



Red Biobancos

Instituto de Salud Carlos III

Red Nacional
de Biobancos

Spanish National
Biobank Network

PNT LCR

Grupo de Trabajo en Banco de Cerebros

REVISIÓN	REALIZADO	FECHA	APROBADO	FECHA	ENTRADA EN VIGOR
01	Grupo de Derivados Hemáticos	20/02/2012	Dirección		—
Modificaciones:					

Madrid 2012

Obtención, Procesado Y Almacenaje de Muestras de Líquido Cefalorraquídeo extraído mediante Punción Lumbar

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

M^a Ángeles Muñoz

Coordinadora del

Grupo de Trabajo

Manuel M Morent.

Coordinador de la Red

Nacional de Biobancos - ISCIII

Red Nacional de Biobancos - ISCIII

www.redbiobancos.es

AUTORES.

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

Maribel García Sánchez, Hospital Virgen Macarena

Lina Mayorga, Hospital Carlos Haya

Tatiana Díaz, Hospital Carlos Haya

Inmaculada Martín, Hospital Carlos Haya

Pilar Giraldo Castellanos, Hospital Miguel Servet

Fernando Civeira Murillo, Hospital Miguel Servet

Miguel Pocoví Mieras, Hospital Miguel Servet

Pablo Isidro Marrón, Hospital Central de Asturias

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

Inés Santiuste, Hospital Marqués de Valdecilla

José Manuel González de Buitrago, Hospital Universitario de Salamanca

Eduarne Pedrosa, Fundación Instituto de Investigación Germán Trías i Pujol

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

Gerard Pardo, Hospital Dr. Josep Trueta

Beatriz Bellosillo, Hospital del Mar

Luis Gallart Millán, Hospital Joan XXIII

Anna Bosch, Hospital Clínico y Provincial de Barcelona - IDIBAPS

Nieves Doménech García, Complejo Hospitalario Universitario de La Coruña

M^a Ángeles Muñoz Fernández, Hospital Gregorio Marañón

Almudena García Torres, Hospital Gregorio Marañón

Irene Consuegra, Hospital Gregorio Marañón

Rosario Martínez Marín, Hospital Virgen de La Arrixaca

M^a Antonia Fortuño Cebamanos, Clínica Universidad de Navarra

Isabel Gil Aldea, Hospital de Navarra

Inés Aroca Siendones, Hospital Universitario San Cecilio, Granada,

Clara Rodríguez, BioBanco Vasco/Centro Vasco de Transfusiones

Coordinador:

M^a Ángeles Muñoz, Hospital Gregorio Marañón

ÍNDICE

1.	ABREVIATURAS.....	9
2.	DEFINICIONES.....	9
3.	OBJETO.....	9
4.	ALCANCE.....	9
5.	MATERIALES Y SERVICIOS.....	10
6.	DESARROLLO.....	11
6.1.	CONSIDERACIONES PREVIAS.....	11
6.2.	EXTRACCIÓN DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO.....	11
6.3.	RECEPCIÓN DE LA MUESTRA EN EL LABORATORIO.....	12
6.4.	PROCESAMIENTO DEL LCR Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	12
7.	DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA.....	14
8.	DOCUMENTACIÓN RELACIONADA.....	14

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.

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)

- Para muestras no infecciosas: Bolsa o contenedor de transporte interno en el centro hospitalario.
- Para muestras infecciosas o peligrosas : Contenedor de transporte de sustancias peligrosas que cumpla con la legislación vigente: Real Decreto 664/97, siguiendo la "Instrucción de embalaje 620 (IATA – OACI 602)"
- Jeringuillas y/o material necesario para la extracción del 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 criolmacenaje
- -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 -80°C con sistema de registro de temperatura, sistema de mantenimiento de temperatura en caso de corte de corriente eléctrica (inyección de CO2, sistema de administración de energía (SAE) interno, sistema electrógeno) y sistema de alarma telefónica
- Software de gestión de muestras aplicable a cada centro (Ejemplos: aplicación BBUN (Maxwell), aplicación Bio-e Bank, etc...)

6. DESARROLLO

6.1. CONSIDERACIONES PREVIAS

- 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 conteo 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/ μ l.
- 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.
- 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.

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 4°C en nevera y 22 °C (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 -80°C 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 conteo celular)
- Anomalía visual del LCR (un LCR normal es claro como el agua de roca).
- 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 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 -80°C o bien se añade el tampón adecuado para el procesamiento que posteriormente se desea hacer y se congelan a -80°C . El número de células se calcula en función del volumen de muestra almacenada en el biobanco, teniendo en cuenta el conteo 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 -80°C .
- 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).
-

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 Handling 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 Nacional de Biobancos

Spanish National
Biobank Network



Red Biobancos

Instituto de Salud Carlos III