

---

# MANUAL DE TOMA DE MUESTRAS LORGEN

---



Objetivo .....	3
Muestras de sangre periférica para estudios de ADN .....	4
Muestras de sangre periférica para estudios de ARN.....	4
Muestras de sangre seca en papel (FTA) .....	4
Muestras de células epiteliales bucales (saliva).....	5
Muestras de tejido fijado en formol parafinado (FFPE).....	6
Muestras de tejido fresco o congelado (FF).....	6
Muestras de médula ósea .....	6
Muestras de tejido procedente de biopsia .....	7
Muestras para estudios prenatales:.....	7
Sangre periférica materna para estudio del sexo fetal:.....	7
Sangre periférica materna para estudio de prenatal no invasivo (NIPT) de aneuploidías en autosomas y cromosomas sexuales (Previgen 6 y Previgen 24):.....	8
Líquido amniótico.....	9
Vellosoidad Corial.....	10

## Objetivo

La principal misión de Lorgen como laboratorio de análisis genéticos es proporcionar servicios de la máxima calidad en cuanto a resultados de laboratorio con el objeto de satisfacer las necesidades de nuestros usuarios clínicos y pacientes y contribuir a la promoción, prevención, curación y rehabilitación de la salud de las personas. De manera general, el proceso total de análisis de las pruebas genéticas consta de tres etapas; pre-analítica, analítica y post-analítica. Todas muy importantes para proporcionar un producto de calidad, confiable y oportuno, por lo que es primordial estandarizar y actualizar los procedimientos, que aseguren la calidad y trazabilidad de los exámenes. Adjuntamos un manual de obtención de muestras que describe los procedimientos de la **fase pre-analítica de los exámenes**, para la obtención de muestras o especímenes de los pacientes que cumplan con las condiciones técnicas y administrativas necesarias para su posterior procesamiento, incluyendo una adecuada conservación y transporte de ellas al laboratorio. La organización de este manual permite ser una herramienta práctica de apoyo para todo el personal clínico que realiza la solicitud de los exámenes, la extracción de muestras de sangre y/u otros especímenes, incluyendo los requisitos específicos para algunos de ellos. También, es aplicable, al personal que entrega información y/o material para la toma de algunas muestras a los pacientes y al personal que transporta muestras al laboratorio. **Si alguna toma de muestra fuera de especial complejidad, Lorgen GP dará soporte telefónico y aportará el material necesario para dicha obtención.**

### Muestras de sangre periférica para estudios de ADN

La sangre total es la muestra más utilizada para la mayoría de las pruebas.

**Volumen de muestra:** - Extraiga 5 ml de sangre periférica en un tubo con anticoagulante (EDTA) e invertir varias veces para asegurar la homogenización con el anticoagulante.

**Conservación:** Si la muestra va a ser remitida al laboratorio dentro de las 24 horas tras la extracción puede mantenerse a temperatura ambiente, pero si no es así es importante conservarla a 4°C.

**Nota: en ningún caso debe congelarse la muestra.**

### Muestras de sangre periférica para estudios de ARN

**Volumen de muestra:** 2.5 ml de sangre periférica en tubo de ARN sanguíneo PAXgene (proporcionado por Logen) e invertir varias veces suavemente para asegurar la homogenización. Adicionalmente extraiga 5 ml de sangre periférica en un tubo con anticoagulante (EDTA) e invertir varias veces para asegurar la homogenización con el anticoagulante (esta muestra se utilizará para confirmar los resultados del análisis de ARN).

**Conservación:** Si la muestra va a ser remitida al laboratorio dentro de las 24 horas tras la extracción (es lo aconsejable) puede mantenerse a temperatura ambiente, pero si no es así es importante conservarla a 4°C.

**Nota: en ningún caso debe congelarse la muestra.**

### Muestras de sangre seca en papel (FTA)

Para facilitar el transporte, conservación y el análisis de aquellas pruebas que se realizan a partir de sangre total hemos optimizado nuestros análisis para que puedan ser realizados a partir de sangre depositada en papel FTA (proporcionado por Lorgen). Los pasos a seguir para depositar la sangre en este soporte son los siguientes:

- Con una aguja o lanceta (o con algún kit estandarizado para este tipo de toma) se pincha la cara anterior del dedo pulgar (masajeando previamente y limpiando bien la zona con un algodón impregnado en etanol).

- Directamente sobre el papel FTA se depositan las gotas de sangre hasta conseguir que el círculo de color negro impreso en el papel quede impregnado.

**Conservación:** Dejar secar la mancha y conservar a temperatura ambiente hasta su envío al laboratorio. En este caso y una vez seca la muestra puede conservarse de manera indefinida a temperatura ambiente.

**Nota: Si se dispone de sangre del paciente en tubo con anticoagulante, depositar 200 µl de la misma sobre el papel y dejar secar.**

Siempre que sea posible, empaquetar las muestras en bolsas de papel o cajas de cartón evitando utilizar plástico.



#### Muestras de células epiteliales bucales (saliva).

- No será necesario el ayuno por parte del paciente. Los pasos para seguir para la obtención de las muestras epiteliales bucales deben ser los siguientes: El individuo se enjuagará la boca con agua antes de la toma de muestra. Abrir el hisopo justo en el momento de la toma de la muestra y manipularlo solamente por el mango, sin tocar la parte del algodón.
- Se obtendrán frotando la parte interna de los carrillos con hisopos de algodón estériles en seco.
- Se realizan dos tomas: Con un hisopo se frota la cara interna del carrillo derecho (unas 10 veces con movimientos circulares) y con el otro, la cara interna del carrillo izquierdo (unas 10 veces con movimientos circulares).
- Los hisopos, correctamente identificados, deben dejarse secar a temperatura ambiente en un lugar protegido. No se introducirán en las fundas hasta que no estén totalmente secos, ya que en la saliva hay bacterias que proliferan rápidamente con la humedad, produciendo la degradación del ADN.

**Conservación:** Empaquetar las muestras y conservar a temperatura ambiente hasta el servicio de recogida por parte de Lorgen.



### Muestras de tejido fijado en formol parafinado (FFPE).

Existen diferentes opciones de tipos de tipos de muestras recomendados para este tipo de material biológico:

- Biopsia de tejido en bloque de parafina.
- 8-10 cortes de 10  $\mu\text{m}$  de espesor del bloque de parafina en portaobjetos. En este caso es muy importante preparar uno de los portaobjetos mediante tinción con eosina-hematoxilina y delimitar y marcar la zona tumoral de la muestra.
- Cortes de 10  $\mu\text{m}$  de espesor del bloque de parafina en tubo tipo Eppendorf.
- ADN extraído a partir de la muestra tumoral cuantificado mediante Qubit o similar (Mínimo recomendado: 200ng de ADN total con una concentración superior a 5 ng/ $\mu\text{l}$ ; DIN > 3).

Es necesario tener una estimación de la celularidad de la muestra tumoral en cualquiera de los tres últimos casos (% de células tumorales frente al total de la muestra).

### Muestras de tejido fresco o congelado (FF).

- Enviar 20 mg de tejido tumoral, obtenido directamente a partir de la pieza quirúrgica, a partir de varias tomas de muestra procedente de biopsia por aspiración con aguja fina, etc.. Es necesario tener una estimación del porcentaje de tejido tumoral frente al total de la muestra tumoral.
- Las muestras se enviarán refrigeradas, debidamente identificadas y protegidas para evitar roturas del tubo o grandes variaciones de temperatura.
- Notas: en caso de envío de muestras de ADN extraído a partir de la muestra tumoral se recomienda el envío de ADN refrigerado. En este caso la concentración de ADN mínima recomendada es de 200 ng de ADN total con una concentración superior a 5 ng/ $\mu\text{l}$ .

### Muestras de médula ósea

La aspiración de médula ósea de la cresta ilíaca anterior o posterior se realiza de la siguiente manera:

- Se necesitarán 2 ml del aspirado en tubo con EDTA, hay que preparar previamente al menos un tubo para llenarlo con el aspirado, para el análisis de ADN. (Para cariotipo preparar un tubo estéril de tapón de rosca con 10 ml de medio RPMI-1640, si no disponen de este medio llamar a Lorgen 2 días antes de la toma de muestra para que procedamos al envío de este). Añadir de 2 a 5 ml de aspirado de médula. Añadir a ese mismo tubo heparina sódica, 0.1 ml de heparina por cada ml de aspirado. Cerrar el tubo e invertir varias veces para mezclar bien.
- La muestra debidamente rotulada se mantendrá a 4°C hasta la recogida por parte del servicio de mensajería de Lorgen.

### Muestras de tejido procedente de biopsia

Se necesitan unos 100-200 mg de tejido, y si este va a pasar más de 24 horas fuera de nuestro laboratorio se deberá incluir en parafina o congelarlo, aunque siempre será preferible tejido fresco. Se retira la muestra obtenida y se deposita en el recipiente o frasco estéril para su envío a Lorgen.

Si el tejido ha sido congelado deberá enviarse en un contenedor adecuado con hielo seco a algún gel refrigerante. Las muestras en las que sea necesario el análisis de ARN se congelarán inmediatamente con Nitrógeno líquido y han de llegar al laboratorio en este mismo medio.

Una vez terminada la extracción, se retira todo el material, colocando cada uno en el contenedor correspondiente.

Empaquetar cada muestra por separado. Siempre que sea posible, empaquetar las muestras en bolsas de papel o cajas de cartón evitando utilizar plástico. Una vez terminada la recogida de muestras, tirar todo el material desechable utilizado (guantes, pipetas, papeles...) en bolsas de basura o contenedores para residuos biológicos, para eliminarlo posteriormente según las normas de destrucción de residuos biológicos. Estas mismas normas van a evitar que la propia muestra sea contaminada por parte del técnico con células procedentes del mismo que podrían conducir a un resultado erróneo.

### Muestras para estudios prenatales:

#### Sangre periférica materna para estudio del sexo fetal:

Con el fin de asegurar la máxima garantía y fiabilidad de resultados en la prueba de Determinación del Sexo Fetal, les remitimos una serie de **recomendaciones en la toma de muestra de sangre de las embarazadas:**

- La persona que realice la extracción de sangre debe utilizar guantes estériles y ser preferiblemente de sexo femenino. En caso de no ser posible eviten el manipular los

tubos sin guantes ya que la contaminación con células de origen masculino podría originar un resultado falso positivo.

- Todo el material a utilizar en la extracción debe ser estéril, se recomienda el uso de los tubos con anticoagulante **Citrato Sódico**.
- Para la realización del estudio se requiere un mínimo de **4 mL** de sangre total repartidos en diferentes tubos (mínimo 2), de venir menos cantidad no se podrá realizar ninguna confirmación y se emitirá el informe con “resultado inconcluyente”.
- Mantener la muestra de sangre a temperatura ambiente o a 4°C, pero **nunca congelar**.
- Enviar el mismo día que se realiza la extracción a Lorgen a temperatura ambiente. **No emplear ni placas ni bolsas de hielo para el transporte**. Evitar realizar extracciones los viernes o días anteriores a festivos ya que es muy importante que las muestras nos lleguen en un plazo máximo de 24 horas desde su extracción.
- Remitir junto a la muestra la hoja de consentimiento informado cumplimentado con los datos de la paciente y firmado por esta en el recuadro que aparecen en el segundo folio del mismo.

#### **Notas:**

- No es necesario acudir a la extracción en ayunas.
- Tardará un día en llegarnos su muestra, por lo que recomendamos que la extracción la realice de lunes a jueves, para que no permanezca el fin de semana en la agencia de transportes.
- Una vez nos llegue, y si no hay ningún problema con su muestra de sangre, le daremos el resultado al laboratorio antes de las 48 horas siguientes.
- Si la paciente quiere el informe por correo electrónico debe incluirse el mail en el consentimiento informado que la paciente firma (así nosotros tendremos la conformidad de que el laboratorio nos permite enviárselo a la paciente).

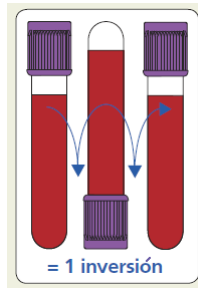
#### **Sangre periférica materna para estudio de prenatal no invasivo (NIPT) de aneuploidías en autosomas y cromosomas sexuales (Previgen 6 y Previgen 24):**

Con el fin de asegurar la máxima garantía y fiabilidad de resultados en las pruebas **PREVIGEN 6 y PREVIGEN 24**, les remitimos una serie de **recomendaciones en la toma de muestra de sangre de las embarazadas**:

- La persona que realice la extracción de sangre debe utilizar guantes estériles y ser preferiblemente de sexo femenino. En caso de no ser posible eviten manipular los tubos sin guantes ya que la contaminación con células de origen masculino podría influir involuntariamente en el resultado.



- Todo el material para utilizar en la extracción debe ser estéril, utilice el tubo facilitado por Lorgen para la recogida de la muestra.
- Identifique el tubo con la tercera etiqueta con código de barras proporcionada, colocándola longitudinalmente de forma que quede un espacio libre que permita ver el volumen
- Indique nombre y fecha de nacimiento de la paciente en el tubo
- Extraiga entre 7-10 mL de sangre y mezcle **EL CONTENIDO INMEDIATAMENTE INVIRTIÉNDOLO SUAVEMENTE DE 8-10 VECES.**



**Notas:**

- **UNA VEZ TOMADA LA MUESTRA NO CONGELAR O REFRIGERAR EL TUBO. GUARDAR A TEMPERATURA AMBIENTE.**
- Coloque el tubo en el sobre de burbujas. Doble y sitúe el consentimiento informado previamente firmado con el resto de elementos.
- Envuelva la muestra con el Gel Pack a temperatura ambiente y colóquelo en la caja de cartón para su envío.
- Introduzca la caja con la muestra en una bolsa de envío y solicite la recogida. Incluya los documentos firmados con la muestra (Formulario de Solicitud y Consentimiento Informado).
- La muestra debe llegar al laboratorio antes de los 5 días posteriores a la extracción.
- Mantener SIEMPRE a temperatura ambiente

**Líquido amniótico**

- Se tomarán al menos 2 ml de líquido en un tubo estéril tapado herméticamente, y protegiéndolo de la luz. En lo posible, la muestra no debe estar contaminada con sangre ni meconio, con lo que se rechazarán los primeros 2 ml de aspirado para asegurar la mínima contaminación por parte de células maternas.
- Con el fin de descartar posible contaminación por células de origen materno se recomienda el envío de 3 ml de sangre periférica materna en tubo EDTA.

- Las muestras deben enviarse de inmediato al laboratorio protegidas de la luz en una gradilla para tubos, debidamente identificada y en recipiente proporcionado por Lorgen junto a la documentación de la muestra.

**Notas:**

- Es importante señalar que la intervención para la obtención de células fetales, bien por biopsia corial o por amniocentesis, conlleva un pequeño riesgo de aborto espontáneo, por debajo del 0,5%. De los dos procedimientos, el más seguro es el de la amniocentesis. Para minimizar riesgos es fundamental que la madre gestante permanezca 2 días en reposo absoluto después de la intervención.

**Vellosidad Corial.**

Es una técnica invasiva prenatal que se realiza entre las 11 y 13 semanas de gestación para obtener información genética relacionada con el feto, a fin de diagnosticar el cariotipo, sexo, trastornos metabólicos y la presencia de infecciones intrauterinas por agentes como la rubéola, citomegalovirus, *Toxoplasma gondii* y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1).

- Una vez extraída la muestra de vellosidades mediante Biopsia de Vellosidad Corial (BVC), se coloca en el tubo que contenga EDTA.
- La muestra debe evaluarse macroscópicamente, utilizando la fuente de luz y realizando un movimiento de agitación suave del contenedor, para confirmar que la cantidad y la calidad sean adecuadas. Las vellosidades coriales son blanquecinas y de aspecto coraliforme. La decidua tiene un aspecto de piel de color rojizo oscuro y normalmente flota en el medio de transporte.
- Las muestras deben enviarse de inmediato al laboratorio protegidas de la luz en una gradilla para tubos, debidamente identificada y en recipiente proporcionado por Lorgen junto a la documentación de la muestra.

**Notas:**

- Es importante señalar que la intervención para la obtención de células fetales, bien por biopsia corial o por amniocentesis, conlleva un pequeño riesgo de aborto espontáneo, por debajo del 0,5%. De los dos procedimientos, el más seguro es el de la amniocentesis. Para minimizar riesgos es fundamental que la madre gestante permanezca 2 días en reposo absoluto después de la intervención.
- En caso de requerir una segunda muestra, se repiten los mismos pasos, procurando seleccionar una zona corial mejor.

- En condiciones normales deben realizarse un máximo de 2 introducciones por sesión y si es necesario se programará una segunda sesión una semana más tarde. Es muy importante tener in mente la indicación del procedimiento, especialmente el riesgo de la anomalía cromosómica/genética a diagnosticar, así como la historia reproductiva materna y la opinión de la pareja. En casos de muy alto riesgo, puede forzarse una tercera introducción. Por el contrario, debemos desistir de tomar una nueva muestra en caso de que el motivo sea la angustia materna o riesgos no excesivamente altos.
- La muestra debe conservarse a 4°C hasta su envío a Lorgen.

#### **CRITERIOS PARA EL RECHAZO DE MUESTRAS:**

Las muestras serán inspeccionadas a su llegada para comprobar su adecuación a los requisitos especificados en este documento.

En caso de evidenciarse alguna anomalía, Lorgen contactará con el hospital para para corregir las deficiencias de información o bien para descartar la muestra y solicitar una nueva.

Las causas más comunes de rechazo de muestras son las siguientes:

- Paciente sin identificar (Nombre/ Nº de Identificación)
- Muestra inapropiada para el estudio requerido.
- Día y hora de extracción de muestra no especificada.
- Origen de la muestra sin especificar.
- Volante de petición ilegible o incorrectamente cumplimentado.
- Muestras no enviadas en las condiciones requeridas.
- Rotura de tubos / contenedores.
- Contaminación externa evidente.
- Sangre periférica coagulada.
- Volumen insuficiente. Si no hay suficiente para la realización del número total de muestras solicitadas, se pedirá al clínico que especifique la prioridad de las mismas.