos es elevada.

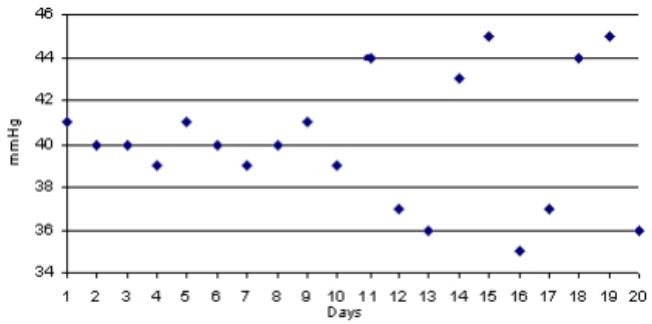


Figura 6: Imprecisión en los datos en una gráfica temporal

Al aplicar las reglas de Westgard se incrementa la probabilidad de detectar errores, este método se basa en principios estadísticos y consta de 6 reglas básicas, en las que existen dos niveles: un nivel de alerta y un nivel de rechazo. Estas reglas pueden ser incluso más restrictivas, alertando para un nivel de probabilidad más bajo, si así lo requiere el proceso que se controla.

Las reglas de Westgard no son más que una adaptación concreta de los razonamientos expuestos al control de calidad para un analizador del laboratorio, aparato en el que diariamente se efectuarán muestras de control de calidad para verificar que está funcionando adecuadamente.

REGLAS DE WESTGARD:

- **A** : 1: 2SD Indica si la muestra evaluada excede el límite de 2 desviaciones estándar
- **B** 1: 3 SD una observación supera la media ± el límite de 3SD
- **C** : 2: 2 SD dos observaciones consecutivas superan la misma media ± 2SD
- **D** : R:4 SD dos observaciones consecutivas se diferencian más de 4SD
- **E** : 4: 1 SD cuatro observaciones superan la media ± 1SD
- **F:** 10: MEDIA diez observaciones caen a un mismo lado de la media.

Las reglas B y D generalmente sugieren un error **aleatori**o.
Las reglas C, E y F suele ser un error **sistemático**.

Las reglas A, C y E son de alerta, o sea que si se viola alguna de estas reglas se debe activar una revisión de los procedimientos, reactivos y calibración de los equipamientos. La B, D y F son reglas restrictivas, si alguna de ellas no se cumple se deben descartar las muestras.

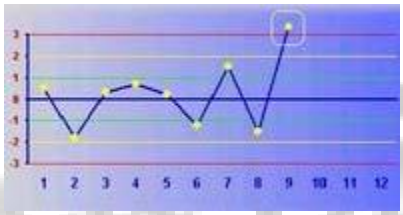


Figura 7: Regla de Westgard A: 1:2sD

Figura 8: Regla de Westgard B: 1:3sD

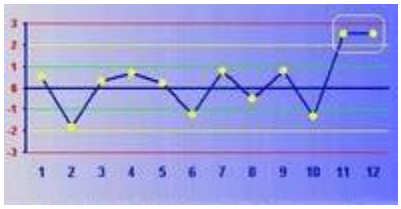


Figura 9: Regla de Westgard C: 2:2sD

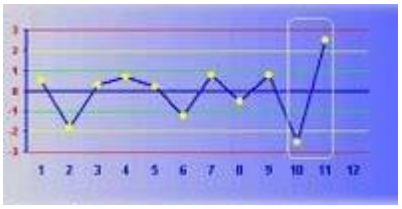


Figura 10: Regla de Westgard D: R: 4sD

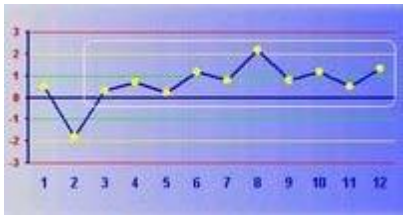


Figura 12: Regla de Westgard F: 10: MEDIA

RETOBANCOS

Parámetros a incluir en el gráfico de Levey-Jennings:

Han de evaluarse qué parámetros pueden medirse sistemáticamente para la construcción de este análisis, que den una idea fiable y directa de la calidad de la muestra almacenada independientemente del estudio o colección. Asimismo, la medición de estos parámetros no debe suponer un coste económico o temporal excesivo que distorsione la operativa diaria del biobanco.

Se sugiere realizarlo en base a medidas tomadas de muestras de suero y plasma, en especial de ésta última, por ser la de mayor abundancia, que con frecuencia excede de la cantidad preservada y es desecha parte de la misma.

Se plantea en la presente reunión un debate sobre los posibles elementos plasmáticos medibles, así como otros factores no plasmáticos que se ajustan al protocolo. En el Anexo I se detalla un listado de los principales componentes del mismo.

2. CONTROL DE CALIDAD EXTERNO E INTERLABORATORIO:

Comparar los resultados de controles de calidad de un biobanco con los de otros laboratorios que utilizan el mismo método (PNTs elaborados por el grupo), puede incrementar la confianza en los resultados de las pruebas y de la calidad del material almacenado. La participación en un programa interlaboratorio que ofrezca comparación por grupo para sus controles de calidad, puede alertar oportunamente de cambios graduales o repentinos. Además, los informes y gráficas proporcionados en un programa bien establecido y que integre a todos los miembros de la Red, pueden facilitar significativamente la tarea de la administración y seguimiento de los datos de calidad.

Por tanto, este estudio permite que los datos obtenidos a través de la participación de cada uno de los biobancos adscritos a la Red Nacional se adapten matemáticamente a un programa externo, con el fin de poder registrarlos en un gráfico de Levey-Jennings de segundo nivel. De esta manera, se alcanza un control global para el grupo, que permite a cada biobanco contrastar la potencia y fiabilidad de su operativa. Así, calculando el I.D.S. (Indice de desviación estándar) para cada una de las determinaciones obtenemos un segundo gráfico de Levey-Jennings, que inluye los límites deseables y el error total, operando a modo de "control de calidad externo" y permite observar a cada miembro de la Red sus posibles fluctuaciones respecto al resto de los miembros.

$$\text{I.D.S.} = \frac{X - \bar{X}}{DS}$$

X = resultado del laboratorio

$\bar{X}$ = resultado promedio del grupo o valor designado

DS = desviación estándar del grupo

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

En los resultados de cualquier laboratorio, dentro de la variabilidad analítica, son dos las incertidumbres que se deben medir : la precisión y la exactitud. La precisión es la reproducibilidad de resultados y se considera como "Error Aleatorio (EA)", impredecible e inherente a toda medición. La exactitud se mide a través del "Error Estandar o Sistemático (ES)" y cuantifica cuánto se alejan los valores en el laboratorio de sus correspondientes valores en la población. De aquí puede conocerse el "Error Total Máximo (ET)": ET: EA + ES

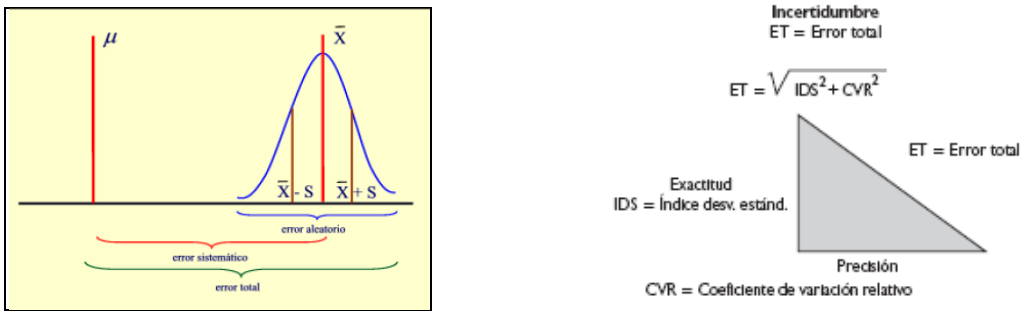


Figura 13: Representación gráfica del ET y determinación del ET conforme al teorema de Pitágoras.

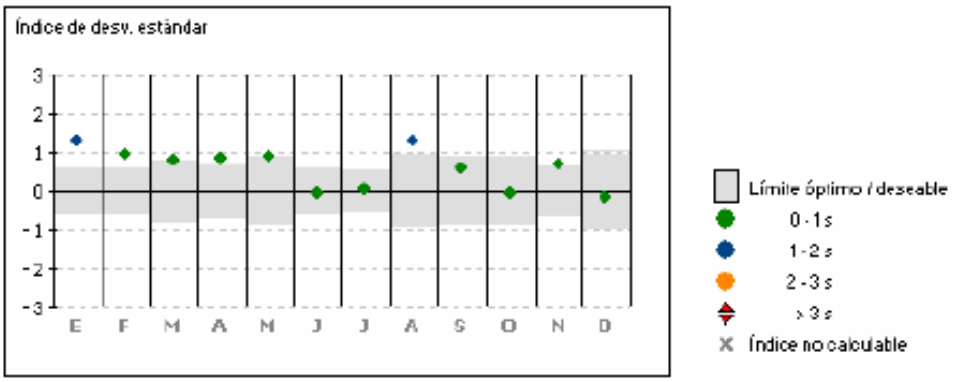
PRECISIÓN: EA : Se cuantifica a través del coeficiente de variación relativo (CVR), el cual se estipula a un nivel de confianza del 95% en el :

$$CVR = 1{,}65CV, \text{ siendo } CV: (DS/x)*100$$

EXACTITUD: ES : Se cuantifica mediante la fórmula : $DS/\sqrt{n}$

$$ET: [\ 1{,}65(DS/x)*100] + DS/\sqrt{n}$$

Este error total muestra el límite deseable, ya sea mínimo u óptimo, que sirve para evaluar la operativa y la calidad de las muestras preservadas en cada laboratorio en referencia al resto de los laboratorios que realizan la misma actividad. En función de estos datos se obtiene una analítica por laboratorio de las siguientes características:



Red Biobancos

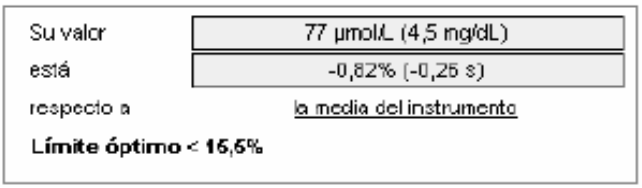


Figura 14: Representación gráfica de los resultados obtenidos a través de un análisis de calidad externo.

Este límite deseable u óptimo obtenido por el ET (área x ± ET) se muestra mediante un sombreado gris. Si la desviación propia del laboratorio se encuentra dentro de los límites, la operativa y calidad de su producto queda asegurada, en caso contrario habrían de revisarse los protocolos y las calibraciones de los equipos. Asimismo, cuando el nº de resultados enviados que presentan un IDS superior a 2 es >33%, se aconseja una revisión general de los protocolos del grupo.

3. RENDIMIENTO DE LA SUPERVIVIENCIA DE CMSPs

Otra medida cuantitativa de la calidad de las muestras puestas a disposición de los investigadores es la medición del rendimiento de supervivencia de las CMSPs. Se efectúan contajes de células viables contrastadas con el valor registrado en la base de datos en el momento de la preservación. El porcentaje de viabilidad nos da una idea de la calidad de la muestra, pudiendo realizarse de varias vías:

- Descongelación de un vial perteneciente a muestras ordinarias de pacientes
- Descongelación de viales pertenecientes a controles, excedentes de buffy coat, o de muestras de animales solicitadas al animalario.
- Feedback del rendimiento obtenido por los investigadores.

Esta medida permite tener una idea objetiva del rendimiento del proceso de criopreservación y de su evolución temporal.

4. RENDIMIENTO DE LA CONGELACIÓN DE MUESTRAS DE ADN

De igual manera que la medición del ratio de supervivencia de CMSPs, se pueden llevar a cabo controles de la degradación del ADN almacenado en el biobanco. Se registra la cantidad (ng/µl) de ADN en el momento de su congelación, y posteriormente (en el orden temporal deseado) se realiza una segunda medición tras la descongelación de la muestra. La diferencia observada se evalúa en forma de porcentaje de preservación o de degradación, según criterio interno.

IV. ANÁLISIS CUALITATIVOS:

1. PROTEINOGRAMA PLASMÁTICO

La técnica más común para separación de proteínas del suero es la electroforesis. El revelado en gel de una muestra plasmática de un individuo sano presenta la siguiente distribución de bandas:

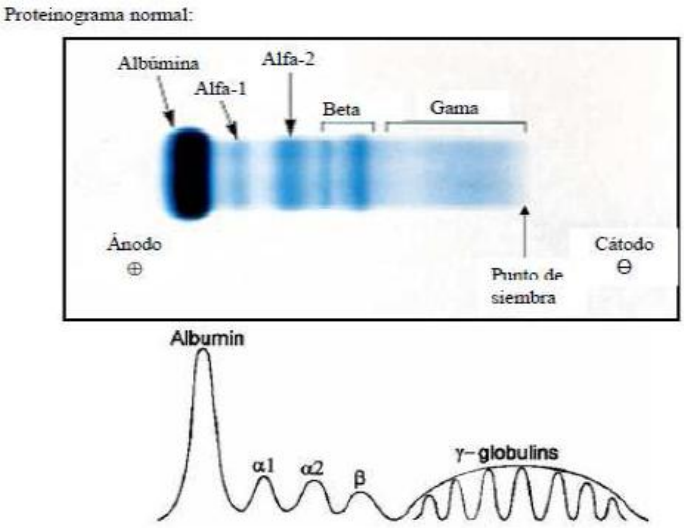


Figura 15: Proteinograma de un plasma control sano

Red Biobancos

Una comparativa visual del proteinograma resultante de la electroforesis de una muestra en dos estadios temporales distintos y tras "n" ciclos de congelación/descongelación, puede mostrar si existen diferencias significativas que indiquen la pérdida de calidad de la muestra. Sin embargo, es muy importante tener en cuenta que este patrón de bandas se ve alterado en función de la patología del donante. Por tanto, ha de estudiarse con especial detalle su comparativa con otras muestras inter/intra colección.

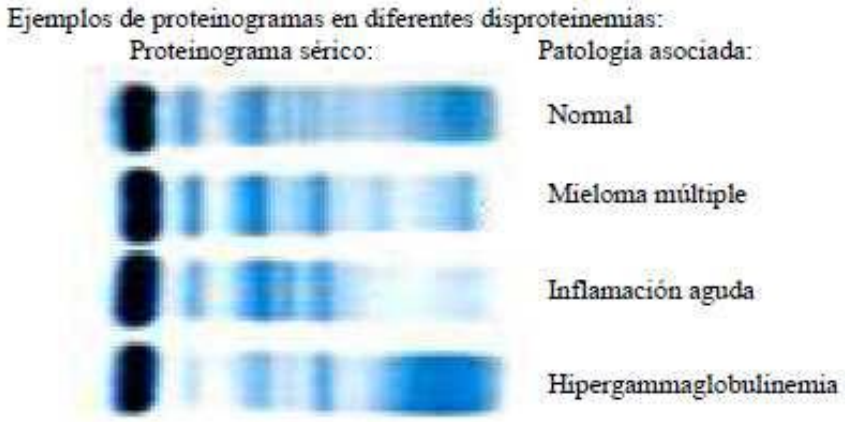


Figura 16: Comparativa de la distribución del patrón de bandas en una electroforesis de plasma en función de la patología del donante

El desarrollo de una biblioteca que alberge una colección de imágenes del proteinograma tipo para cada patología almacenada, puede permitir una consulta rápida en caso de incidencia puntual o como contraste de descarte en una pérdida de trazabilidad.

▪ HERRAMIENTAS DE CALIDAD DEL SERVICIO

V. CUESTIONARIOS DE SATISFACCIÓN DEL CLIENTE:

Otro de los elementos que se pueden emplear para evaluar la calidad de las muestras, y con ello del global del servicio prestado, es la satisfacción del cliente, en este caso del investigador al que se le prestó servicio. Un sencillo cuestionario con una evaluación numérica (por ejemplo, un baremo de 1 a 5) nos aporta una información global externa de la actividad de nuestro biobanco.

Red Biöbancos

ANEXO I: COMPOSICIÓN CUANTITATIVA DEL PLASMA HUMANO

- **CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA PROTEICA TOTAL:** un control sano presenta una concentración media de 7.2 g/100 ml.

- **PRE-ALBÚMINA:** valor normal: 0,3 g/100 ml, incluye a la transtiretrina. Su disminución es un marcador sensible del estado nutricional o reacción inflamatoria.

- **ALBÚMINA:** valor normal: 3,5-5,0 g/100 ml. Es un reactante de fase aguda negativo, por lo que en estados infecciosos agudos está disminuida. Estados asociados con hipoalbuminemia: estados de malnutrición o mala absorción, enfermedad hepática severa (por fallas en su síntesis) o aumento de su catabolismo. No se conoce un estado patológico con hiperalbuminemia.

- **α1-GLOBULINA:** valor normal: 0,1-0,3 g/100 ml. Banda formada principalmente por: α1-antitripsina (mayoritaria), glucoproteína ácida α1 u orososeromucoide, transcortina y globulina fijadora de tirosina.

  - α1-antitripsina:cumple con el 90% de la acción antiproteásica del organismo; es el inhibidor biológico de las enzimas proteolíticas de los lisosomas).
    - aumento de α1-antitripsina: estrés, reactante de fase aguda, tumores;
    - disminución de a1-antitripsina: estados de malnutrición o absorción, enfermedad hepática severa, o aumento de su catabolismo (procesos relacionados con la disminución de cualquier proteína).
  - Glucoproteína ácida a1: inhibe o inactiva a la progesterona, es un reactante de fase aguda positivo.
  - Transcortina: transporta 2/3 del cortisol y otros corticoides. El cortisol circulante se une también (minoritariamente) a la albúmina. La transcortina se sintetiza en el hígado.

  - Proteína fijadora de tiroxina: une T3 (triyodotironina) y T4 (tiroxina). Las hormonas tiroideas circulantes se unen también a la prealbúmina. Tanto la transcortina como la proteína fijadora de tirosina aumentan en el embarazo y tras la administración de estrógenos.

- **α2-GLOBULINA**: Valor normal: 0,5-0,75 g/100 ml. Está integrada por: haptoglobina, a2-macroglobulina y ceruloplasmina.

  - Haptoglobina: su función es captar hemoglobina (Hb): Es un reactante de fase aguda positivo, (aumenta en estados infecciosos agudos).Su disminución se asocia a cualquier estado patológico que curse con hemólisis intravascular debido a un aumento de su consumo (anemia hemolítica, etc.).

Red Biobancos

- α2-macroglobulina: está aumentada fisiológicamente en el embarazo y en niños (dada su función relacionada con el desarrollo).
- Ceruloplasmina: participa en el metabolismo del hierro y el Cu++, ya que una molécula puede fijar hasta 8 átomos de Cu++, es un reactante de fase aguda positivo, y aumenta en tumores y leucemias. La deficiencia congénita de ceruloplasmina desarrolla la enfermedad de Wilson.

- **β-GLOBULINAS**: valor normal: 0,6-1,1 g/100 ml. Consta de β1-globulina: incluye a la transferrina y la hemopexina; y β2-globulina: incluye a C3

  - Transferrina: Es una proteína que fija Fe (cada molécula puede fijar 2 Fe). En procesos con déficit de Fe (por estimulación de la síntesis de su proteína transportadora) aumenta sus niveles, al igual que en el embarazo;
  - Hemopexina: Fija y transporta al grupo hemo liberado de la Hb en la hemólisis
  - C3: Participa del sistema del complemento. Es un reactante de fase aguda positivo y disminuye en enfermedades autoinmunes (LES, AR).

- **γ-GLOBULINAS**: Es una banda homogénea que corresponde al fibrinógeno (0,3 g/100 ml). Está constituido mayoritariamente por inmunoglobulinas. Incluye:

  - IgG: monómero de 160 kDa, se reconocen 4 subclases, es la mayoritaria, puede atravesar la placenta y es la principal inmunoglobulina en la respuesta inmune secundaria;
  - IgA: se puede encontrar como monómero, dímero o trímero, media la inmunidad de mucosas;
  - IgM: es una inmunoglobulina pentamérica, asimétrica, de PM hasta 1000 kDa, no atraviesa la placenta y es la inmunoglobulina que media la respuesta inmune primaria;
  - IgD: es una inmunoglobulina de superficie, neutralizante, con PM de 200 kDa;
  - IgE: tiene un PM promedio de 200 kDa, está asociada a estados de alergia.

Red Biobancos

Red Biobancos
Instituto de Salud Carlos III

ANEXO II: RECOMENDACIÓN DE PARÁMETROS A EVALUAR EN FUNCIÓN DEL ESTUDIO

- Estudios peptídicos: emplear preferiblemente plasma (con/sin plaquetas), antes que suero.

- Proteínas de 1-15kD son las más variables entre plasma y suero, y aproximadamente el 40% de ellas solo son detectables en suero y no en plasma.

- Cambios en la actividad enzimática y la estabilidad de las proteínas plasmáticas:

    - Lactado deshidrogenasa LDH, aspartato amino transferasa AST, y lipasa. Decrece su presencia a partir de los 2 meses si se mantienen a temperatura ambiente.

    - Cambios en la actividad enzimática y la estabilidad de las proteínas: alanino amino transferasa ALT y amilasa, sufren cambios tanto a -20ºC como a tº ambiente.

    - Fosfatasa alcalina, decrece a -20ºc pero no se ve alterada a tº ambiente.

    - LDL y HDL del colesterol, muestran aumento de concentración en períodos largos de almacenamiento a tº ambiente.

- El suero contiene péptidos muy concentrados e intensas señales peptídicas, lo que dificulta la detección de péptidos "intramoleculares", por lo que debe evitarse este tipo de muestra para estudios de búsqueda de mono/oligo -biomarcadores (detección temprana de cáncer)

- EDTA: es un ácido poliaminocarboxílico y esta cargado negativamente, forma complejos solubles con iones metálicos. Si los estudios que se van a llevar a cabo con muestras tratadas con EDTA incluyen ensayos con cationes divalentes, como Mg^{2+} o Ca^{2+} se desaconseja como coagulante. Ejemplo: medición de iones libres, procesos en los que actúan como cofactores, o intermediarios de reacción...

- HEPARINA: es una glicosaminoglucano sulfatado, una molécula muy cargada y su presencia en una solución puede competir o prevenir la unión de ciertas moléculas a superficies cargadas. Esto interfiere en pasos importantes de la adsorción de proteínas a chips. Puede interferir en ciertos procesos de afinidad (ej.: análisis SELDI-TOF)

Red Biobancos

- CITRATO: puede unirse al calcio y se ha descrito que puede causar falsas disminuciones en las lecturas de medidas de inmunoensayos.

- El 14% de los péptidos plasmáticos son derivados de las plaquetas activadas antes de su eliminación, por lo que pueden causar futuras proteólisis de proteínas plasmáticas, se aconseja la desplaquetación (PNT: centrifugación+filtración) antes de la congelación y evitar su activación todo lo máximo posible.

- El plasma pobre en plaquetas es la muestra ideal para estudios de proteomica (biomarcadores de detección temprana de enfermedades). Además, para este tipo de estudios se aconseja el empleo de glicerol o aditivos similares para preservar la estabilidad de las proteínas plasmáticas.

- IgG y Albúmina forman agregados de isoformas de mayor tamaño cuando se emplean inhibidores de proteasas (EDTA y heparina).

- La sangre venosa es la más usada comúnmente, si bien la extracción de sangre arterial también puede ser interesante en estudios que deseen estudiar la secreción diferencial de biomarcadores a través de un tumor (diferencias entrada-salida de sangre a través del tejido tumoral)

- Se alcanzan óptimos con 30-60 minutos de tiempo de coagulación a temperatura ambiente para muestras de suero, y se aconseja para el resto de muestras el procesado lo más rápido posible tras la extracción. Ejemplo: factor de crecimiento endotelial (factor que se encuentra almacenado en plaquetas y/o granulocitos y que se exocita y se hace circulante cuando las plaquetas son activadas ex vivo).

- Evitar ciclos de congelación-descongelación. Si son a tiempos cortos y controlados (20 días) no se encuentran diferencias significativas.

- Para estudios metabolómicos, el tiempo máximo de procesamiento es t=36h, aconsejándose no superar las 24h.

- La glucosa en plasma obtenido de sangre+EDTA no ve alterada su medida hasta, al menos, 36h.

- En estudios de transcriptoma no se aconseja el uso de muestras de plasma y/o suero.

Red Biobancos

- **ANEXO III: COMPOSICIÓN DEL PLASMA CONTROL DE REFERENCIA**

La composición de referencia para el plasma sanguíneo humano elaborada por el Grupo de Plasma del IFCC (International Federation of Clinical Chemistry), es:

Table 5. List of proteins with certified concentrations for CRM 470 and Dade Behring's N Protein Standard SL (Lot #083629)

Protein	Concentrations [g/L]	
	CRM 470[a]	Dade Behring N Protein Standard SL Lot No. 083629[b]
Total protein		72.8[c]
Albumin	39.7	47.80[d]
IgG	9.68	9.33[d]
IgG 1		6.06[e]
Transferrin	2.45	2.95[d]
IgG 2		2.75[e]
Ig/L chain type kappa		2.24[b]
IgA	1.96	1.85[d]
Alpha-2-macroglobulin	1.64	1.60[d]
Alpha-1-antitrypsin (alpha-1-proteinase-inhibitor)	1.206	1.57[d]
Haptoglobin	0.893	1.41[d]
Complement 3c	1.091	1.40[d]
Ig/L chain type lambda		1.23[b]
Hemopexin		0.943[f]
Alpha-1-acid glycoprotein (orosomucoid)	0.656	0.889[d]
IgM	0.797	0.735[d]
IgG 4		0.553[e]
IgG 3		0.368[e]
Prealbumin (transthyretin)	0.243	0.314[d]
Ceruloplasmin	0.205	0.31[d]
Alpha-1-antichymotrypsin	0.245	
Complement 4	0.151	0.241[d]
Retinol-binding protein		0.045[f]
C-reactive protein	0.0392	
Beta-2-microglobulin		0.0013[f]
Soluble transferrin receptor		0.0012[f]
Ferritin		0.000348[g]
IgE		568 IU/mL[h]

a) Whicher, J. T. [36]
b) Dade Behring N Protein Standard SL, product data sheet
c) Measurement by TCA method-Dade Behring BN
d) IFCC/BCR/CAP (International Federation of Clinical Chemistry/ Community Bureau of Reference/College of American Pathology)- CRM 470 – RPPHS (Reference Preparations for Proteins in Human Serum) Lot 5
e) WHO (World Health Organization) 67/97
f) Based on highly purified protein hemopexin (Lot No. 070792/ IA), retinol binding protein (Lot No. 100990/IA), β2-microglobulin (Lot No. 111093/IA), soluble transferrin receptor (Lot No. 97.2)
g) SRPWHO 80/578
h) IRP (International Reference Preparation) Code 75/502

Figura 17: Composición cuantitativa de las proteínas plasmáticas de referencia para un control sano según IFCC. HUPO Plasma Proteome Projet specimen collection and handling: Towards the standarization of parameters for plasma proteome samples. Alex J.Rai, Craig A.Gelfand.Proteomics 2005,5,3262-3277.

Red cos