PROTOCOLO RECOGIDA DE MUESTRAS

ÍNDICE

0. NOTAS INTRODUCTORIAS ***Pág 2***

1. MUESTRAS A RECOGER EN VALENCIA ***Pág 3***

2. RECOGIDA DE MUESTRAS ***Pág 5***

2.1. En casa ***Pág 5***

- Orina

- Heces

2.2. En la visita ***Pág 8***

- Pelo

- Citología

- Microbiota vaginal

- Sangre

2.3. Etiquetado de muestras ***Pág 14***

3. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS ***Pág 18***

3.1. Procesamiento

- Orina

- Sangre

3.2. Etiquetado de alícuotas ***Pág 21***

3.3. Almacenamiento ***Pág 23***

3.4. Registro en biorepositorio ***Pág 24***

Otros documentos:

ANEXO I. MADRES. Hoja de examen clínico y muestras de sangre y pelo.pdf
ANEXO I. ADOLESC. Hoja recogida examen clínico y muestras de sangre y pelo.pdf
ANEXO III. Hoja de procesamiento de muestras.pdf
ANEXO IV. Esquema de alícuotas de Sangre y Orina
ANEXO V. Inventario Mat fungible Visita 15a_FISABIO.xlsx
ANEXO V. Inventario Mat fungible Visita 15a_CS Paterna.xlsx
ANEXO VI. Instrucciones generales a familias
ANEXO VII. Instrucciones familias_Orina
ANEXO VIII. Instrucciones familias_Heces
ANEXO IX. Instrucciones madres_CERVICO-VAGINAL

0. NOTAS INTRODUCTORIAS

En este documento se explicita el protocolo de recogida, procesamiento, etiquetado y almacenamiento de muestras. Leer detenidamente este documento.

Antes de la visita:

Asegurarse de que se dispone de todo el material necesario para cada uno de los procedimientos en el Centro de Salud (CS) de Paterna (consultar el ANEXO V. Inventario Mat fungible Visita 15a_CS Paterna.xlsx del que hay una copia en un USB de la visita que llevará una trabajadora de campo). Si falta algún material, contactar con Amparo Ferrero, Sabrina Llop o Maria José López.

Durante la visita: Rellenar las hojas de recogida y procesamiento de muestras con todos los datos requeridos y anotar cualquier incidencia. Anexos:

ANEXO I. MADRES. Hoja de examen clínico y muestras de sangre y pelo.pdf	[Enfermera madres]
ANEXO I. ADOLESC. Hoja recogida examen clínico y muestras de sangre y pelo.pdf	[Enfermera niños]
ANEXO III. Hoja de procesamiento de muestras.pdf	[Enfermera que termine antes el examen clínico y realice el procesamiento de muestras]

Tras la visita: Rellenar el documento ANEXO V. Inventario Mat fungible Visita 15a_CS Paterna.xlsx del material fungible gastado en la sesión, con el fin de tener previsión para las siguientes visitas. En caso de que se prevea que se agote un material, avisar con antelación al siguiente personal involucrado en la visita, por orden: Amparo Ferrero, Sabrina Llop o Maria José López.

1. MUESTRAS A RECOGER EN VALENCIA

Tipo de muestra (lugar de recolección)	Tubo	Procesamiento	Cantidad	N alicuotas	Almacenamiento
NIÑO					
Orina (casa)	2 Contenedores polipropileno 70 mL: 1. última de la noche 2. primera de la mañana (30 mL mínimo cada uno)	Orina: primera mañana	20 mL	4 x 5 mL	-80ºC
		Orina: primera mañana + última noche	20 mL (10mL de cada)	4 x 5 mL	-80ºC
		Orina: última noche	20 mL	4 x 5 mL	-80ºC
Sangre 15 mL (visita)	4 mL Vacutainer (con aditivo coagulación)	Suero	2 mL	4 x 0.5 mL (tapón violeta)	-80ºC (en tubos 1.2 mL)
	5 mL Vacutainer (sin aditivo coagulación)	Suero	2,5 mL	5 x 0.5 mL (tapón rojo)	
	6 mL EDTA	1. Sangre total	1,5 mL	3 x 0.5 mL (tapón blanco)	
		2. Buffy coat	1 mL	1 x 1 mL	
		3. Células rojas	1,5 mL	3 x 0.5 mL	
		4. Plasma	2 mL	4 x 0.5 mL (tapón verde)	
Pelo (visita)	Bolsa zip	-	70 mg	2 mechones en 2 bolsas	-
Heces (casa)	Tubo zymo (para microbiota)	DNA bacteriano	1 tubo 9mL (lo que recoja la cucharita)	1	-80ºC
	Envase p/heces estéril (para metales)	-	1 tubo 60 mL (lo que recoja la cucharita)	1	-80ºC

Tipo de muestra (lugar de recolección)	Tubo	Procesamiento	Cantidad	N alicuotas	Almacenamiento
MADRE					
Orina (casa)	2 Contenedores polipropileno 70 mL: 1. última de la noche 2. primera de la mañana (30 mL mínimo cada uno)	Orina: primera mañana	10 mL	2 x 5 mL	-80ºC
		Orina: primera mañana +	10 mL (5mL de cada)	2 x 5 mL	-80ºC
		Orina: última noche	10 mL	2 x 5 mL	-80ºC
Sangre 15 mL (visita)	4 mL Vacutainer *(con aditivo coagulación)*	Suero	2 mL	4 x 0.5 mL (tapón violeta)	-80ºC (en tubos 1.2 mL)
	5 mL Vacutainer *(sin aditivo coagulación)*	Suero	2,5 mL	5 x 0.5 mL (tapón rojo)	
	6 mL EDTA	1. Sangre total	1,5 mL	3 x 0.5 mL (tapón blanco)	
		2. Buffy coat	1 mL	1 x 1 mL	
		3. Células rojas	1,5 mL	3 x 0.5 mL	
		4. Plasma	2 mL	4 x 0.5 mL (tapón verde)	
Pelo (visita)	Bolsa zip	-	70 mg	2 mechones en 2 bolsas	-
Citología	Bote ThinPrep	-	1 tubo (lo que se recoja con el cepillo)	1	**Tª Ambiente** hasta envío al H. Arnau en valija interna (En Hospital a 4ºC)
Microbiota vaginal	Bote DeltaSwab Amies	-	1 tubo (lo que se recoja con escobillón)	1	-80ºC

Cambios respecto a protocolo de mínimos INMA:

- <u>En adolescentes</u>: No se recoge uñas y saliva. Se añade heces para determinación de metales.

- <u>En madres</u>: Se añade orina, pelo, citología y microbiota vaginal.

2. RECOGIDA DE MUESTRAS

2.1. EN CASA

2.1.1. Recogida de orina

RECORDAD Se recoge a adolescentes y madres.

Necesitareis los siguientes materiales:

Para la recogida de orina se enviará a cada familia antes de la visita:

- Documentación (ANEXO VII. InstFamilia_ORINA_Visita 15años_Val.doc)
  - Instrucciones para las familias
  - Formulario de recogida de muestras a completar por las familias
- Materiales para la recogida de orina a enviar a la familia antes de la visita INMA que debe incluir:
  - 4 contenedores de orina de 70 ml de polipropileno (2 para adolescente, 2 para madre), uno para la muestra de mañana y otro para la noche anterior a la visita.
  - Bolsa isotérmica para la conservación de la muestra (solo si ellos no disponen de una). Se debe pedir que ellos preparen acumuladores de frío (si no tienen, podría servir una botella de 50 cl de agua, puesta en el congelador).
  - Bolsa de plástico tipo zip para guardar las muestras dentro de la nevera.
  - Etiquetas identificativas ("idnum", "orina noche o mañana", "madre" o "niño/a")

Información para el trabajador de campo:

Antes de la visita:

1. Los padres/madres deben ser instruidos sobre cómo recoger y guardar las muestras. Explicar el protocolo por teléfono a las familias. Brevemente:

Se requieren 2 muestras para cada participante recogidas en contenedores de 70 mL:

- 1 muestra antes de acostarse.

- 1 muestra recién levantado/a. Si el participante hiciese una micción antes de la hora de levantarse (de madrugada), debería recoger esta última (recordar apuntar la hora de recogida) y sería considerada como Orina Mañana.

Dado que participan el niño/a y la madre, se requerirán 4 contenedores de 70 mL para cada visita.

Importante:

- La orina debe mantenerse a 4ºC durante todo el proceso (recogida en casa, transporte (nevera), y en el centro de salud antes de ser procesada).

- La orina sólo puede estar 24h a 4ºC antes de ser procesada y guardada a -80ºC, por lo que la visita debe hacerse obligatoriamente el día después de la recogida de orina. Si por alguna razón, el participante debe anular la hora de la visita, tendrá que recoger de nuevo la orina y se le deberá proporcionar nuevo material.

2. Preparar la documentación y el material necesario para la correcta recogida de las muestras de orina. Poner los contenedores o botes y las etiquetas (también la nevera, en caso de que no tengan) dentro de un sobre acolchado. Poner la documentación en un sobre blanco aparte.

3. Enviar a la familia vía postal, por una parte, la documentación (sobre blanco), y por otra parte, el material necesario (sobre acolchado). Para el sobre acolchado usar el correo certificado (preguntar a la recepcionista de FISABIO).

En la visita:

4. Cuando las familias entregan las muestras de orina, comprobar:
- *a.* Que las muestras estén etiquetadas.
- *b.* Que el formulario de muestras esté correctamente cumplimentado por las familias.
- *c.* Rellenar el formulario ANEXO III_Hoja procesamiento de muestras.docx preguntando a las familias.

5. En caso de que las familias no hayan podido recoger orina, recoger una muestra en la vista y anotarlo en el formulario.

NOTA SOBRE POSIBLES EVENTUALIDADES:

***CASO 1:** Si no es posible realizar la recogida DE NINGUNA DE LAS MUESTRAS en el domicilio por las familias, el trabajador de campo recogerá una muestra de orina durante la visita del niño/a.

***CASO 2:** Si la familia ha conseguido recoger como mínimo 1 de las 2 muestras de orina requeridas (mañana o noche) NO ES NECESARIO recoger la orina durante la visita.

NOTA:
Ante cualquier duda sobre la recogida de orina, podéis contactar con:
Cohorte de Valencia: Amparo Ferrero y/o Sabrina Llop
INMA general: Carmen Freire cfreire@ugr.es y/o Sílvia Fochs silvia.fochs@isglobal.org

2.1.2. Recogida de heces

***Necesitareis los siguientes materiales*:**

Preparar el material para enviar a la familia antes de la visita INMA con:

- Documentación (ANEXO VIII. InstFamilia_HECES_Visita 15años_Val.doc)
  - Instrucciones para las familias
  - Formulario de recogida de muestras a completar por las familias
  - Carta de Bristol a completar por el niño/a y alguna pregunta más
- 1 tubo de heces con cucharilla (tubo Zymo 9 mL) para la recogida de muestra para microbiota **(tapón marrón)**.
- 1 tubo de heces con cucharilla, 60 mL, estéril, para la recogida de muestra para metales **(tapón rojo)**.
- 2 Etiquetas identificativas ("idnum", "heces", "niño/a")
- Guantes
- Bolsa de plástico tipo zip

Información para el trabajador de campo:

Antes de la visita:

1. Los padres/madres deberán ser instruidos sobre cómo recoger y guardar las muestras, por teléfono y con la carta de instrucciones. Al igual que la orina, las heces se mantendrán en nevera desde la recogida hasta la llegada al centro de salud.

2. Enviar a la familia la documentación y el material necesario, tal y como se indica arriba, vía correo postal.

En la visita:

1. Cuando las familias entregan las heces, comprobar:

   a. Que las muestras estén etiquetadas.
   b. Que en el formulario de muestras, la escala de Bristol y las preguntas que aparecen en ese mismo formulario esté correctamente cumplimentado por las familias.
   c. Para tubo zymo, asegurarse de que la muestra de heces está bien disuelta en la suspensión. Si no fuera así, agitar bien el bote cerrado durante 30 segundos (aproximadamente 10 veces) para crear una suspensión.
   d. Asegurarse que vienen refrigeradas.
   e. Poner los dos botes en el congelador (-80ºC).
   f. Rellenar Anexo III. Hoja de procesamiento de muestras, con la fecha y hora de recogida y congelación.

NOTA:
Ante cualquier duda en la recogida de heces, podéis contactar con:
María José López Espinosa lopez_josesp@gva.es
Sabrina Llop Pérez llop_sab@gva.es

2.2. EN LA VISITA

RECORDAD QUE EL ORDEN DE RECOGIDA DE MUESTRAS ES:

1. Orina (que traen las familias de casa)
2. Heces (que traen las familias de casa)
3. Recogida de pelo (tras la antropometría)
4. Citología y recogida de mucosa vaginal
5. Recogida de sangre (al final de la visita)

2.2.1. Recogida de pelo

RECORDAD: Se recoge a madres y adolescentes

Necesitareis los siguientes materiales:

- Tijeras
- Cinta adhesiva y goma de pelo
- Bolsa de polietileno, tipo de cierre "zip"
- Rotulador
- Papel filtro de laboratorio

Información para el trabajador de campo:

Previamente a la visita: Se deberá avisar a las familias de que en la ducha previa a la visita, el niño/a debe lavarse el pelo únicamente con agua, debido a que ciertos productos utilizados (mascarilla, fijadores, espumas…) pueden alterar los niveles de cortisol, aportando cortisol externo. Además, es aconsejable que no se le corte el pelo al niño/a semanas-meses antes de la recogida de la muestra, exceptuando aquellos casos en los que el corte de pelo sea necesario debido a situaciones como la infestación de parásitos (piojos). Se enviará un whatsapp a las familias con estas indicaciones un día o dos antes de la visita.

Procedimiento en la visita: El pelo deberá ser cortado cerca del cuero cabelludo por la parte posterior de la cabeza (región del vértex posterior (corona), como indica la figura), ya que ha sido el área que ha demostrado tener menos coeficiente de variación.

1. Recoger 2 mechones de pelo de la región posterior. La enfermera o el trabajador de campo recogerá aproximadamente 70 mg de pelo para cada mechón. Se cortan a 1 mm del cuero cabelludo, y lo hará lo más discretamente posible, evitando parches obvios (ver figura).

En caso de que el niño/niña tenga el pelo corto, deberá recogerse del área frontal cortando mechones pequeños en distintos puntos.

2. Almacenar el pelo.

Las muestras de pelo serán empaquetadas en un papel con la identificación del niño/a. El empaquetado en papel sirve para:

- Identificar la raíz: la raíz quedará completamente cubierta (ver abajo) y el papel se marcará con una R.
- Evitar la electricidad estática que aparece si se almacenan directamente en la bolsa de plástico

3. Guardar el pelo envuelto en papel, y dentro de una bolsa de polietileno con cierre tipo "zip" identificada con una etiqueta (ver sección etiquetaje de la muestra). Guardar a temperatura ambiente en una caja.

4. Rellenar el ANEXO I. Hoja recogida examen clínico y muestras de sangre y pelo.pdf

NOTA:
Ante cualquier duda sobre la recogida de pelo, podéis contactar con:
Sabrina Llop y/o Marisa Rebagliato.

2.2.2 Citología de la madre *(opcional, si participa en el estudio)*

***Necesitareis los siguientes materiales*:**

- Guantes.

- Espéculo.

- Cepillo endo-exocervical.

- Frasco con líquido conservante.

- Hoja de solicitud de estudio HPV (a través de Igestlab) y hoja de solicitud de estudio citológico (formato papel).

INDICACIONES ANTES DE LA PRUEBA

- Abstenerse de tener relaciones sexuales al menos 48h antes de la prueba.
- Haber finalizado el periodo menstrual por lo menos 5 días antes de la prueba.
- Lavarse externamente con agua y jabón, pero no realizar lavados internos por lo menos 2 o 3 días antes de la prueba.
- No usar tratamientos por vía intravaginal en 2-3 días antes a la prueba (óvulos, espermicidas, cremas).

Estas indicaciones antes de la prueba se envían por correo a las madres (ANEXO IX. Instrucciones madres_CERVICO-VAGINAL.doc).

PROTOCOLO DE RECOGIDA DE MUESTRA CERVICO-VAGINAL

La realización de la toma de la muestra para la citología líquida requiere unos requisitos previos de preparación de las pacientes así como de procesado de la muestra recogida, que se especifican a continuación.

Información para el/la enfermero/a o el trabajador de campo:

- Informar del procedimiento a realizar.
- Mantener la intimidad de la paciente.
- Colocar a la paciente en posición ginecológica, en un sillón/camilla adecuada al efecto.
- Situar el foco luminoso para visualizar de forma adecuada la vagina y el cuello uterino.
- Lubricar (opcional) el espéculo con unas gotas de suero salino fisiológico.
- Separar los labios mayores con el dedo pulgar y el índice de la mano no dominante, para ampliar el introito. Introducir el espéculo suavemente hasta el fondo de la vagina en dirección hacia el sacro.
- Abrir suavemente el espéculo hasta visualizar completamente el cérvix y fijar el espéculo.
- Si hay exceso de mucosidad/flujo retirarlo previamente antes de recoger la muestra.
- Introducir el cepillo endo-exocervical para recoger la muestra (girar en sentido horario 5 veces) y después introducirlo en el líquido fijador.
- Agitar vigorosamente en el líquido unas 10 veces en vueltas circulares, presionando a la vez contra el fondo del recipiente. No separar y dejar la cabeza del cervex brush en el vial.

- Retirar el cepillo y cerrar el frasco contenedor.
- Retirar el espéculo suavemente e informar a la paciente sobre el procedimiento establecido para la obtención de los resultados.
- Etiquetar el frasco con el número de muestra que se enviará al hospital. Apuntar número de muestra en ANEXO I. MADRES. Hoja de examen clínico y muestras de sangre y pelo.pdf

2.2.3. Toma y autotomas de microbiota vaginal

Necesitareis los siguientes materiales:

- Guantes
- Frasco Swab con escobillón

Número de tomas

Se van a recoger tres muestras de microbiota vaginal (visita, 9 meses y 18 meses). La muestra en la visita la recoge la enfermera al mismo tiempo que realiza la citología siguiendo el procedimiento descrito a continuación y aprovechando la posición en la camilla de exploración ginecológica. Tras la primera visita la enfermera explicará la técnica para las autotomas.

Protocolo de recogida

1) Lávese las manos con agua y jabón.

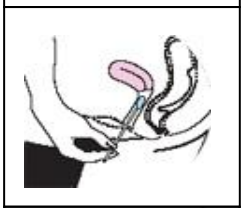
2) Coja el tubo de recogida de muestra.

3) El tubo contiene líquido así que hay que tener cuidado de no derramarlo. Quite el tapón, coloque el tubo de pie y el tapón boca arriba sobre una superficie plana para que no se ensucie el lado que entrará en contacto con el tubo.

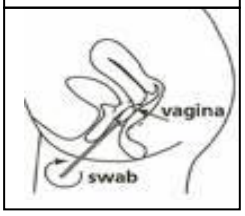
4) Saque el hisopo (*swab*) de su envoltorio por el mango, teniendo cuidado de no tocar el extremo mullido.

5) Con la mano izquierda (o derecha si es zurda) separe los labios vaginales.

6) Inserte el hisopo unos 5 cm en el interior de la vagina, como si se tratara de un tampón. Tenga cuidado de no tocar con la punta del hisopo ninguna otra área de la zona genital, solo la vagina.



7) Gire el hisopo en círculo varias veces en el interior de la vagina.



8) Retire el hisopo de la misma manera en que lo introdujo. De nuevo, tenga cuidado de no tocar con la punta del hisopo ninguna otra área de la zona genital.

9) Coloque el hisopo en el tubo con el líquido. El mango del hisopo tiene marcada una línea en su zona media. Rompa el hisopo por esta línea doblando el mango hasta que se quiebre, para que quepa en el interior del tubo.

10) Tape el tubo enroscando firmemente el tapón, asegurándose de no derramar líquido.

11) Escriba sobre el tubo la fecha de la toma de muestra.

12) Poner los botes en el congelador (-80ºC): solamente en la muestra recogida en la visita. Para las muestras a los 9 y 18 meses, ver instrucciones de almacenamiento y congelación más abajo.

13) Rellenar el ANEXO I. MADRES. Hoja de examen clínico y muestras de sangre y pelo.pdf

Para la recogida de muestras a los 9 y 18 meses:

Necesitaréis los siguientes materiales:

Para la recogida de microbiota vaginal (autotoma) se enviará a cada participante antes de los 9 y 18 meses desde que acudió a la visita:

- Documentación
  - Instrucciones para la autotoma.
  - Cuestionario Madres a los 9/ 18 meses
- Kit para la recogida de muestra de microbiota vaginal (guantes y frasco swab)
- Etiquetas identificativas

Antes de cada autotoma (9 y 18 meses):

1. Se llamará a las madres para recordar el seguimiento a los 9 y 18 meses. En la llamada se volverá a explicar el procedimiento de recogida de la autotoma y se informará sobre el procedimiento de envío de la muestra.

2.2.4. Extracción de sangre

RECORDAD **Se recoge a adolescentes y madres.**

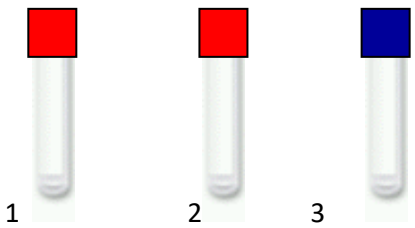
Necesitareis los siguientes materiales:

- Para la venopunción:
  - Kit para la extracción de sangre Vacutainer, para 1 individuo:
    - *Tubos vacutainer: Azul EDTA, Rojo CAT, Rojo Z (ver Figura abajo).*
    - *Palomilla de calibre 23G para niños/as y 21G para madres*
  - Gradilla para soporte de tubos
  - Cinta compresora
  - Guantes
  - Esparadrapo de papel
  - Envase para desechos clínicos

- Tubos para la recogida de sangre para 1 individuo (ver Figura de abajo).

Información para el/la enfermero/a o el trabajador de campo:

- La sangre debe ser recogida por el profesional usando métodos asépticos.
- El lugar para la extracción de sangre debe ser un sitio tranquilo, si puede ser aislado y con el equipo necesario a mano.
- Los vacutainers de suero (**rojos**) y los tubos EDTA (**azul**) deberán ser llenados por completo. Invertir 6-7 veces los tubos tras la recogida. Refrigerar a 4ºC durante 1 hora.
- La recogida de los 3 tubos debe ser en el siguiente ORDEN:



1. Tubo de suero (**tapón rojo, CAT, 4 mL).** Con activador de coagulación. Plástico.
2. Tubo de suero (**tapón rojo, Z, 5 mL).** De vidrio.
3. Tubo EDTA (**tapón azul oscuro, EDTA, 6 mL)**

- Registrar el día y la hora de la extracción en los ANEXOS I. Hoja de examen clínico y muestras de sangre y pelo.pdf (para madre y adolescente).

NOTA: Ante cualquier duda sobre la recogida de sangre, podéis contactar con:
Cohorte de Valencia: Amparo Ferrero y/o Sabrina Llop
INMA general: Sílvia Fochs silvia.fochs@isglobal.org y/o Mariona Bustamante).

2.3. ETIQUETADO

IMPORTANTE:

El etiquetado de la muestra ha de **seguir rigurosamente las instrucciones** establecidas en este protocolo. De esta manera garantizaremos un correcto uso e identificación de la muestras.

Se considera **MUESTRA** al material que aún no se ha procesado y del que aún no se han obtenido alícuotas y que procede directamente del sujeto (Ej. cabello, sangre …).

Todas las muestras que se congelarán a -80ºC han de ser rotuladas con **etiquetas criogénicas** resistentes a dicha temperatura para evitar que se despeguen y caigan del envase (incluidos los botes de heces).

Se imprimen en el Laboratorio del Biobanco de FISABIO (contactar con Andrea Ahicart).

Código:

El código de la muestra se compone de información en formato clave para que todas las cohortes INMA puedan identificar correctamente que tipo de muestra se manipula en futuros análisis.

El código se compone de 6 campos separado por un guión bajo, excepto el último que va directamente seguido:

Cohorte_visita_sujeto_ID_origen-muestra + número-muestra

1 2 3 4 5 6

Ej: VAL_15y_C_0001_KA01

1 2 3 4 5 6

Campo 1: Cohorte
- **VAL:** Valencia

Campo 2: Visita
Ej. VAL_**15y**_C_0001_KA01 → Visita de los 15 años.

Campo 3: Sujeto
- **C** (de Child): Niño
- **M** (de mother): Madre

Campo 4: ID del participante (o idnum de INMA). Debe constar con 4 digitos (ej. 0001)

Campo 5: tipo de la muestra, según su nombre en inglés
- **H:** Pelo
- **KA:** Heces para microbiota; **KB:** Heces para metales

- **U:** Orina
- **CIT:** Citología
- **MV:** Microbiota vaginal

En el caso de sangre, esta se denomina en función del tubo usado para la extracción:

- **E:** Tubo EDTA, Ej: VAL_15y_C_0656_E01
- **V:** Tubo Silica vacutainer plastic o vacutainer cristal, Ej. VAL_15y_C_0656_V01

Campo 6: número de muestra recogida
En el caso que se recoja más de una muestra del mismo tipo y del mismo sujeto y en la misma visita, éstas se diferenciaran según este campo con 01, 02, 03…

Ej. VAL_15y_C_0656_**U01**, VAL_15y_C_0656_**U02**, etc

Finalmente, en el caso de las muestras procedentes de un **contenedor perecedero como en el caso de orina y/o tubos para la extracción de sangre**, pueden ser identificados con un rotulador permanente o una etiqueta provisional ya que luego son contenedores desechables. Para orina, hay unas etiquetas más sencillas y claras que se envían a los domicilios para que los participantes etiqueten los botes:

N0031 ORINA NOCHE MADRE	N0031 ORINA MAÑANA MADRE	N0031 ORINA NOCHE HIJO/A	N0031 ORINA MAÑANA HIJO/A
N0063 ORINA NOCHE MADRE	N0063 ORINA MAÑANA MADRE	N0063 ORINA NOCHE HIJO/A	N0063 ORINA MAÑANA HIJO/A

Las muestras que no necesitan procesamiento, y que tendrán etiqueta definitiva son:

- Pelo: **VAL_15y_C_0001_H01 / VAL_15y_M_0001_H01**
- Heces: **VAL _15y_C_0001_KA01 y VAL _15y_C_0001_KB01**
- Microbiota vaginal: **VAL _15y_M_0001_MV01**
- Citología: **VAL _15y_M_0001_CIT01**

Para imprimir las etiquetas en la impresora de criotinta del biobanco es necesario:

- Preparar una tabla Excel como la siguiente, que debe contener los datos de la etiqueta por columnas (hasta 4). El documento debe estar en formato .xls.

- Hay una copia del Excel en el escritorio del ordenador de Biobanco (Contacto: Andrea Ahicart (ahicart_and@gva.es)).

- En el momento de la impresión, llevar etiquetas al biobanco.

- En Ambiente y Salud se disponen de 4 cartuchos de tinta, preguntar a Andrea si necesitan alguno.

Tabla

Código General	IDNUM y Muestra
VAL_15y_C	**0001_H01**
VAL_15y_C	**0001_H02**
VAL_15y_C	**0001_H03**

Saldrán 3 etiquetas:

Etiqueta 1:

VAL_15y_C
0001_H01

Etiqueta 2:

VAL_15y_C
0001_H02

Etiqueta 3:

VAL_15y_C
0001_H03

Importante: *Dejar un espacio en blanco al final de la etiqueta para añadir la fecha de recogida*

NOTA:

Para cualquier duda referente al código de la etiqueta sobre heces, microbiota vaginal o citología, contactar con: Amparo Ferrero (ferrero_ampsan @gva.es)

Para cualquier otra duda referente al código de la etiqueta contacta con:

Cecilia Persavento (cecilia.persavento@isglobal.org).

3. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

3.1. PROCESAMIENTO

NOTA PARA EL POSTERIOR ANÁLISIS:

Se han guardado 2 juegos completos del material utilizado en la recogida y el procesamiento en el laboratorio para hacer un control negativo (blanco).

3.1.1. Orina

Material:

- Pipeta pasteur 10 mL
- Criotubos de 5 mL de polipropileno (para guardar 5 mL de orina).
- Criocajas
- Gradillas (prestado CS Paterna)
- Etiquetas normales (impresión en Ambiente y Salud y envío a casa)
  Crioetiquetas para crioviales (impresión en Biobanco, llevar cada día a CS Paterna)
- Recipiente para mezcla de mínimo 20 mL con tapa (bote orina)

Procesamiento:

1. Las muestras que las familias han traído con ellos se guardarán en frigorífico o en neverita con acumulador de frío hasta su procesamiento.
2. En el momento del procesamiento, permitir que alcancen la temperatura ambiental e invertir la muestra varias veces para que se vuelva homogénea. Se debe alicuotar manteniendo el orden especificado en el ANEXO IV. Esquema de alícuotas de Sangre y Orina:
   a. Primero, mezclar en un recipiente 10 mL de orina de la noche con 10 mL de orina de la mañana. Agitar bien y generar 4 alícuotas de 5 mL de la mezcla (en el caso de la madre, 2 alícuotas).
      NOTA: Si no hay suficiente volumen, hacer la mezcla con un volumen menor pero equivalente entre ambas muestras.
   b. Segundo, alicuotar 4 alícuotas de 5 mL de la orina de la mañana.
   c. Tercero, alicuotar 4 alícuotas de 5 mL de la orina de la noche.
3. Etiquetar las alícuotas según se indica en el apartado 2.3 (etiquetas impresas en biobanco).
4. Al acabar el procesamiento, rellenar el formulario de registro de laboratorio ANEXO III_Hoja procesamiento de muestras.docx.
5. Congelar a -80ºC las alícuotas en las cajas correspondientes (madre/niño).

3.1.2. Sangre

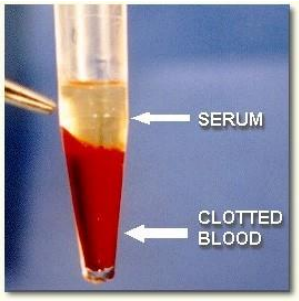
Material:

- Centrífuga 5702R.
- Tubos para la centrífuga (para segunda centrifugación sangre de Tubo EDTA): Tubo Falcon de 15 mL
- Puntas con filtro de 1000 µL
- Criotubos de rosca interna (1.2 mL)
- Criocajas
- Gradillas (prestado CS Paterna)
  Etiquetas (impresión en Biobanco, llevar cada día a CS Paterna)

Procesamiento:

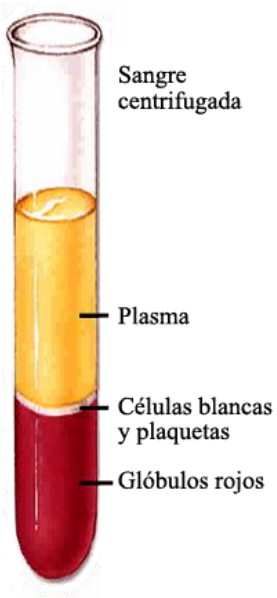
Ten preparado el documento ANEXO III_Hoja procesamiento de muestras.docx y comienza a rellenar lo que corresponda. Procesa las muestras siguiendo las instrucciones para cada tubo resumidas en el documento ANEXO IV. Esquema de alícuotas de Sangre y Orina.

Tubos silica ROJO (los dos): para suero



1. Una vez recogida la sangre en los dos tubos silica (tapón rojo), invertirlos suavemente 6 ó 7 veces.
2. Dejar coagular durante 1h en hielo.
3. Centrifugar a 2500 g durante 15 minutos.
4. Alicuotar el suero del tubo de silica de plástico en 4 alícuotas de 0.5 ml en criotubos de 1 ml previamente etiquetados.
   De *VAL_15y_C_0001_S01* a *VAL_15y_C_0001_S04*
5. Alicuotar el suero del tubo de silica de vidrio en 5 alícuotas de 0.5 ml en criotubos de 1 ml previamente etiquetados:
   De *VAL_15y_C_0001_S05* a *VAL_15y_C_0001_S09*
6. Rellenar del formulario de registro de las muestras. Registrar la hora exacta de extracción de la sangre (venopunción), centrifugación y almacenaje a -80C. Añadir comentarios si hay desviaciones respecto el protocolo inicial.
7. Congelar a -80C las alícuotas en las cajas correspondientes.

Tubo EDTA vacutainer: para plasma, buffy coat (para ADN) y células rojas



1. Una vez recogido el tubo EDTA, invertir suavemente 6 ó 7 veces.
2. Alicuotar 1.5 ml de sangre total en 3 alícuotas de 0.5 ml en criotubos de 1 ml previamente etiquetados.
   De *VAL_15y_C_001_W01* a *VAL_15y_C_001_W03*
3. El resto de sangre del tubo EDTA se puede dejar a temperatura ambiente por un máximo de 1h antes de ser centrifugado.
4. Centrifugar el tubo de EDTA (tapón azul oscuro) con el resto de la sangre en un rotor horizontal a 1750 g durante 10 minutos.
5. Transferir el sobrenadante (plasma), que representa aproximadamente el 50% del volumen del tubo inicial, a un nuevo tubo falcon de 15 ml pre-etiquetado. Dejar un volumen pequeño de plasma sobre la capa de buffy coat (capa blanca/gris de *células blancas y plaquetas*) para asegurarnos que no transferimos nada del buffy coat al tubo falcon.

   Nota! No descartar el tubo EDTA.
6. Centrifugar el tubo falcon con el plasma a 2000 g durante 10 minutos.
7. Alicuotar el plasma obtenido en la segunda centrifugación en 3 alícuotas de 0.5 ml en criotubos de 1 ml previamente etiquetados.
   De *VAL_15y_C_001_P01* a *VAL_15y_C_001_P04*
8. Transferir el buffy coat (capa blanca/gris) y un pequeño volumen de las células rojas del tubo EDTA a un criotubo de 1 ml previamente etiquetado. Asegúrate de coger todo el buffy coat. El pequeño volumen de plasma sobre el buffy coat también se puede transferir.
   VAL_15y_C_001_A01
9. Alicuotar el resto del contenido del tubo EDTA (células rojas) en 3 alícuotas de 0.5 ml en criotubos de 1 ml previamente etiquetados.
   De *VAL_15y_C_0001_RC01* a *VAL_15y_C_0001_RC03*
10. Rellenar del formulario de registro de las muestras. Registrar la hora exacta de extracción de la sangre (venopunción), centrifugación y almacenaje a -80ºC. Añadir comentarios si hay desviaciones respecto el protocolo inicial.
11. Congelar a -80ºC las alícuotas en las cajas correspondientes.

3.2. Etiquetado de alícuotas

IMPORTANTE:

El etiquetado de las alícuotas ha de **seguir rigurosamente las instrucciones** establecidas en este protocolo para garantizar la correcta identificación de alícuotas.

Se considera **ALÍCUOTA** una parte del **volumen procesado de una muestra**. Esta diferenciación es especialmente importante en el caso de la sangre y de la orina puesto que los tubos o contenedores iniciales van a derivar en otros de menor cantidad.

Todas las alícuotas que se congelaran a -80ºC han de ser rotuladas con **etiquetas criogénicas** resistentes a dicha temperatura para evitar que se despeguen y caigan del envase. Se imprimen en el Laboratorio del Biobanco de FISABIO (Contactar con Andrea Ahicart).

Código:

El código de la alícuota se compone de información en formato clave para que todas las cohortes INMA puedan identificar correctamente que tipo de alícuota se manipula en futuros análisis. El código se compone de 6 campos separado por un guión bajo, excepto el último que va directamente seguido:

Cohorte_visita_sujeto_ID_origen-muestra + número-alícuota
1 2 3 4 5 6

Ej: VAL_15y_C_0001_A01
1 2 3 4 5 6

Significado de los 4 primeros campos en apartado 3.2.

Campo 5: tipo de la muestra, según su nombre en inglés

- **U:** Orina
  - **UM:** orina mañana
  - **UN:** orina noche
  - **UC:** orina combinada = orina mañana + orina noche
  - **UV:** orina recogida en la visita
- Sangre, ésta se denomina en función del tipo de subproducto derivado:
  - **W:** sangre total
  - **P:** plasma
  - **S:** suero
  - **A:** buffy coat
  - **RC:** células rojas

Campo 6: número de alícuota
En el caso que se genere más de una alícuota del mismo tipo y del mismo sujeto y en la misma visita, éstas se diferenciaran según este campo con 01, 02, 03…
Ej. VAL _15y_C_0656_W01, VAL_15y_C_0656_W02, etc

Alícuotas generadas:

- ORINA:
  a. Orina mañana:
     - VAL_15y_C_0001_UM01
     - VAL _15y_C_0001_UM02
     - VAL _15y_C_0001_UM03
     - VAL _15y_C_0001_UM04
  b. Orina noche:
     - VAL _15y_C_0001_UN01
     - VAL _15y_C_0001_UN02
     - VAL _15y_C_0001_UN03
     - VAL _15y_C_0001_UN04
  c. Orina combinada:
     - VAL _15y_C_0001_UC01
     - VAL _15y_C_0001_UC02
     - VAL _15y_C_0001_UC03
     - VAL _15y_C_0001_UC04
  d. Orina visita:
     - VAL _15y_C_0001_UV01
     - VAL _15y_C_0001_UV02
     - VAL _15y_C_0001_UV03
     - VAL _15y_C_0001_UV04

- SANGRE:
  a. Sangre total:
     - VAL _15y_C_0001_W01
     - VAL _15y_C_0001_W02
     - VAL _15y_C_0001_W03
  b. Buffy coat:
     - VAL _15y_C_0001_A01
  c. Red Cells:
     - VAL _15y_C_0001_RC01
     - VAL _15y_C_0001_RC02
     - VAL _15y_C_0001_RC03
  d. Plasma:
     - VAL _15y_C_0001_P01
     - VAL _15y_C_0001_P02
     - VAL _15y_C_0001_P03
     - VAL _15y_C_0001_P04
  e. Suero plástico:
     - VAL _15y_C_0001_S01
     - VAL _15y_C_0001_S02
     - VAL _15y_C_0001_S03
     - VAL _15y_C_0001_S04
  f. Suero Cristal:
     - VAL _15y_C_0001_S05
     - VAL _15y_C_0001_S06
     - VAL _15y_C_0001_S07
     - VAL _15y_C_0001_S08
     - VAL _15y_C_0001_S09

NOTA:
Para cualquier duda referente al código de la etiqueta contacta con:
Cohorte Valencia: Sabrina Llop y Amparo Ferrero
INMA general: Cecilia Persavento (cecilia.persavento@isglobal.org).

3.3. Almacenamiento

Temperatura:

PELO: Guarde el pelo bien etiquetado a temperatura ambiente dentro de una caja resistente y ordenados correctamente.

SANGRE Y ORINA: Almacene las alícuotas después de su procesamiento, tan pronto como sea posible, a -80ºC.

NOTA: *si no hubiera espacio a -80ºC, pregunta a la responsable del biobanco (Sabrina Llop) para valorar si se pueden guardar a -20ºC.*

HECES Y MICROBIOTA VAGINAL: las heces deben ser almacenadas directamente a -80ºC.

NOTA: *En el caso del tubo Zymo (para determinación de microbiota), mezclar suavemente el tubo recogido por la familia antes de guardarlo a -80ºC.*

Las determinaciones de microbiota intestinal y vaginal se realizarán en el Área de Genómica y Salud (contacto: Nuria Jiménez). Pero se guardarán a -80ºC en el Biobanco.

CITOLOGÍA: El frasco ThinPrep se mantiene a temperatura ambiente hasta que se envía al Hospital Arnau y allí lo conservan a 4ºC en nevera.

Orden de las muestras en las cajas:

- En el CS Paterna no es necesario seguir un orden determinado al guardar las alícuotas. Solo es necesario asegurarse de separar en cajas distintas las muestras de madre y niño.
- En Biobanco FISABIO se repartirá cada alícuota en una caja.

3.4. Registro en biorepositorio

Pendiente en Valencia

Toda la información recogida en plantillas o formularios debe registrarse informáticamente.

Por otro lado, os proponemos empezar a usar la herramienta informática "Biorepositorio" creada en ISGlobal. El "Biorepositorio" permite:

1. Registrar información de las muestras biológicas: tipo de muestra, volumen, tubo de recogida, número de alícuotas y ubicación en los congeladores

2. Hacer tracking de las muestras enviadas a otros centros/laboratorios colaboradores

Pensamos que esta información es de gran ayuda para el manejo de las muestras de la cohorte INMA.

La información de las muestras debe subirse al "Biorepositorio" siguiendo un formato concreto.

NOTA:

Si queréis formación para empezar a usar el "Biorepositorio", contactad con Cecilia Persavento (cecilia.persavento@isglobal.org) o Susana Gros (susana.gros@isglobal.org).