

Consideraciones sobre la fase preanalítica en los estudios moleculares de las hemopatías malignas

Considerations on preanalytical phase in molecular studies of hematological malignancies

AL DIRECTOR:

Para muchos laboratoristas, la etapa previa al procesamiento analítico de una muestra, denominada fase preanalítica, constituye una gran fuente de preocupación¹. Esto resulta comprensible si se tiene en cuenta la trascendencia de esta etapa en la garantía de la calidad de los resultados del estudio y en el hecho de que una parte considerable de esta fase transcurre fuera del área del laboratorio^{2,3}. Junto con la etapa posanalítica, esta fase se considera más vulnerable a los errores de laboratorio que la fase analítica³.

En los laboratorios de biología molecular (LBM) que se vinculan al diagnóstico de oncogenes hematológicos, esta fase comprende la emisión de la orden del estudio por el médico de asistencia, la preparación del paciente y la obtención, transportación y conservación de la muestra. En el caso de la obtención del ácido ribonucleico (ARN), algunos autores la extienden hasta la estabilización con isotiocianato de guanidino (GTC) o con agentes reductores como el β -mercaptoetanol, que producen la inactivación de las ARNasas, para conservarlo a -20°C durante largos periodos hasta la extracción⁴⁻⁶. Sin embargo, actualmente se emplean métodos de extracción del ARN que, por sus características tecnológicas, permiten obtenerlo casi de manera inmediata⁷.

La comprensión de la importancia de la fase preanalítica en la biología molecular por parte del personal médico que indica los estudios moleculares para el diagnóstico y evaluación de las hemopatías malignas resulta vital para lograr resultados satisfactorios. A menudo, el desconocimiento de los datos que debe tener la orden médica; la inadecuada toma de muestra; el uso incorrecto del anticoagulante y la desproporción entre este y la sangre; así como la inapropiada transportación y conservación de la muestra, conspiran con el resultado final, lo que da lugar al rechazo inicial del espécimen o a la degradación del material genético presente en la muestra.

Este es un problema al que se enfrenta habitualmente el LBM del Instituto de Hematología e Inmunología, donde se reciben solicitudes de estudios moleculares del propio centro y del resto

del país. La centralización de estos servicios, que requieren tecnologías altamente costosas así como personal calificado, constituye un gran desafío para la transportación y conservación de las muestras, que en ocasiones llegan desde regiones muy distantes, lo que incrementa las posibles causas de errores en el laboratorio².

Una correcta solicitud de análisis es crucial, toda vez que en ella se vierten datos que aportan información útil que permite al analista conocer la identidad y procedencia del paciente, la existencia de estudios anteriores, así como establecer aquellos que se realizarán a partir del diagnóstico inicial.

El modelo de análisis para la realización de estudios moleculares se debe encabezar con el nombre de la prueba. Obviamente, no deben faltar los datos identificativos del paciente: nombres y apellidos, edad, sexo, número de carné de identidad. También se deberán recoger otros datos de interés como la fecha de emisión, el centro asistencial que remite al paciente, el tipo de muestra (sangre venosa o medular), la impresión diagnóstica, la identificación y firma del médico que indica el estudio¹. En aquellos casos en los que el diagnóstico no esté esclarecido es necesario que se aporten datos clínicos que ayuden a diseñar la estrategia de trabajo y la secuencia de exploraciones moleculares con esa muestra. Del mismo modo, para facilitar el intercambio entre el médico de asistencia y el personal del laboratorio resulta oportuno incluir en la orden el correo electrónico o el teléfono del médico.

En los estudios moleculares se realiza la extracción de los ácidos nucleicos del paciente, por lo que factores como la dieta, el ejercicio físico, el horario de toma de muestra, etc, no influyen en la calidad de los resultados como ocurre en otras pruebas de laboratorio clínico.

En nuestro medio, los análisis de biología molecular vinculados a enfermedades oncohematológicas se realizan en sangre venosa o medular. La sangre venosa, que se obtiene por punción de una vena periférica de fácil acceso como la del pliegue del codo, se emplea generalmente para la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN), para la exploración de la presencia de la mutación JAK2V617F y del quimerismo en los pacientes que han sido trasplantados con células hematopoyéticas. La sangre que procede de médula ósea, con mayor contenido de células mononucleadas, es la recomendada para la extracción del ARN que se destina para el estudio molecular de las leucemias.

La toma de muestra se debe realizar con precaución para evitar la contaminación con material genético ajeno al paciente. El uso de guantes es imprescindible desde este primer momento, en particular cuando se trabaja con ARN para eludir las ARNasas presentes en la piel⁶. Del mismo modo, deben evitarse todas las causas de error relacionadas con esta etapa, que van desde una incorrecta identificación de la muestra hasta su hemólisis^{1,2}. Por ello, el personal que ejecute la toma de muestra debe estar calificado para realizar dicho proceder.

Hay que tener presente que todo el material gastable a emplear sea nuevo; de no ser así, se corre el riesgo de contaminación con material genético ajeno o la presencia de ARNasas⁵. Adicionalmente, se recomienda el uso de tubos con tapa para la recolección de la sangre y no abrir más de uno a la vez.



La selección del anticoagulante adecuado, la proporción entre este y la muestra, así como la mezcla con la sangre, resultan esenciales en el proceso ¹. Como anticoagulante se emplean las sales, disódica (Na₂) o dipotásicas (K₂), del ácido etilén diaminotetracético (EDTA), que no producen inhibición de la Taq ADN polimerasa durante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a diferencia de la heparina⁵. En la práctica, se emplean 0,5 mL de EDTA.Na₂ (0,15 M) por cada 10 mL de sangre venosa⁸ o 5-8 mL de sangre medular. La preparación del EDTA y su colocación en los tubos debe efectuarse meticulosamente. Se pueden usar tubos al vacío que contengan EDTA.K₂, en la proporción sangre/anticoagulante que fija el fabricante. La sangre se debe mezclar con el anticoagulante de forma suave, sin agitar, para evitar la hemólisis.

Cuando se pretende estudiar los transcritos de ARN, los tubos deben colocarse en hielo inmediatamente después de añadir la sangre, para mantener una temperatura entre 4 y 8°C, sin llegar a congelarse. Las muestras deben conservarse así hasta su arribo al laboratorio, donde se procesan y estudian. Esta precaución permite inhibir las ARNasas presentes en las células, pues la congelación y descongelación de las muestras destruye las membranas celulares quedando el ARN expuesto a la acción de las ARNasas. La extracción de ARN debe realizarse en las primeras 48 horas de tomada la muestra⁹, aunque otros estudios fijan este período en 24 horas¹⁰ por lo que se recomienda coordinar previamente el envío de las muestras.

Para lograr la preservación y distribución de las muestras a temperatura ambiente, sin causar daños que afecten de forma irreversible al material genético se emplean diversos métodos ¹¹. La introducción de los tubos PAXgene para RNA en médula ósea (PAXgene Bone Marrow RNA Tube) permite optimizar la estabilización, conservación y transportación del ARN desde todas las provincias del país. Solo se requieren 2 mL de sangre medular y puede permanecer a temperatura ambiente (15-25°C) hasta 3 días, que lo hace ideal para el transporte y conservación de las muestras desde regiones apartadas.

Una vez que la muestra llega al LBM corresponde al personal que allí labora realizar una cuidadosa evaluación de todos los parámetros mencionados y decidir si cumple los requisitos de calidad para su aceptación o rechazo.

El estricto cumplimiento de estas normas por parte del personal de salud que atiende directamente al paciente posibilita garantizar, de conjunto con el LBM, la calidad de los resultados. Hay que recordar que ningún resultado puede ser mejor que la muestra de la cual se obtuvo ¹.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Suardiáz Pareras J, Cruz Rodríguez C, Colina Rodríguez A. Laboratorio Clínico. La Habana: Ciencias Médicas; 2004.
2. Plebani M, Sciacovelli L, Aita A, Chiozza ML. Harmonization of pre-analytical quality indicators. *Biochimica Medica* 2014;24(1):105-13.

3. Plebani M. Quality Indicators to Detect Pre-Analytical Errors in Laboratory Testing. *Clin Biochem Rev.* 2012;33(3):85-8.
4. Neumaier M, Braun A, and Wagener C. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. *Clin Chem.*1998; 44:12-26.
5. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning A laboratory Manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1982.
6. Coleman WB, Tsongalis GJ. *Molecular diagnostics: for the clinical laboratorian.* New Jersey: Human Press; 2006.
7. Díaz Alonso C, Garrote Santana H, Amor Vigil AM, Suárez González Y, Fernández Martínez L, Ruiz Moleón V. Nuevos métodos de extracción de ácidos ribonucleicos (ARN): herramientas básicas en la biología molecular. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemot.* 2015;31(4):466-69.
8. Müller MC , Hördt T , Paschka P , Merx K , La Rosée P , Hehlmann R , et al. Standardization of preanalytical factors for minimal residual disease analysis in chronic myelogenous leukemia. *Acta Haematol.* 2004; 112(1-2):30-3.
9. Malentacchi F , Pazzagli M , Simi L , Orlando C , Wyrich R , Günther K , et al. SPIDIA-RNA: second external quality assessment for the pre-analytical phase of blood samples used for RNA based analyses. *PLoS One.* 2014 Nov;9(11):e112293.
10. Stanoszek LM , Crawford EL , Blomquist TM , Warns JA , Willey PF , Willey JC . Quality control methods for optimal BCR-ABL1 clinical testing in human whole blood samples. *J Mol Diagn.* 2013 May;15(3):391-400.
11. Cayuela JM, Mauté C, Fabre AL, Nibourel O, Dulucq S, Delabesse E, et al. A novel method for room temperature distribution and conservation of RNA and DNA reference materials for guaranteeing performance of molecular diagnostics in onco-hematology: a GBMHM study. *Clin Biochem.* 2015 Oct;48(15):982-7. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2015.04.004.

Lesbia Fernández Martínez, Ana María Amor Vigil, Carmen A Díaz Alfonso, Vera Ruiz Moleón, Heydis Garrote Santana, Omaidá Blanco Ponce

Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

Recibido: abril 05, 2016.
Aceptado: agosto 13, 2016.



Dra Lesbia Fernández.Martínez. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, La Habana, CP 10800, CUBA.
Email: rhematologia@infomed.sld.cu