



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



Codificación: **G-01CI-Ed5**
Fecha de emisión: 14/1/2026

GUÍA PARA EL ENVÍO DE MUESTRAS

CONTENIDO

1.	OBJETO Y ALCANCE	2
2.	TIPOS DE ESPECÍMENES ADECUADOS AL TIPO DE ENSAYO Y ANTICOAGULANTE DE ELECCIÓN	3
3.	PAUTAS PARA EL ENVÍO DE MUESTRAS	4
4.	AMPLIACIÓN DE INFORMACIÓN	7
4.1.	RELACIÓN DE LOS TIPOS DE ESPECÍMENES	7
4.2.	MÉTODOS DE OBTENCIÓN DEL ESPÉCIMEN EN MUESTRAS HEMATOLÓGICAS	7
4.3.	MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DEL ESPECÍMEN	9
4.4.	CANTIDAD DE MUESTRA QUE SE DEBE OBTENER	9
4.5.	MUESTRAS ESPECIALES: LCR	10
4.6.	CONDICIONES DE ACEPTACIÓN DE LAS MUESTRAS	10
4.7.	ALMACENAMIENTO Y ELIMINACIÓN DE MUESTRAS	11
5.	ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	11
6.	DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA	11
	NOTAS DE CAMBIO	12

Cualquier otra copia de este documento es una **COPIA NO CONTROLADA**
Elaborado y revisado por: *Juana Ciudad /Susana Barrena/ Miriam Fierro*

Emitido por:
Juana Ciudad
Responsable de Calidad



1. OBJETO Y ALCANCE

El inmunofenotipado de muestras biológicas y otros ensayos de caracterización celular realizados en el Servicio de Citometría consisten en el **análisis cualitativo y/o cuantitativo de una o más características** de alguno de los elementos particulados, **habitualmente células**, de dicha muestra, empleando métodos inmunológicos basados en el uso de anticuerpos monoclonales y/o policlonales.

La muestra que se analiza es un factor clave en la realización del ensayo.

Debe ser el usuario el que conozca los pasos críticos para garantizar un correcto resultado del análisis:

- Tipo de muestra según ensayo.
- Extracción/obtención de la muestra.
- Recipiente y medio.
- Cantidad.
- Transporte.
- Información asociada.

Este documento pretende servir de ayuda a los usuarios del Servicio, dando a conocer las condiciones idóneas, y los requisitos mínimos para que las muestras sean aceptadas.



2. TIPOS DE ESPECÍMENES ADECUADOS AL TIPO DE ENSAYO Y ANTICOAGULANTE DE ELECCIÓN

Campo	Ensayo/estudio	Tipo de espécimen	Anticoagulante de elección
HEMATOLOGÍA Y HEMOTERAPIA	Diagnóstico y monitorización de hemopatías malignas	SP	EDTA
		MO	EDTA
		Leucaféresis	EDTA/PCD
		Productos celulares seleccionados	EDTA/PCD
		PAAF y biopsia de tejido linfóide o no linfóide	EDTA (en 1-10 mL de PBS/SSF)
		Líquidos corporales	EDTA + TRANSFIX (Fijador celular)
	Estudios de mastocitos	MO	EDTA
		SP	EDTA
		ADN	PBS
		Tejido linfóide	EDTA (en 1-10 mL de PBS/SSF)
	HPN	SP (preferible)	EDTA
		MO	EDTA
	Diagnóstico de trombocitopatías idiopáticas	SP	EDTA
		MO	EDTA
	Análisis de activación plaquetaria	SP	EDTA (en 1/10 vol/vol de TH)
Varias	Estudios de funcionalidad celular	SP	Heparina de Litio
Inmunología/Alergias	Estudio de sospecha de inmunodeficiencia primaria	SP	EDTA
	Estudios de Fagocitosis	SP PACIENTE Y SP DE CONTROL SANO	Heparina de Litio
Oncología/Cirugía	Estudios de cuantificación de ADN en tejidos sólidos	Pieza de tejido en fresco	Suero salino, PBS, <u>NO</u> derivados de formaldehidos



3. PAUTAS PARA EL ENVÍO DE MUESTRAS

3.1. Tiempo transcurrido desde la extracción hasta la realización del ensayo: el mínimo posible

SP, MO:

- Deseable: antes de 24 horas.
- Máximo: 48 horas.

Tejidos sólidos (adenopatías, tumores o punciones aspiraciones con aguja fina – PAAF-) en fresco, sin fijador: 2 horas.

3.2. Anticoagulantes y líquidos que contienen la muestra

SP, MO:

- Anticoagulante EDTA para inmunofenotipo e hibridación in situ / NGS.
- Anticoagulante Heparina de Litio para estudios funcionales.

Tejidos sólidos (adenopatías, tumores o punciones aspiraciones con aguja fina –PAAF-): Es importante que estas muestras se reciban inmersas en un líquido isotónico y estéril tipo PBS o suero salino.

Líquidos corporales (LCR, líquido pleural...): Anticoagulante EDTA + Fijador celular (Transfix).

3.3. Identificación de las muestras

Todas las muestras deben estar correctamente identificadas: cada tubo que contenga muestra llevará un rótulo con un código de identificación única del paciente y la muestra de que se trata.

Los paquetes deben incluir la dirección del remitente.

La dirección del destinatario es:

*Servicio de Citometría.
Edificio Multiusos I+D+i
Calle Espejo nº 2
37007 Salamanca.*



3.4. Documentación que debe acompañar a la muestra

Hoja de Solicitud de Ensayo en versión actualizada y debidamente cumplimentada, disponible en <https://nucleus.usal.es/es/citometria/solicitud-ensayo> (nos permitimos recordarle que el servicio que podemos ofrecerle será mejor cuantos más datos conozcamos del paciente en cuestión).

Imprescindible rellenar en esta hoja:

- Datos del remitente: Facultativo que solicita el servicio y sus datos de contacto: teléfono, correo electrónico, hospital/institución y Servicio del que procede.
- Fecha y hora de extracción de la muestra.
- Identificación única de la muestra y del individuo del que procede, reseñándose tipo de muestra enviada -si se envía tanto SP como MO se rotulará además el tubo con este dato o se pondrá una etiqueta-.
- Diagnóstico de sospecha, impresión diagnóstica y/o tipo de estudio que se solicita (en su defecto tipo de información que se espera recibir).
- Momento en el que se solicita el estudio (diagnóstico, enfermedad residual, progresión).

Es muy importante:

- Informar si el paciente ha recibido o está recibiendo tratamiento quimioterápico y en qué fase del mismo se halla.
- **Que las muestras de sangre periférica se acompañen de una copia del hemograma del mismo día o próximo al día de extracción de la muestra.**
- **Edad del paciente.**

Deseable:

En los estudios de apoyo diagnóstico, sería deseable que se rellenaran todos los datos clínicos o analíticos que puedan ser de ayuda para la elección del panel de estudio a realizar

3.5. Contenedores de envío de muestras

- Rígidos, para proteger los tubos de vidrio
- Estancos, para evitar salida de líquidos biológicos en caso de rotura del tubo, y
- De material aislante, para evitar cambios bruscos de temperatura.



3.6. Condiciones de envío

El servicio de transporte debe garantizar la entrega en nuestro Servicio antes de las 10 horas del día siguiente a la extracción de la muestra.

Nota:

Punciones aspiraciones en aguja fina-PAAF, Líquido Cefalorraquídeo (LCR) o cualquier otro fluido biológico diferente):

Se sugiere la posibilidad de enviarlas conservadas en el conservante comercial (Transfix) siguiendo fielmente las instrucciones del producto usado en lo que se refiere a volúmenes/concentraciones, temperatura, etc.

Los tejidos sólidos, adenopatías y tumores deben seguir las pautas de envío que se indican en los apartados 3.2, y 4.2.

Para cualquier duda:

- **Teléfono General de Contacto:** 923 29 45 00

EXTENSIONES

Inmunofenotipo: 5465- 5466 – 5505

Estudios en LCR: 5465- 5466 – 5505

Estudios de Biología molecular (Test HUMARA, mutaciones de CKIT, etc.): 5501

- **Estudios de HIS:** 5501

- **Facturación:** 6531



4. AMPLIACIÓN DE INFORMACIÓN

4.1. Relación de los tipos de especímenes

Los especímenes que se pueden usar son, entre otros, sangre periférica, sangre de cordón umbilical, aspirados de médula ósea, otros derivados de la sangre periférica como los productos de leucaféresis o de selecciones de células progenitoras a partir de leucaféresis, obtenidas para ser usadas posteriormente en un trasplante, productos de transfusión, como los concentrados de hematíes y plaquetas, y plasma. Además, se estudian también especímenes procedentes de tejidos linfoides como ganglio linfático, bazo y timo, y de tejidos no linfoides, por ejemplo, piel, hígado, mucosa gástrica e intestino, que pueden haberse obtenido por procedimientos quirúrgicos, biopsia o punción-aspiración con aguja fina (PAAF). También se puede realizar el estudio en distintos fluidos corporales como líquido cefalorraquídeo, líquido pleural y líquido ascítico.

Los citados especímenes son los más habitualmente usados en Hematología y Hemoterapia; sin embargo, en el campo de otras disciplinas pueden ser objeto de estudio por citometría de flujo numerosos tipos de muestras, tanto de origen humano como de otras especies animales, e incluso vegetales, con la única limitación de que sea factible la obtención de elementos celulares o subcelulares en suspensión y se mantenga en su obtención la integridad de la célula si se estudian sus moléculas de membrana o la integridad del núcleo si es éste el objeto del estudio.

Ante tal disparidad de posibilidades, en este conciso documento nos referiremos tan solo a las muestras más habituales en el laboratorio, las del área de hematología y hemoterapia en lo que concierne a los apartados de métodos de obtención del espécimen y métodos de conservación del espécimen, que podrán aplicarse a especímenes con características similares. Para otros tipos de muestra y/o ensayos que se quieran solicitar hay que ponerse en contacto con el Servicio de Citometría.

4.2. Métodos de obtención del espécimen en muestras hematológicas

Los especímenes anteriormente referidos se obtienen empleando métodos y procedimientos idénticos a los utilizados para la obtención de muestras celulares del mismo origen para fines diagnósticos y/o terapéuticos. Sin embargo, existen tres situaciones que merecen un comentario específico.

La primera se refiere a los especímenes de sangre periférica para estudios inmunofenotípicos de activación de plaquetas; en estas circunstancias, la sangre debe obtenerse por punción venosa en ausencia de torniquete (o con un torniquete suave) empleando una aguja de 21 G o incluso de mayor diámetro, y descartando los primeros 2 ml de sangre extraída, para evitar al máximo que el proceso de obtención del espécimen induzca cambios en el estado de activación de las plaquetas a estudiar.

El segundo supuesto está relacionado con la obtención de aspirados de médula ósea, en especial para el estudio de células adherentes al estroma (por ejemplo, Mastocitos, células plasmáticas, etc.). En este caso, las punciones de cresta iliaca o esternón deben realizarse de modo firme y rápido, empleando agujas de biopsia de 14 a 8 G que permiten obtener un número suficiente de



partículas de MO en un volumen máximo de 1,5 a 2 mL. En general, en los aspirados de MO en los que se obtienen volúmenes superiores en una sola punción, no aumenta el número de células de interés recogidas, sino que habitualmente las diluye.

Como regla general, todos los especímenes procedentes de cualquier fluido corporal, aspirado de médula ósea, punción o biopsia de un tejido sólido, deben obtenerse en tubos que contengan anticoagulante. Aunque en algunas situaciones concretas sea necesario el uso de otros anticoagulantes, el κ EDTA es el anticoagulante recomendable para la mayoría de los estudios de inmunofenotipado. Constituyen una excepción los especímenes procedentes de sangre periférica para determinación de activación plaquetar por un lado, tanto los productos de leucaféresis como los derivados sanguíneos anticoagulados en citrato (ACD, Ácido Citrato Dextrosa y PCD, Fosfato citrato dextrosa, respectivamente). Si se van a realizar estudios funcionales, la extracción de las muestras se deberá realizar en tubos con Heparina de Litio.

En aquellas muestras constituidas por dispersados unicelulares de tejidos sólidos (por ejemplo, PAAF de ganglio o piel, o aspirados de médula ósea) es conveniente que el anticoagulante esté diluido en un volumen de hasta 1 mL de un líquido isotónico estéril y filtrado con filtros con poro $<0,40 \mu\text{M}$ (por ejemplo, suero salino fisiológico o tampón fosfato –PBS a pH: 7,4). En el caso de aspirados de médula ósea en los que se obtengan volúmenes inferiores a 1 mL, el volumen de líquido isotónico en el que se diluye el espécimen no debe superar el volumen total de espécimen obtenido para evitar una dilución extremadamente elevada del mismo.

Hay que tener en cuenta que en el caso de requerirse la dilución de productos de leucaféresis u otro tipo de especímenes en los que se vaya a realizar un recuento del número absoluto de uno o más tipos de células presentes en el mismo, los volúmenes de espécimen y diluyente empleados deben medirse de forma exacta mediante pipeteo reverso o electrónico y utilizando una pipeta calibrada. En este caso debe emplearse también el mismo tipo de diluyente recomendado anteriormente para otros tipos de especímenes.

Los especímenes de sangre obtenidos para estudio de la activación plaquetar deben diluirse 1/10 (vol/vol) en tampón Tyrode/Hepes (pH=7,4), antes de que hayan transcurrido 30 minutos desde la extracción.

Para la dilución de especímenes para inmunofenotipado por citometría de flujo debe evitarse el empleo de medios de cultivo.

Los especímenes obtenidos mediante biopsia o procedimientos quirúrgicos no deben someterse a procesos de fijación o congelación, sino sumergirse directamente en un líquido isotónico estéril; por ejemplo, suero salino fisiológico o tampón fosfato (PBS a pH 7,4). Si el tamaño de la pieza quirúrgica es mayor de 1 cm, es aconsejable trocearla, mediante bisturí, en piezas más pequeñas.

En el caso de muestras de fluidos corporales (LCR, líquido pleural, líquido ascítico...) es conveniente utilizar tubos que además de anticoagulante (EDTA) lleven algún tipo de fijador celular en la concentración recomendada por el fabricante. En el caso específico de los LCR es conveniente que el volumen final de muestra (excluyendo el volumen de fijador del tubo) no sea inferior a 1,5-2ml.



4.3. Métodos de conservación del espécimen

Los métodos y periodos de conservación de especímenes pueden variar en base al tipo de espécimen, número y características de los componentes celulares y el estado del paciente en el momento de su obtención. En general, la calidad de los resultados es inversamente proporcional al tiempo transcurrido desde la obtención del espécimen y al grado de manipulación sufrido por el mismo desde su obtención, siendo siempre recomendable el empleo de especímenes frescos, recién obtenidos. Aunque pueda llegar a obtenerse información de utilidad a partir del análisis de muestras almacenadas durante periodos de tiempo más prolongados, no es conveniente la realización del estudio en especímenes conservados durante más de **48 horas** desde su obtención, con algunas excepciones en las que el tiempo de conservación recomendado es aún menor: especímenes de sangre periférica para estudio de activación plaquetar, líquido cefalorraquídeo (que no lleven fijador) y de punción/biopsia de tejidos sólidos, en especial si contienen células susceptibles de entrar en apoptosis (por ejemplo muestras de pacientes con linfomas no Hodgkin de alto grado, tipo linfoma de Burkitt). En estos casos, el procesamiento del espécimen debe iniciarse lo antes posible.

En todos los demás casos, el espécimen debe conservarse en presencia del anticoagulante más adecuado para el fin que se obtuvo y a temperatura ambiente (22-25°C). Sólo en aquellas situaciones en las que el espécimen no pueda procesarse en el tiempo adecuado y se requiera de tiempos de almacenamiento (o transporte) más prolongados, sería recomendable conservarlo en nevera a 4-6°C.

Debe tenerse en cuenta que, en los tejidos sólidos, el grado de conservación de las células es menor y se detectará mayor cantidad de células muertas o apoptóticas, lo que podrá condicionar en algunos casos el resultado final; este hecho se tendrá en cuenta a la hora de entregar los resultados del ensayo.

Para mantener la hidratación de las células y por tanto incrementar su viabilidad las muestras de tejidos sólidos en el caso de que vayan a llegar al laboratorio de destino cuando hayan transcurrido más de 24 horas de la extracción, se recomienda, si es posible, la disgregación mecánica del tejido en un líquido isotónico, que consiste en hacer unos cortes de la pieza con un bisturí, y presionar los trozos de tejido con unas pinzas hasta lograr la liberación de las células al líquido isotónico. Dejando en reposo dos minutos, en el fondo del recipiente se depositan los trozos de mayor tamaño y con una pipeta *pasteur* se recoge el sobrenadante que contiene las células.

4.4. Cantidad de muestra que se debe obtener

La cantidad de muestra necesaria para los ensayos realizados en el Servicio depende de dos factores: 1) el protocolo de estudio a realizar y 2) la cantidad de leucocitos y/o células de interés que contenga la muestra a estudiar.

En muestras hematológicas, para estudio diagnóstico, la cantidad recomendada será de 5 a 10 ml si se trata de SP y de 2 a 5 ml si es MO; sin embargo, debido a que no siempre se puede extraer esta cantidad (por ejemplo, en niños de corta edad), de forma previa a cada análisis, en nuestro



laboratorio se realizará un recuento del número de leucocitos de la muestra y se adaptará el ensayo a las características particulares de la muestra.

En el caso de monitorización de tratamiento es recomendable una cantidad de 5ml de MO y 3x10 ml de SP.

Cuando sea necesario, se consultará con el solicitante la posibilidad de enviar nueva muestra.

4.5. Muestras especiales: LCR

El Líquido cefalorraquídeo (LCR) requiere un tratamiento especial por dos cuestiones fundamentales: 1) su fragilidad en cuanto a conservación de las células en términos de viabilidad suficiente para la realización de estudios inmunofenotípicos y 2) su escasísima celularidad obliga a un cuidado especial que disminuya al máximo la mortalidad celular una vez extraído el líquido. Por ambas razones las muestras de LCR con fines de estudios inmunofenotípicos por CMF han de extraerse directamente en un conservante, teniendo en cuenta que SIEMPRE ha de cumplirse la proporción de conservante / muestra, según las indicaciones del fabricante del fijador o utilizando tubos comerciales que ya llevan incluido el conservante. Se pueden conservar a temperatura ambiente (18-24°C) hasta el momento de ser utilizados.

1. La cantidad mínima de muestra de LCR **no debería ser inferior a 1,5-2ml**. De no ser esto posible, es conveniente retirar parte del Transfix del tubo.
2. Una vez se haya realizado la punción para obtener el LCR del paciente, éste debe ser añadido al tubo que contiene el estabilizante.
3. A continuación, se debe mezclar de forma manual por inversión durante unas 10 veces.
4. Una vez hecho esto la solución es estable:
 - 10 días si está a 4º C
 - 7 días si está a temperatura ambiente
 - 3 días a 37ºC
5. La muestra + estabilizante y a temperatura ambiente se enviará por mensajería la dirección que consta en este documento.

4.6. Condiciones de aceptación de las muestras

Las muestras serán inspeccionadas a su llegada para comprobar su adecuación en cuanto a los requisitos especificados en este documento. No se realizará el ensayo solicitado únicamente cuando no se haya conservado la integridad de las mismas hasta el laboratorio, o cuando se dé cualquier posible circunstancia que imposibilite la correcta realización de los ensayos y/o la entrega de resultados.

En otros casos, y de manera general, ante la falta de cumplimiento de los requisitos establecidos en este documento (como por ejemplo falta de información en la Hoja de Solicitud de Ensayo, cantidad de muestra menor a la necesaria, etc.), o los particularmente acordados de manera previa



a cada ensayo, el personal del Servicio entrará en contacto con el usuario para corregir la deficiencia o, en su caso, solicitar nueva muestra.

Igualmente, cuando la calidad de la muestra no sea la adecuada, el personal del Servicio rellenará un parte de incidencias que se comunicará al solicitante para que le conste este hecho por el medio que se considere oportuno según el caso. Asimismo, cuando sea procedente, se le informará de en qué medida estas incidencias han podido afectar al resultado final.

4.7. Almacenamiento y eliminación de muestras

El excedente de las muestras utilizadas para el análisis, en caso de existir, se conservará durante un periodo de **15 días**, en las mejores condiciones para la estabilidad de las propiedades de las muestras, para poder repetir parte o todo el ensayo, si se considera necesario, o para estudios adicionales.

Transcurrido ese periodo de tiempo, como norma general, las muestras serán destruidas, salvo que se hayan acordado otras condiciones con el cliente.

En los casos de muestras con características de interés clínico, éstas podrán ser usadas con fines de investigación. En este caso se desligará de la muestra cualquier posible identificación del paciente que no garantice su anonimato, según se establece en la Política de Confidencialidad y Ética del Servicio.

5. ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

- LCR : Líquido cefalorraquídeo
- MO: medula ósea
- PAAF: punción-aspiración con aguja fina
- PBS: phosphated buffered saline
- SCU: sangre de cordón umbilical
- SP: sangre periférica
- SSF: suero salino fisiológico
- TH: tampón Tyrodes/Hepes

6. DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA

- Krueger et al, Current Protocols in Cytometry, 2003.
- Manual de obtención, transporte y conservación de muestras biológicas en Hematología y Hemoterapia. Joseph M^a Jou. Editado por Acción Médica, S. A. (publicaciones@accionmedica.es).



NOTAS DE CAMBIO

<u>Versión</u>	<u>Cambios</u>
1 (22/5/2007)	Primera edición del documento
2 (25/9/2015)	Adaptación al Servicio de Apoyo a la Investigación, NUCLEUS. Puntualización del título del punto 10. Actualización de dirección de envío de muestras y personal de contacto. Se ha añadido el punto 6: muestras especiales: LCR
3 (31/5/2022)	Apartado 4 Conservación del espécimen: Se recomienda una dilución estabilizante/muestra de 1/5 (vol/vol) (en la guía anterior 1/10) Apartado 6 Muestras LCR: La cantidad de muestra no debería ser inferior a 1,5-2 ml (ninguna restricción en este sentido en la guía anterior)
4 (2/2025)	Se reestructura la información que contiene la guía. El envío de muestras fijadas sólo está indicado en líquidos corporales (Apartado 4.3 Métodos de conservación el espécimen).
5	Se sustituye en el apartado 3.6 “Tejidos sólidos (adenopatías, tumores o punciones aspiraciones en aguja fina –PAAF) o líquido cefalorraquídeo (LCR)” por “Punciones aspiraciones en aguja fina-PAAF, Líquido Cefalorraquídeo (LCR) o cualquier otro fluido biológico diferente)”