Instrucción técnica

Estudios citológicos

Modificaciones		
Revisión	Fecha	Descripción
A	15/07/09	Primera edición
B	03/05/10	Revisión.

Preparado	Revisado	Aprobado
Nombre: Magdalena García Bonafé Cargo: Jefe de Servicio A. Patológica Fecha: 03/05/10 Firma:	Nombre: Montserrat García Minguillán Cargo: Resp. Gestión de Procesos y U. de Calidad Fecha: 03/05/10 Firma:	Nombre: Luis Alegre Latorre Cargo: Director Gerente Fecha: 03/05/10 Firma:

Instrucción técnica

Estudios citológicos

1. MATERIAL NECESARIO EN CITOLOGÍAS

- ✓ Aplicación Pat-win para Anatomía Patológica
- ✓ Petición vía Medlink
- ✓ Formulario de petición para citología general y ginecológica (papel)
- ✓ Etiquetas con números de registro botes, pinzas, hojas de bisturí, escobillones, portas, cubres,
- ✓ Pipetas desechables y pasteur, micro pipetas
- ✓ Lápiz, rotuladores, gomas de borrar, sacapuntas
- ✓ Coplin, cestillas de tinción, cristalizadores, placas de petri,
- ✓ Jeringas, agujas, gasas, papel secante, contenedores de agujas y material contaminante, papel de filtro.
- ✓ Guantes, mascarillas
- ✓ Embudo, probetas
- ✓ Centrifuga, cito centrifuga, teñidor, microscopio,
- ✓ Campana de extracción de gases
- ✓ Archivadores de portas
- ✓ Frigorífico
- ✓ Alcoholes de distinta graduación.
- ✓ AGUA DESTILADA, ORANGE, EA, HEMATOXILINA, DIFF QUICK,
- ✓ DPX
- ✓ GLICERINA
- ✓ MATERIAL NECESARIO PARA PROCESAMIENTO DE CITOLOGÍA LÍQUIDA (THINPREP): VIALES, FILTROS, CITOLYT

- La manipulación de la muestra debe realizarse tomando todas las medidas de seguridad e higiene (campana, mascarilla, delantal de plástico, gafas de protección y guantes).

- Horario de recepción de 8:00 a 14:30 en la Unidad de APA, 3er piso (entrada por el lado de hospitalización). Tubo neumático 132.

2. TIPOS DE MUESTRAS CITOLÓGICAS

- ➢ CITOLOGÍA GINECOLÓGICA
- ➢ LÍQUIDOS
  Amniótico
  Pleural, ascítico y pericárdico
  Lavado peritoneal
  Liquido cefalorraquídeo
  Otros articular…
- ➢ CITOLOGÍA RESPIRATORIA
  Esputos, cepillados, BAS y LBA
- ➢ CITOLOGÍA DIGESTIVA
  Tracto digestivo (cepillado y lavado de cepillo).
  Cepillado de colédoco
- ➢ ORINA y LAVADO VESICAL
- ➢ PAAF
- ➢ Raspados e improntas de cualquier procedencia

- Otros

3. RECOGIDA, FIJACIÓN Y TRANSPORTE

- CITOLOGÍA GINECOLÓGICA:

1-. Convencional:

a) Recogida de la muestra: debe transcurrir el menor tiempo posible entre las diferentes tomas y la fijación. El porta debe ir correctamente rotulado con lápiz con el nombre y los apellidos de la paciente.

b) Fijación y transporte: el fijador ideal es el cito spray siempre a 25-30 cm. de la muestra. Secar al aire. En este método se pueden conservar largo tiempo.

c) Se transportaran en cajas de protección específicas para portas.

2-. Líquida:

a) Recogida de la muestra e introducir la muestra directamente en el vial de PreservCyt Solution.

- ESPUTOS Y ORINAS

Las indicaciones para la recogida de esputos y orinas seriadas están en **Normas para la recogida de citología de esputos y normas para la recogida de citologías de orina** protocolo y comprende también las indicaciones directas para el paciente.

- BAS Y LBA

Remitir en fresco, en botes específicos (usado en broncoscopias).

- CEPILLADO

Pueden realizarse de varias maneras:

- Una vez extendido el material sobre los portas, éstos pueden dejarse secar al aire o bien introducir las extensiones en un bote con alcohol de 96º inmediatamente después de hacer la extensión y remitirse a APA, con la identificación del paciente en la parte esmerilada del porta.
  Lavando el cepillo en vial de PreservCyt Solution.
- Lavando el cepillo en suero fisiológico.

- LÍQUIDOS:

LÍQUIDO AMNIÓTICO: remitir en fresco lo más rápidamente posible al servicio de APA en horario de trabajo.

LAVADO PERITONEAL: Se debe especificar localización de donde se ha obtenido la muestra: saco de Douglas o fondo de saco.

LÍQUIDO PLEURAL, ASCÍTICO Y PERICÁRDICO:

a) Recogida de la muestra: dada la sedimentación celular es recomendable que el paciente realice movimientos previos a la obtención de la muestra.
Volumen recomendable 10cc.

b) Fijación y transporte: si la obtención de la muestra se realiza durante el horario laboral de APA hay que remitirla en fresco lo más rápidamente posible, especificando que la muestra está en fresco. Fuera del horario laboral hay que guardarla inmediatamente en la nevera.

LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

a) Recogida de la muestra: no debe ser traumática, en caso contrario debe indicarse en la petición. Se recogerá en:

- Tubo y guardado inmediatamente en nevera.
- Vial de PreservCyt Solution.

OTROS: Líquidos articulares y procedentes de cualquier otra cavidad.

Se recogerán en tubos y se guardarán en nevera.

- PAAF:

Las distintas posibilidades de recogida, fijación y transporte están detalladas en la **IT-75-APA-10F Para PAAF**

4. PROCESAMIENTO

Se realizará durante toda la mañana. Con la finalidad de dejar al final de la jornada el mínimo de muestras sin procesar hasta su fijación en alcohol.
El citotécnico revisará a primera hora de la mañana las muestras que debe ser repetidas (Nota en PatWin) y lo comunicará al TEAP.
Antes de cualquier procesamiento citológico los portas se identificaran con su correspondiente número de registro de APA con lápiz y en la parte esmerilada del porta.
Si las muestras son urgentes o no se les ha asignado nº de registro, se identificarán los portas con el NHC del paciente, pendiente del nº de registro interno de APA.

En general las muestras pueden procesarse de forma convencional o por el método o protocolo ThinPrep.
Se indicará en la hoja de solicitud el tipo de procesamiento y las extensiones que se realizan.

- **CITOLOGÍA GINECOLÓGICA:**

a) Convencional:

1- Eliminar cito spray con alcohol de 96º durante 1 hora.
2- Lavar en agua corriente hasta que deje de salir espuma.
3- Tinción de Papanicolaou (ver capítulo 6)
4- Montar

b) Líquida:

1- Poner en funcionamiento el procesador de Thinprep, programa 4.
2- Dejar reposar el material en alcohol 15 minutos.

3- Tinción de Papapnicolau
4- Montar
5- Con el material sobrante se realizará en procesamiento para la detección de HPV (ver ANEXO)

- **ESPUTOS Y BAS:**

a) Convencional:

1- Seleccionar la zona más consistente del material (ayudando con pipeta, bisturí o pinzas)
2- Colocarlo sobre los portas y deshacerlo, extendiéndolo homogéneamente.
3- En esputos hacer 4 extensiones y en BAS 2.
4- Dejar secar, un poco al aire y fijar en alcohol de 96º (tiempo mínimo de fijación 30 minutos)
5- Teñir con Papanicolau.
6- Montar

b) Líquida:

1- Seleccionar la zona más consistente del material (ayudando con pipeta, bisturí o pinzas)
2- Procesar según protocolo Thinprep

- **LIQUIDOS:**

1- Centrifugado a 2500 r.m.p. durante 10 minutos o 1200 g durante 5 minutos a aceleración rápida.
2- Decantar sobrenadante.
• Si con el centrifugado queda **sedimento** en el fondo del tubo se procederá:
3- Hacer 2 extensiones.
4- Dejar secar un poco al aire y fijar en alcohol de 96º, (tiempo mínimo de 30 minutos)

• Si el material centrifugado **no tiene sedimento**, una vez realizados los pasos 1 y 2 hacer:

5- Echar un par de gotas del líquido en cada citoclip (dependiendo de la cantidad y de las características del poso).
6- Colocarlo en el Cytospin 1000 r. p. m. 3 min / aceleración media.
7- Secar un poco al aire y fijar con alcohol de 96º (mínimo 30 minutos).
8- Tinción de Papanicolau (ver capítulo 6).
9- Montar

- **ORINAS**

1- Guardar en nevera
2- Seguir el protocolo de Thinprep
3- Teñir con Papanicolaou (ver capítulo 6).
4- Montar

Instrucción técnica

Estudios citológicos

- **CEPILLADOS: (bronquiales / coledoco / digestivo)**

  1- Extensiones del material en 2 portas
  2- Si llegan en un vial de Preservcyt. El procesamiento se realizará directamente con el Thinprep utilizando la frecuencia 2 (FLU/FNA). Se realizarán 2 extensiones.

- **IMPRONTAS:**

  1- Tinción DIFF QUICK.

- **PAAF:**

- Si las hace el patólogo llegarán al laboratorio:

  1- Extensiones secadas al aire para realizar tinción rápida (Diff-Quick).
  2- Extensiones en alcohol de 96º para tinción de Papanicolaou.
  3- Tubo con lavado de aguja (en suero fisiológico), que se procesará centrifugando a 2500 rpm / 10 minutos o 1200g / 5 minutos y si es necesario hacer cytospin a 1000 rpm / 3 minutos.
  4- Intentar separar el bloque celular, antes de la centrifugación, si esto no es posible hacerlo después, **utilizando agar si es necesario.**

PROCEDIMIENTO SIN AGAR

5- El bloque celular se pondrá en papel de fumar
6- Se fijará en formol y se procesará como biopsia pequeña.
7- **Tan solo se realizará para su tinción 1 porta con 3-4 cortes. (con la finalidad de conservar la mayor parte del bloque para posteriores tinciones especiales).**
8- Se le registrará como biopsia especificando en Patwin que se trata de un bloque celular.
9- Montar

Instrucción técnica

Estudios citológicos

En casos especiales que determina el Citotécnico SE REALIZARÁ:

PROCEDIMIENTO BLOQUE CON AGAR

PREPARADO: agar dilución al 5% (mezclarlo con el agua caliente.

GUARDAR EN NEVERA.

AL UTILIZARLO:
- derretir en microondas
- poner agar en el mismo tubo en que queda el coágulo, cubriendo el material (si es tras centrifugación/citospin hay que decantar y cubrir el boton celular que queda en el fondo)
- agitar dejar en el tubo hasta que solidifique
- colocar en la cápsula y meter en bote con formol.

PROCESADO NORMAL DE BIOPSIAS.

- **Si la PAAF la ha realizado otro especialista distinto del Patólogo el material remitido puede llegar al laboratorio como:**

A. Solo extensiones fijadas en alcohol de 96º:

Procesamiento: 1 o 2 dependiendo del nº de portas enviados se secarán y se realizará tinción de Diff-Quick.

El resto de extensiones se teñirán con Papanicolaou.

B. Solo extensiones secadas al aire:

Procesamiento: 1 o 2 para tinción rápida (Diff-Quick).

El resto se rehidratarán colocándolas en la mezcla de suero fisiológico-glicerina y a continuación se fijarán en alcohol de 96º un mínimo de 30 minutos, tiñéndose con Papanicolaou.

C. Si se remite tubo con el lavado de aguja:

Procesamiento:

a) Comprobar si está con fijador o con suero fisiológico.
b) Comprobar si hay bloque y procesar como se indica anteriormente.
c) Si no hay bloque las extensiones que se obtengan se destinarán: 1 secada al aire para Diff-Quick y el resto se fijaran en alcohol para tinción de Papanicolaou.

D. Si se remiten la jeringa y agujas de la PAAF, sin haber realizado extensiones HAY QUE AVISAR AL PATÓLOGO DE TURNO que decidirá quien realiza y como las extensiones.

En general el procesamiento será:

a) Hacer extensiones secadas al aire para Diff-Quick.
b) Hacer extensiones y fijarlas en alcohol de 96º, mínimo 30 minutos para teñir con Papanicolaou.

c) Hacer lavado de agujas con suero fisiológico y procesar como se indica a partir del apartado 3.

Al procesar las PAAF se anotará en la hoja de petición el nº de portas, especificando cuantos hay para tinción rápida, Papanicolaou y si hay bloque células se anotará, también, su número de registro.

Los bloques celulares una vez teñidos se pasarán al Patólogo que ha diagnosticado la PAAF.

IMPORTANTE: Los portas realizados que se fijen en alcohol se dejaran en los botes COMPLETAMENTE CERRADOS de forma inmediata (haciéndolo después de cada muestra, no al terminar todo el proceso)

Parte del material de PAAF puede llegar en un vial de Preservcyt. Podremos procesarlo directamente con el Thinprerp utilizando la frecuencia 2 (FLU/FNA).
(Ver procesamiento de muestras con Thinprep, ANEXO)

ATENCIÓN: Las preparaciones ginecológicas que deban ser desmontadas (xilol) seguirán estos pasos:

1. **lo llevará a cabo el citotécnico, siendo responsable de las muestras**
2. **anotará en la solicitud que la muestra está en xilol y se llevará un control paralelo.**
3. **la solicitud estará en un lugar determinado y fijo**
4. **se colocarán las preparaciones ordenadamente y con espacio suficiente en xilol**
5. **1 día a la semana fijo se montarán**
6. **se realizará screening, pasándolas el mismo día al patólogo, en bandeja aparte y con una anotación de PORTAS RETRASADOS.**

- **<u>EN OCASIONES LAS EXTENSIONES CITOLÓGICAS SE DETERIORAN Y NECESITAN :</u>**

<u>Rehidratación</u>: La rehidratación se realizará mediante una mezcla obtenida entre glicerina y suero fisiológico (en proporciones iguales). Esta mezcla se guardará en un recipiente - dispensador para las posteriores utilizaciones. Tener en cuenta que, si no se dispone de suero, éste se puede sustituir por agua destilada. Los pasos a seguir son:

1. Cubrir los portaobjetos de forma uniforme con la mezcla realizada y dejarlo durante 15 '.
2. Aclara ligeramente las preparaciones con suero fisiológico.
3. Dejar fijarse con alcohol de 96º mínimo 60'.
4. Teñir con PAP (ver capítulo 6).
5. Montar con DPX
6. Teñir con T. de Papanicolau.
7. Montar

6. TINCIONES

TINCIÓN DE PAPANICOLAU (IT MANTENIMIENTO DEL TEÑIDOR y REGISTRO DE CAMBIOS DE COLORANTES)

1	Alcohol 96º	1'30 segundos
2	Alcohol 70º	1'30 segundos
3	Agua destilada	1'30 segundos
4	Hematoxilina*	1'30 segundos
5	Agua corriente	1'30 segundos
6	Agua corriente	1'30 segundos
7	Alcohol-Ácido*	1'30 segundos
8	Agua corriente	1'30 segundos
9	Agua corriente	1'30 segundos
10	Alcohol 50º	1'30 segundos
11	Alcohol 70º	1'30 segundos
12	Alcohol 96º	1'30 segundos
13	OG-6	1'30 segundos
14	OG-6	1'30 segundos
15	Alcohol 96º	1'30 segundos
16	EA-50	1'30 segundos
17	Alcohol 96º	1'30 segundos
18	Alcohol 96º	1'30 segundos
19	Alcohol 96º	1'30 segundos
20	Alcohol 96º	1'30 segundos
21	Alcohol absoluto	1'30 segundos
22	Alcohol absoluto	1'30 segundos
23	Xilol	1'30 segundos
24	Xilol	1'30 segundos
25	Xilol	1'30 segundos
26	Montador: Montar en DPX	

*** Alcohol-Ácido: al 2 %**

TINCION DE DIFF QUICK

1. PANÓPTICO RÁPIDO Nº 1 (fijador) — 10 pases
2. PANÓPTICO RÁPIDO Nº 2 (colorante) — hasta que el colorante queda uniforme
3. PANÓPTICO RÁPIDO Nº 3 (colorante) — mínimo 10 pases
4. Lavar en agua corriente
5. Dejar secar completamente
6. Montar

7. PREPARACIÓN DE PORTAS PARA DIAGNÓSTICO

1. Una vez montadas las extensiones se sacan de la gradilla (del montador), se extienden y se rotulan los portas en la parte esmerilada con rotulador, con número idéntico al que se ha puesto al principio en el mismo sitio en lápiz.
2. Las solicitudes y muestras correspondientes se colocan por orden en bandejas y se pasan al citotécnico que introducirá en PW el tipo de muestra correspondiente y los portas realizados.

8. SCREENING

Lo lleva a cabo el citotécnico:

1. **Citología General**, tras el screening se seguirán los siguientes pasos:

Introducirá en PatWin:

- el tipo de muestra, nº de extensiones.
- eliminará a diario las muestras de las ha realizado screening.
- introducirá los diagnósticos y SNOMED de los casos NO POSITIVOS.

2. **Citología Ginecológica**: entre 8-10 por hora, con un mínimo de 40/día si se realizan otros trabajos, en caso de realizar tan solo screening de muestras ginecológicas se llevaran a cabo un mínimo de 48, con las que se seguirá lo siguiente:

Introducirá en PatWin:

- el tipo de muestra, nº de extensiones.
- eliminará a diario las muestras de las ha realizado screening.
- anotara en la solicitud el código diagnóstico.
- introducirá los diagnósticos y SNOMED de los casos NO POSITIVOS.

Cada citotécnico será responsable de las muestras leídas.

En las hojas de petición de las CITOLOGÍAS LÍQUIDAS se hará constar que se trata de este tipo de muestras.

ATENCIÓN:

Procedimiento de screening para estudios de citologías ginecológicas (para citotécnicos):

a) *Screening habitual*
b) *Screening con estudios patológicos anteriores:*

1. Si persiste e mismo tipo de lesión: ANOTAR LAS 2 ÚLTIMAS CITOLOGÍA Y EL TIPO DE LESIÓN.

2. Si hay cambios en el diagnóstico anterior: BUSCAR LOS PORTAS DE LAS 2 ÚLTIMAS CITOLOGÍAS.

c) Screening de nuevos estudios patológicos (con anteriores negativas): SACAR LOS PORTAS DE LAS 2 ÚLTIMAS CITOLOGÍAS**.**

9. PREPARACIÓN GABINETE Y BOLSAS PARA PAAF

a) GABINETE

Material necesario:

- Batería de tinción rápida (Panópticos 1, 2 y 3)
- Pistola Cameco
- Agujas (varios tamaños)
- Tubos para el lavado de agujas con tapón
- Suero fisiológico en monodosis
- Tiritas
- Betadine
- Gasas
- Cajas de portaobjetos
- Cajas negras con gradillas para portaobjetos
- Botes blancos con cierre hermético
- Jeringas de 10 ml
- Lápices
- Entremetidas
- Alcohol 96 ºC
- Panópticos 1, 2 y 3
- Tubos estériles con tapón verde
- Botes con solución PreservCyt (citología líquida)
- Secador
- Detergente y lejía para limpieza del material
- Jabón de manos

Procedimiento:

1. Preguntar siempre a la administrativa el número de punciones que se van a realizar.
2. En el gabinete siempre tendrá que haber el material necesario para la realización de las punciones.
3. Por cada punción que se vaya a realizarse hay que preparar un bote blanco (cierre hermético) con alcohol de 96 ºC y una caja negra con gradilla para colocar los portaobjetos.
4. El técnico procederá así:
   - Abrir el gabinete de punciones.
   - Preparar el mismo número de botes blancos y de cajas negras que haya de punciones más uno.
   - Destapar los colorantes de la batería de tinción rápida (ésta batería habrá que cambiarla cada quince días).
   - Poner una cubeta con agua del grifo para lavar las preparaciones que se tiñan.
   - Preparar portaobjetos y lápiz.
   - Colocar una entremetida en la camilla.
   - Destapar el bote de alcohol y de betadine.

5. Avisar a la administrativa de que todo está preparado.

b) BOLSAS

Material:

- Aguja (varios tamaños)
- Tubos para el lavado de agujas con tapón
- Suero fisiológico en monodosis
- Tiritas
- Cajas de portaobjetos
- Cajas negras con gradillas para portaobjetos
- Botes blancos con cierre hermético
- Jeringas de 10 y 20 ml
- Lápices
- Tubos estériles con tapón verde
- Botes con solución PreservCyt (citología líquida)
- Pegatinas blancas para identificación de botes.
- Y todo lo que de forma excepcional indique el patólogo.

Procedimiento:

1. Preguntar siempre a la administrativa el número de punciones que se van a realizar.
2. Por cada punción que se vaya a realizar hay que preparar un bote blanco (cierre hermético) con alcohol de 96 ºC y una caja negra con gradilla para colocar los portaobjetos.
3. Comprobar que en cada bolsa haya todo el material necesario (ver anexo) para la realización de las punciones.
4. Las bolsas han de estar siempre preparadas y colocadas en su ubicación (encima de la nevera del laboratorio)

Instrucción técnica

Estudios citológicos

ANEXOS

CITOLOGÍA LÍQUIDA (THINPREP)

Procesado de muestras mucosas por Thinprep: (BAS, ESPUTO)

1.Recogida:

Recepcionar material y registrar (administrativa)

Almacenar en nevera hasta su procesamiento.

Esputos:

Seleccionar el material adecuado

Añadir 30 c.c. de Cytolyt en un bote de tapa azul

BAS:

Centrifugar la muestra en un bote de tapa azul

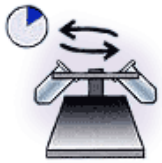
Seleccionar el material adecuado y añadir 30 c.c. de Cytolyt

2. Agitación mecánica:

Colocar los tubos de tapa azul en el agitador automático

un mínimo de 10 minutos (*)

(*) si no se tiene agitador disponible hay que hacerlo manualmente durante el mismo tiempo.



3. Concentrar por centrifugación:

Centrifugar el material a 1200 r.p.m. durante 5 minutos.

4. Desechar el sobrenadante y resuspender el botón celular:

Con una pipeta de plástico

Instrucción técnica

Estudios citológicos

5. Evaluar el botón celular:

Confirmar que el botón celular está en forma líquida,

si no añadir 30 c.c. de Cytolyt y repetir los pasos 2 y 4.

6. Añadir la muestra en un vial de PreservCyt:

Identificar el vial de Preservcyt con el número de citología

Dejar reposar en solución PreservCyt unos 15 minutos.

7. Poner en funcionamiento el procesador de Thinprep:

Identificar el portaobjetos con el número de citología*

Utilizar la frecuencia 3 (Mucoid) y realizar ***2 extensiones***

Fijar (min. 15 min) antes de teñir, montar y rotular

Entregar las muestras al citotécnico/a que realizará el screening para luego pasar al patólogo.

Procesado de muestras líquidas por Thinprep: (ORINA, LCR)

1. Recogida

Recoger los líquidos corporales en fresco

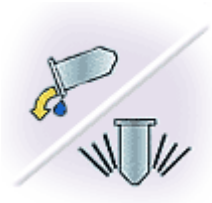
Recepcionar material y registrar (administrativa)

Almacenar en nevera hasta su procesamiento.

2. Concentrar por centrifugación (1200 r.p.m./ 5 minutos)

Orina: centrifugar aprox. 30 c.c. de orina en los botes de tapa azul

LCR: centrifugar en su totalidad sin cambiarlo de recipiente



3.Decantar el sobrenadante y resuspender el botón celular

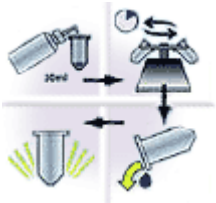
Orina: resuspender el botón celular y añadir 30 c.c. de Cytolyt

dejar actuar durante 15 minutos (agitándola de vez en cuando)

LCR: resuspender el botón celular e introducirlo con una pipeta de plástico en un vial de Preservcyt

Instrucción técnica

Estudios citológicos



4. Lavado con Cytolyt

- Centrifugar

- Desechar el sobrenadante

- Resuspender el botón con pipeta de plástico

5. Evaluar la apariencia del botón celular:

Si el botón celular no esta libre de sangre, añadir 30 c.c. de solución Cytolyt y repetir el paso 2.

6. Añadir mínimo 3 gotas* a un vial de Preservcyt

Identificar el vial de Preservcyt

Dejar reposar en solución Preservcyt unos 15 minutos

7. Poner en funcionamiento el procesador de ThinPrep

Identificar el portaobjetos con el número de citología

Utilizar la frecuencia 2 (FLU/FNA) y realizar ***una sola extensión***

Fijar (min. 15 minutos) antes de teñir, montar y rotular

Entregar las muestras al citotécnico/a que realizará el screening para luego pasar al patólogo

Instrucción técnica

Estudios citológicos

PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE CITOLOGÍA LÍQUIDA PARA DETERMINACIÓN DE HPV (CAPTURA DE HÍBRIDOS 2)

La determinación se hará a partir de muestras ginecológicas que han de ser remitidas al laboratorio en viales específicos con solución PreservCyt (The ThinPrep pap test).

1. Etiquetar con rotulador permanente los tubos (de poliprolineno) con el número de la muestra correspondiente que se va a procesar.
2. Agitar enérgicamente cada vial de presercyt para dispersar las células.
3. Pipetear rápidamente 4 ml de la muestra y depositarla en el tubo correspondiente.
4. Añadir al tubo 400 microlitros del tampón de conversión de muestras a cada tubo.
5. Tapar los tubos y agitar en vortex para su homogenización.
6. Centrifugar en centrífuga de rotor basculante a 2900 +/- 150 g o a 4500 rpm durante 15 minutos a 22 º C (centrífuga de microbiología).
7. Sacar los tubos de la centrífuga y comprobar que hay botón celular.
8. Procesar cada tubo de forma individual.
9. Decantar el sobrenadante con mucho cuidado para no desprender el botón celular.
10. Mantener el tubo boca a bajo y hacerle seis giros de 180 º sobre papel secante para eliminar el resto de sobrenadante.
11. Añadir a cada tubo 150 microlitros de la mezcla STM/DNR (ver cantidades en anexo).
12. Tapar los tubos y agitar en vortex durante un mínimo de 30 segundos y un máximo de 2 minutos (comprobar que se ha resuspendido todo el botón celular).
13. Colocar los tubos en una gradilla e introducirla en el baño maría (previamente calentado a 65 º C) durante 15 minutos.
14. Sacar los tubos de baño maría y agitar en el vortex cada tubo durante15-30 segundos (no debe verse ningún tipo de precipitado).
15. Volver a introducir la gradilla con los tubos en el baño maría e incubar durante 30 minutos más (nunca se tendrán más de 35 minutos).
16. Congelar los tubos a -20 º C hasta su posterior envío.

CANTIDADES

Nº de tubos	5	10	15	20
STM µl	600	1200	1800	2400
DNR µl	300	600	900	1200