



Procesamiento de muestras a incorporar en la colección de referencia genómica mexicana (MGDC)

Creado el: 17 de Enero, 2013; Última modificación: 19 de Marzo, 2019, Versión: 4.0

Este documento describe a los diversos procedimientos que aplican para la recolección, transporte, procesamiento y criopreservación de muestras de sangre entera humana destinadas a formar parte de la Colección de Referencia Mexicana.

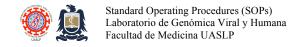
Previamente

- 1. Coloque cinco paquetes de gel congelados a -20°C en una hielera para el transporte de muestras al igual que tres gradillas para tubos vacutainer de 6 ml (permitirá recabar un total de 300 tubos).
- 2. Rotule una caja de cartón de 9x9 con el título "plasmas Caja 1".
- 3. Rotule la hielera de transporte de muestras con el siguiente lema: "MATERIAL BIOLOGICO PELIGROSO, NO ABRIR! En caso de accidente favor de notificar inmediatamente al: Dr. Christian García, Laboratorio de Genómica Viral y Humana, Facultad de Medicina UASLP al teléfono fijo 826-2300 extensiones 6684 y 6685 o al celular (444)5107-384."

Toma de muestras (instrucciones para el personal de CAPASITS / IMSS / Hospital Central).

- 1. Recabe el CONSENTIMIENTO INFORMADO para la venopunción de acuerdo a los lineamientos de su institución.
- 2. Rotule UN SOLO tubo vacutainer con el ID nacional del paciente a muestrear. NO INCLUYA NOMBRES NI APELLIDOS! Rotule el vacutainer con la letra $\underline{\mathbf{N}}$ si el paciente nunca ha recibido tratamiento anti-retroviral o con una $\underline{\mathbf{F}}$ si en ese momento el paciente se encuentra en falla virológica.
- 3. Recolecte sangre periférica por venopunción en un tubo vacutainer de 6 ml con tapa lila (EDTA K2) hasta llenarlo.
- 4. Invierta el tubo de la muestra al menos 5 veces para anticoagularlo correctamente.
- 5. Coloque el vacutainer correspondiente a éste estudio en la gradilla de la hielera refrigerada.
- 6. Una vez recabadas todas la muestras por favor hágalo saber al teléfono fijo 826-2300 extensión 6685 o 6684 (Laboratorio de Genómica Viral y Humana) o al celular del investigador responsable (Dr. Christian García) al 444-5107-384. Personal adscrito al laboratorio APROPIADAMENTE IDENTIFICADO pasará a su centro a recolectar las muestras recabadas.







7. El personal adscrito al Laboratorio de Genómica Viral y Humana responsable de la recolección de las muestras tiene la indicación de revisar personalmente las muestras referidas ANTES de abandonar su centro. Agradeceremos se le brinde el espacio y tiempo para verificar las condiciones de las muestras.

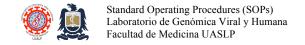
Recolección de muestras (instrucciones para el personal del Laboratorio de Genómica Viral y Humana).

- 1. Trasládese al centro de referencia con la carpeta de CONTROL Y VERIFICACION DE MUESTRAS REFERIDAS.
- 2. Introdúzcase e identifíquese ante el personal del centro de referencia de muestras (CAPASITS, IMSS, HC, etc.).
- 3. Reciba la hielera con las muestras.
- 4. Llene la parte superior de la hoja de CONTROL Y VERIFICACION DE MUESTRAS REFERIDAS.
- 5. Ratifique las condiciones señaladas en la LISTA DE VERIFICACION. Indique los ID's de las muestras que no cumplan con dichos criterios.
- 6. Anote la relación de muestras referidas revisando CADA TUBO y anotando su ID en la matriz inferior.
- 7. Firme o anote su nombre en la parte inferior.
- 8. Por ningún motivo obtenga o transporte listas, documentos o consentimientos informados con datos personales de los pacientes. La referencia de muestras es anonimizada.

Transportación de muestras

- 1. Cierre la hielera con las muestras con cinta canela la hielera para evitar su apertura y colóquela en la CAJUELA DEL AUTO, no se deberá transportar dicha hielera en el compartimiento de los pasajeros.
- 2. Trasládese inmediatamente al Laboratorio de Genómica Viral y Humana. Por ningún motivo se desvíe para realizar otras actividades.
- 3. No se deje la hielera dentro del automóvil sin supervisión o por períodos prolongados, especialmente durante el verano.





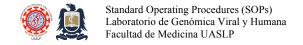


4. En caso de ser detenido y cuestionado al respecto de las muestras por autoridades civiles, militares o de seguridad pública coopere y evite en lo posible abrir la hielera fuera del laboratorio. Contacte a su jefe inmediato superior inmediatamente.

Recepción de muestras (instrucciones para el personal del Laboratorio de Genómica Viral y Humana).

- 1. Reciba la hielera en recepción y sin abrirla llene la parte superior del formato de *control y verificación de muestras referidas*. NO ABRA LA HIELERA EN RECEPCION!
- 2. Dé las gracias al mensajero que refiere las muestras y no lo haga esperar el proceso de cotejo de muestras.
- 3. Introduzca la hielera al LABORATORIO #1 y pídale a Sandra Guerra Palomares, a Pedro Hernández Sánchez o al Dr. Christian García que coteje y revise las muestras referidas con el resto del formato.
- 4. La persona que responsable de revisar y cotejar las muestras deberá portar bata y guantes ANTES de abrir la hielera en el laboratorio #1.
- 5. Se encenderá el gabinete de seguridad biológica del Laboratorio # 1 antes de abrir la hielera.
- 6. En caso de que algún tubo muestre señales de ruptura, derrame o apertura se deberán colocar todas las gradillas (más no la hielera) dentro del gabinete de seguridad biológica del Laboratorio # 1 INMEDIATAMENTE.
- 7. La persona que descubra dicho derrame deberá solicitar el apoyo de otra persona para remediar el derrame y descontaminación de la hielera, tubos y gradillas.
- 8. Será responsabilidad del ayudante notificar INMEDIATAMENTE al Dr. Christian García ANTES de comenzar a remediar el derrame. El ayudante deberá llenar el formato de INCIDENTES Y DERRAMES DE LABORATORIO.
- 9. La persona que revise las muestras deberá anotar su nombre en la parte inferior del formato.
- 10. Los tubos (recipiente primarios) no deberán abrirse dentro del gabinete de seguridad biológica del Laboratorio # 1. Dichos tubos únicamente podrán ser abiertos dentro del gabinete de seguridad biológica del AREA DE MANIPULACION VIRAL Y CULTIVO CELULAR!



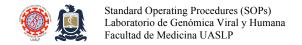




Separación, purificación y criopreservación de plasma

- 1. Introducir las muestras al TRANSFER del AREA DE MANIPULACION VIRAL Y CULTIVO CELULAR.
- 2. Retírese la bata de laboratorio y colóquese en este orden: la bata o traje de cultivo, cubre calzado, gorro, respirador N95 y guantes.
- 3. Introducir las muestras al AREA DE MANIPULACION VIRAL Y CULTIVO CELULAR.
- 4. Encienda el Gabinete de Seguridad Biológica y permítale estabilizarse al menos 5 minutos antes de iniciar el procesamiento.
- 5. Mezcle bien la sangre entera anticoagulada del vacutainer invirtiéndola varias veces y marque el nivel de su volumen con un plumón indeleble.
- 6. Encienda la centrífuga CL31R y colóque el rotor basculante S41 y programe la centrífuga para un radio de rotor de 161 mm.
- 7. Coloque los vacutainers en canastillas color amarillo y éstas a su vez en las cubetas del rotor S41. Coloque las tapas de contención de aerosoles a las canastillas de centrifugación.
- 8. Centrifuge a 400 G (1500 rpm) por 10 minutos a 5°C empleando un programa de aceleración/deceleración gradual lenta (programa #1 en la CLC31R del area de manipulacion viral y cultivo celular).
- 9. Coloque sanitas en el área de trabajo del gabinete de seguridad biológica y un recipiente de vidrio con al menos 500 ml de solución de NaOCL al 0.1% fresco.
- 10. Rotule un microtubo Eppendorf de 1.5 ml con el ID de la muestra. Rotule un criovial por cada muestra a procesar con los siguientes datos: ID de la muestra y fecha de separación.
- 11. Retire las canastillas del rotor cuidadosamente (para no perturbar los estratos formados) e introdúzcalas al gabinete de seguridad biológica.
- 12. Retire las tapas de contención de aerosoles DENTRO DEL GABINETE DE SEGURIDAD BIOLÓGICA.
- 13. Transfiera 1.5 ml del plasma sobrenadante (se obteienen en promedio 1.93 ± 0.4 ml de plasma a partir de cada vacutainer de 6 ml tomado de donadores sanos) a un microtubo eppendorf de 1.5 mL. Mantenga microtubos en hielo hasta juntar 24 microtubos en total. Haga a un lado el paquete celular y NO LO DESECHE! Será empleado para extraer células mononucleares humanas de acuerdo al siguiente apartado.





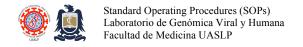


- 14. Coloque el rotor de ángulo fijo para microtubos (AC2.14) en la centrífuga CL31R refrigerada y programela para un radio de rotor de 84 mm.
- 15. Cargue los microtubos de 1.5 ml en el rotor AC2.14 y centrifuge a 800 G por 10 minutos a 5^aC para eliminar plaquetas y células contaminantes (programa #2 en la CLC31R del area de manipulación viral y cultivo celular).
- 16. Retire los microtubos del rotor y empleando una gradilla de microtubos introdúzcalos al gabinete de seguridad biológica.
- 17. Transfiera cuidadosamente el plasma purificado al criovial correspondiente previamente rotulado.
- 18. Coloque los crioviales en la caja de cartón 9x9 correspondiente, previamente rotulada y ésta a su vez en el congelador -80°C.

Aislamiento de células mononucleares

- 1. Estas actividades deberán realizarse en su totalidad dentro del ambiente estéril del gabinete de seguridad biológica del AREA DE MANIPULACION VIRAL Y CULTIVO CELULAR.
- 2. Prepare un tubo cónico de 15 ml con 3 ml de Ficoll-1077 (lympohprep) por cada muestra a procesar. Mantenga los tubos refrigerados hasta su uso.
- 3. Prepare un tubo cónico de 15 ml con 6 ml de PBS estéril por cada muestra a procesar.
- 4. Coloque el rotor S41 en la centrífuga refrigerada CL31R y prográmela para un radio de 161 mm.
- 5. Afore el paquete celular obtenido en el apartado anterior con PBS estéril empleando una pipeta serológica de bulbo estéril hasta la marca de volumen original inscrita con plumón indeleble.
- 6. Mezcle gentilmente la muestra de sangre con PBS empleando la misma pipeta de bulbo del vacutainer.
- 7. Con una pipeta de 10 ml estéril transfiera los 6 ml de sangre mezclada con PBS a un tubo de fondo cónico de 15 ml previamente cargado con 6 ml de PBS estéril. Mezcle por pipeteo gentil.
- 8. Empleando la misma pipeta de 10 mL tome 10 mL de la mezcla de sangre con PBS y lenta y cuidadosamente deposítela sobre la superficie del Ficoll-1077 sin perturbar la interfase. Escurra la mezcla lentamente por la pared del tubo inclinado. Al terminar este paso el tubo cónico presentará dos estratos, uno inferior con Ficoll-1077 y uno superior con la mezcla de sangre y PBS.

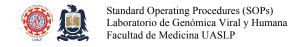






- 9. Tape los tubos cónicos con el ficol/sangre y coloquelos cuidadosamente en las cubetas con las canastillas negras. Coloque la tapa de aerosoles y dentro de la centrífuga CL31R del AREA DE MANIPULACION VIRAL Y CULTIVO CELULAR.
- 10. Centrifugue a 400 G por 20 minutos (programa #3 en la CLC31R del area de manipulación viral y cultivo celular). Verifique que los parámetros sean los correctos: 400 G, 1500 RPM, 20 minutos, rotor de 161 mm, aceleración y desaceleración lenta (Opción 1).
- 11. Retire cuidadosamente las cubetas de la centrífuga e intrdúzcalas al gabinete de seguridad biológica. Retire las tapas de contención de aerosoles de las cubetas y cuidadosamente retire los tubos cónicos de las cubetas sin perturbar los estratos que se han formado. En este momento existirán cuatro estratos diferentes: el primero (de abajo hacia arriba) contiene eritrocitos y granulocitos, el inmediatamente superior contiene Ficoll-1077, el inmediatamente superior al Ficoll es el estrato más discreto que contiene a las células mononucleares y, por último, el estrato superior que contiene el plasma y plaquetas (o en este caso el PBS y plaquetas).
- 12. Empleando otra pipeta serológica de bulbo plástico transfiera el estrato correspondiente a las células mononucleares a un tubo de cultivo o tubo de ensayo de vidrio de fondo redondo de 12 mL. De ser necesario podrá eliminarse parte del estrato de plasma superior antes de cosechar las células mononucleares.
- 13. Afore el tubo de cultivo de fondo redondo a 10 mL con PBS, pH 7.4. Tapelo y mezcle gentilmente por inversión.
- 14. Coloque los tubos de cultivo de fondo redondo en las canastillas negras y asegure las tapas de contención de aerosoles. Centrifugue a 100 G por 10 minutos (programa #4 en la CLC31R del area de manipulacion viral y cultivo celular). Verifique que los parámetros sean los correctos: 100 G, 760 RPM, 10 minutos, rotor de 161 mm, aceleración y desaceleración rápida (Opción 5).
- 15. Retire las cubetas de la centrífuga e intrdúzcalas al gabinete de seguridad biológica. Descarte el sobrenadante por decantación hacia una solución de NaOCl al 0.1%.
- 16. Resuspenda las células mononucleares del pellet del fondo en el volumen remanente de PBS dando pequeños golpes a la punta del tubo con el dedo índice. ¡Es indispensable asegurar la resuspensión completa de las células mononucleares!
- 17. Afore el tubo a 10 mL con PBS, pH 7.4 nuevamente. Mezcle gentilmente por inversión vuelva a centrifugar como en el paso anterior.
- 18. Retire las cubetas de la centrífuga e intrdúzcalas al gabinete de seguridad biológica. Descarte el sobrenadante por decantación hacia una solución de NaOCl al 0.1%.
- 19. Resuspenda las células mononucleares en el volumen remanente de PBS dando pequeños golpes a la punta del tubo con el dedo índice. Agregue 1 mL de Medio de Cultivo Básico suplementado con







10% de Suero Bovino Fetal (FBS) y mezcle por golpeteo digital.

- 20. Cuente las células y corrija su concentración a no más de $5x10^6$ células por ml para criopreservar. Nuestra experiencia indica que las muestras sanguíneas promedio de pacientes con HIV procesadas como se menciona en las primeras partes de este manual rinden aproximadamente $2x10^6$ células por ml con lo que se puede obviar este paso de conteo.
- 21. NOTA: En promedio un vacutainer de 6mL tomado de un sujeto sano rinde $4.5 \pm 1.47 \times 10^6$ células/ml con 97.3% de viabilidad, lo que permite continuar directamente y criopreservar el contenido neto de células así extraido.

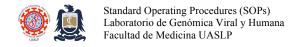
Criopreservación de de células mononucleares

- Prepárese con anterioridad alícuotas de la solución de criopreservación agregando 500 μL de FBS
 + 100 μL de DMSO a crioviales de 1.5 mL por cada muestra a criorpreservar. Almacénelas en el
 congelador a -20°C o en hielo y manténgalas a en hielo a 4°C antes de emplear.
- 2. Rotule un criovial por cada muestra de células mononucleares a criopreservar con los siguientes datos: ID único y fecha de congelación.
- 3. Agregue 1 mL de la suspensión de células mononucleares a cada criovial previamente cargado con la solución de criopreservación.
- 4. Mezcle la solución de células mononucleares y solución de criopreservación por agitación gentil y manténgase en hielo a 4°C.
- 5. Coloque los crioviales dentro del Mr. Frosty (original o improvisado) previamente enfriado en congelador a -4°C.
- 6. Introduzca el Mr. Frosty en el ultracongelador de -80°C durante al menos 4 horas pero no más de 24 horas.
- 7. Transfiera los crioviales al tanque #1 de LN2 en fase de vapor a -156°C para su almacenamiento a largo plazo.

Referencias

- 1. Mayor N, Anthony Nolan Research Institute. Protocol for growing B-Lynphoblastoid Cell Lines.
- 2. Gorodezky C, et al. Manual de Procedimientos Serológicos y Celulares de Histocompatibilidad. Departamento de Inmunología e Inmunogenética del Instituto de Diagnóstico y Referencia







Epidemiológicos (InDRE), 2007.

Historial de cambios

- 1.0 Documento original.
- 2.0 Protocolo optimizado.
- 3.0 Protocolo optimizado.
- 4.0 Modificaciones de formato únicamente..

.

