



## Capítulo 10.3 Protocolo y recogida de muestras sanguíneas

### Índice de contenidos

<b>1. Introducción .....</b>	<b>2</b>
<b>2. Material necesario.....</b>	<b>2</b>
2.1. Material para extracción.....	2
2.2. Material para el alicuotado.....	3
<b>3. Procedimiento previo a prueba .....</b>	<b>3</b>
<b>4. Procedimiento día de prueba .....</b>	<b>4</b>
<b>5. Procedimiento posterior a prueba.....</b>	<b>4</b>
5.1. Centrifugado .....	4
5.2. Alicuotado .....	4
5.3. Almacenamiento .....	5
5.4. RedCap .....	5
<b>6. Índice de Anexos .....</b>	<b>5</b>

## 1. Introducción

El objetivo principal de HEART – BRAIN (HB) es evaluar si un programa de intervención basado en entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) o una combinación de este con un entrenamiento de fuerza con 3 meses de duración tiene un efecto en la salud cerebral en pacientes con cardiopatía isquémica estable en fase III de mantenimiento. Para ello se realizará la extracción de sangre en la sesión 4 de evaluación. Con este capítulo se quiere garantizar la correcta extracción, procesamiento, envío y almacenamiento central de las muestras de sangre. Si estas muestras no se recogen, procesan, manejan o almacenan correctamente, las extracciones realizadas pueden verse en peligro y considerarse inválidas. Las extracciones de sangre se realizarán en dos puntos temporales: al inicio (T1) y a los 3 meses después de la intervención (T3).

La extracción sanguínea tendrá lugar en una sala de la planta 5 del departamento de ensayos clínicos del Hospital Virgen de las Nieves, habilitada para tal uso y será llevada a cabo por un enfermero. Es imperativo seguir estrictamente el protocolo de rotulado, centrifugado y alicuotado para asegurar que todas las muestras reciben un tratamiento similar, asegurar un transporte y conservación óptimo de las mismas.

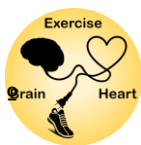
## 2. Material necesario

### 2.1. Material para extracción

- Guantes
- Rotuladores permanentes y bolígrafos
- Bata de laboratorio
- En caso de necesitar algún vacutainer adicional específico, estos son los que serán usados (ver Figura 1):
  - 1 Vacutainer amarillo: SUERO, volumen 8.5mL. Al menos 1 caja de vacutainers amarillos disponibles.
  - 2 Vacutainers morados: EDTA K3, volumen 4mL. Al menos 1 caja de vacutainers morados disponible.
  - 1 Vacutainer azul: CITRATO, volumen 4.5mL. Al menos 1 caja de vacutainers azules disponibles.
  - 1 PAXGENE de 8.5 mL



**Figura 1.** Vacutainers necesarios para el proyecto Hearty-brain









## 2.2. Material para el alicuotado


- Tubos wilmut de 0.65 mL ya etiquetados.
- Pipetas de 200 y 1000 uL (sólo las habilitadas para sangre y tejidos).
- Cajas de puntas de 200 uL: una bolsa completa de puntas extra.
- Cajas de puntas de 1000 uL: una bolsa completa de puntas extra.
- Gradilla para tubos de sangre para almacenamiento y transporte.
- Cajas para los tubos wilmut: cajas de plástico del proyecto, con el número de fluido en cada caja (PP1, PP2,...) que se encuentran dentro del congelador. Será necesario tener abierto el documento “gestión de muestras de sangre” que se encuentra en la carpeta 10.3. Muestras de sangre para ver en qué posición se encuentra cada caja.


## 3. Procedimiento previo a prueba


Los participantes deben cumplir las condiciones previas que se les entregará de forma física en la sesión 3 y se les avisará con un mínimo de un día de antelación siguiendo estas instrucciones:

“¡Buenos días, Participante X! Soy “*Nombre del Investigador*”, uno de los responsables de la gestión de las muestras sanguíneas  en el proyecto Hearty-brain  , me pongo en contacto con usted para la cita de la extracción sanguínea . Por motivos de gestión con el hospital, esta se realizará el día X de X, LUNES en el Hospital Virgen de las Nieves. Para ello se tendrán en cuenta las siguientes consideraciones:

- \*Debe venir en ayunas \*  

- No olvide traer sus gafas de cerca por si tiene que realizar algún cuestionario 

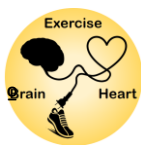
Nos veremos en la entrada principal  a la hora que os dejo a continuación (Entrando por la carpa verde). Si por algún motivo, tardamos más de 10 min en bajar a recogerlos de la hora estipulada, deben subir a la 5 PLANTA

La hora de su cita es  :

08:00

Para cualquier duda o consulta, contacte con el XXXXXXXX, confirmar su cita con OK, GRACIAS “

Las extracciones sanguíneas las realizará un enfermero del Hospital Virgen de las Nieves. El material necesario será el relativo al rotulado y transporte de las muestras citado en el apartado anterior.



#### 4. Procedimiento día de prueba

El enfermero encargado de realizar las extracciones sanguíneas tendrá habilitada una sala en la Unidad de Ensayos Clínicos del Hospital Virgen de las Nieves, y se seguirán las consideraciones citadas a continuación:

1. Antes de la extracción, el enfermero deberá tener los 5 vacutainers (1 azul, 1 amarillo, 2 morados, 1 PAXgene), y el material necesario listo.
2. Adicionalmente, el enfermero recolectará la sangre correspondiente a los análisis de rutina que se realizarán en el hospital (1 azul, 1 amarillo y 1 morado).
3. El total de sangre recolectado en cada momento temporal será de aproximadamente 30 ml.
4. El evaluador del proyecto debe completar el **Anexo 10.3 Gestión muestras de sangre**
5. **Los 8 vacutainers restantes** se procesarán en el laboratorio habilitado en edificio auxiliar (Licinio) y las muestras se llevarán al congelador situado en el iMUDS.
6. Posteriormente se etiquetará cada uno de los tubos de acuerdo con el procedimiento siguiente:

*El evaluador se encargará de rotular en los botes de cada participante: el “ID del participante, p.e., sería 832 para un participante. Para ello, utilizará un rotulador permanente y deberá ponerse guantes para evitar poder contaminar cualquier material contenido en el kit del participante.*

7. A continuación, las y los evaluadores encargados de la prueba, incluirán el código asociado a ese ID para sangre (e.g, 008, 023, 073,..)

#### 5. Procedimiento posterior a prueba

##### 5.1. Centrifugado

Se utilizará la centrifugadora que se encuentra en el laboratorio del Licinio (centrifugadora KUBOTA). Si al encenderla existe algún problema de electricidad será necesario revisar los plomos que se encuentran en el mismo laboratorio.

La centrifugadora se colocará a 2000g a 4º y con un total de tiempo de 10 minutos para el centrifugado de **TODOS** los vacutainers.

##### 5.2. Alicuotado

Se deben alicuotar los **botes amarillos (suero)**, los **botes azules (plasma)** y los **botes morados (plasma)** en wilmot de 0.65. Después de acabar este alicuotado, las cajas preparadas de los participantes se colocarán en el recipiente de poliuretano con placas de hielo para preservar la temperatura. Una vez introducidas las muestras en el congelador a -80°C, se utilizará un ordenador portátil con acceso a la carpeta compartida del proyecto para acceder al **ANEXO 10.3 Gestión muestras de sangre** donde se introducirá si alguno de ellos está hemolizado o está rellenado de forma parcial y la hora en la que se introdujeron.

Para obtener una información más extensa acerca de estos procedimientos revisar los **ANEXOS 10.3 de vacutainers específicos y 10.3 resumen de recolección HB**.



### 5.3. Almacenamiento

Los wilmuts serán almacenados por fluido y orden en el congelador situado en el iMUDS. Cada wilmut etiquetado tiene una ubicación dentro del congelador en una determinada caja. Para ver qué caja le corresponde según su etiqueta, revisar en el ANEXO 10.3 **Gestión muestras de sangre (más actualizada)**, la ubicación de la caja en el congelador.

Para cada participante del proyecto Hearty-brain, por cada momento temporal, tendremos almacenado en el congelador los siguientes ítems:

1. **41 eppendorfs básicos de 0.65mL.**
2. **1 vacutainer PAXgene**

Es imperativo que el Excel (ANEXO 10.3. **Gestión muestras de sangre**), esté completamente **actualizado** al finalizar la prueba.

### 5.4. RedCap

Una vez completados todos los procedimientos previos descritos en este protocolo, será obligatorio proceder al registro individualizado de la información correspondiente a cada participante en el instrumento denominado **Blood and Saliva Samples**. Este formulario deberá ser cumplimentado de manera exhaustiva, asegurándose de rellenar todos los campos solicitados —incluyendo fecha, hora, tipo de muestra, volumen obtenido, incidencias durante la recogida, y cualquier otra información relevante—. Asimismo, se deberán incorporar observaciones adicionales en el apartado de comentarios siempre que se detecten situaciones atípicas o que puedan tener implicaciones en la calidad o el procesamiento de las muestras biológicas. Este paso es esencial para garantizar la trazabilidad, estandarización y posterior análisis riguroso de los datos..

## 6. Índice de Anexos

- Anexo 10.3 Resumen de recolección HB
- Anexo 10.3 Vacutainers específicos
- Anexo 10.3 Gestión muestras de sangre (excel de gestión interna, no accesible públicamente)

Vacutainers por participante	
Morados (4ml)	2
Azules (4ml)	1
Amarillos (5ml)	1
PAXGENE	1
Total	5

	SUFIJO	vac	ml real vac	Alicuota (ml)	Eppendorf	total epp PRE	total epp POST	Cajas Pre	Cajas Post	Cajas totales
PAXGENE	PAX	1						81	81	2 tiempos
Morado Sangre (ml) (1)	PB	1	3	0,25	12,0	720	720	9,0	9,0	18,0
Morado Plasma (4 ml) x 4	PP	1	1,5	0,25	6,0	360	360	5,0	5,0	10,0
Morado Eritrocitos (4 ml) x 4	PE	0	1,5	0,25	6,0	360	360	5,0	5,0	10,0
Morado Linfocitos (ml)	PL	0	0,25	0,25	1,0	60	60	1,0	1,0	2,0
Azul Plasma (ml)	BP	1	1,5	0,25	6,0	360	360	5,0	5,0	10,0
Amarillo suero (ml)	YS	1	2,5	0,25	10,0	600	600	8,0	8,0	16,0
	TOTAL	5	15		41,0	2460	2460	33,0	33,0	66,0

## Procesamiento Vacutainer Amarillos

### Consideraciones importantes:

1. **Registre la hora** a la que los tubos de sangre llegan al laboratorio.
2. Existirá 1 vacutainer amarillo de 5 ml que se utiliza para suero.
3. Estos vacutainer se debe dejar reposar a temperatura ambiente durante 30-45 minutos (para permitir que el gel separador actúe).
4. Esto vacutainer se procesarán en tercer lugar, posterior al procesamiento de los vacutainer azules.

### Paso 1: Procesamiento de 1 vacutainer amarillo de 5 ml (Suero)

1. Coloque el vacutainer en la centrifuga durante 10 minutos a 2000 g a 4°.
2. Mientras las muestras se centrifugan, preparar los 10 eppendorf (previamente etiquetados) en las gradillas para el posterior pipeteo.
3. Retire los vacutainer de la centrífuga.
4. El material de este vacutainer será alicuotado de la siguiente manera:
  - a. Suero:
    - i. Coloque alícuotas de 250 µL de plasma en los 10 eppendorf con etiquetas color amarilla (ej. HB\_101\_1\_YS1, del participante 101, el tiempo 1 yellow serum, en el caso del tiempo post intervención se debe etiquetar con el número 3, ej. HB\_101\_3\_YS) y colóquelos inmediatamente en la caja (Amarilla) para su congelación a -80°. La ubicación de cada eppendorf en la caja quedará registrada en el Excel de gestión de muestras de sangre.

### Importante: problemas que pueden surgir

- **Volumen de muestra bajo:** si no hay suficiente muestra de un tipo de muestra en particular para llenar el conjunto completo de alícuotas, llene tantos eppendorf como sea posible. Si alguna alícuota es menor que el volumen especificado, anótelos como un volumen parcial (P). en el Excel de gestión de muestras de sangre
- **Muestra hemolizada:** si algo del suero está hemolizado (de color rosa o rojo debido a la alteración de los glóbulos rojos), anótelos como muestra hemolizada (H) en el Excel de gestión de muestras de sangre.

## Procesamiento Vacutainer Azul

### Consideraciones importantes:

1. **Registre la hora** a la que los tubos de sangre llegan al laboratorio.
2. Existirá 1 vacutainer azul de 2.7 ml que se utiliza para plasma.
3. Este es el vacutainer que se procesará en segundo lugar, posterior a los vacutainer morados.

### Paso 1: Procesamiento de 1 vacutainer azul de 2.7 ml (plasma)

1. Coloque el vacutainer en la centrifuga durante 10 minutos a 2000 g a 4°.
2. Mientras las muestras se centrifugan, preparar los **6 eppendorf** (previamente etiquetados) en las gradillas para el posterior pipeteo.
3. Retire los tubos de la centrifuga. **NOTA: NO ALTERE LA CAPA BUFFY COAT** (la capa celular blanquecina / turbia debajo del plasma que contiene las PBMC (linfocitos y monocitos) durante este proceso.
4. El material de este tubo será alicuotado de la siguiente manera:
  - a. Plasma:
    - i. Coloque alícuotas de **250 µL de plasma en los 6 eppendorf** con etiquetas color azul (ej. HB\_101\_1\_BP1, del participante 101, el tiempo 1 Blue plasma, en el caso del tiempo post intervención se debe etiquetar con el número 3, ej. HB\_101\_3\_BP) y colóquelos inmediatamente en la caja verde para su congelación a -80°. La ubicación de cada eppendorf en la caja quedará registrada en el Excel de gestión de muestras de sangre.

### Importante: problemas que pueden surgir

- **Volumen de muestra bajo:** si no hay suficiente muestra de un tipo de muestra en particular para llenar el conjunto completo de alícuotas, llene tantos eppendorf como sea posible. Si alguna alícuota es menor que el volumen especificado, anótelos como un volumen parcial (P). en el Excel de gestión de muestras de sangre
- **Muestra hemolizada:** si algo del plasma está hemolizado (de color rosa o rojo debido a la alteración de los glóbulos rojos), anótelos como muestra hemolizada (H) en el Excel de gestión de muestras de sangre.



## Procesamiento Vacutainer Morados

### Consideraciones importantes:

1. **Registre la hora** a la que los vacutainer llegan al laboratorio.
2. Existirán 2 vacutainer morados de 4 ml.
3. Estos vacutainer son los que se deberán procesar en primer lugar.

### Paso 1: Procesamiento de 1 vacutainer morado de 4 ml

1. Coloque el tubo en la centrifuga durante 10 minutos a 2000 g a 4°.
2. Mientras las muestras se centrifugan, preparar los **13 eppendorf** (previamente etiquetados) en las gradillas para el posterior pipeteo.
3. Retire los tubos de la centrifuga. NOTA: NO ALTERE LA CAPA BUFFY COAT (la capa celular blanquecina / turbia debajo del plasma que contiene las PBMC (linfocitos y monocitos) durante este proceso.
4. Todo el material de este tubo será alicuotado de la siguiente manera:
  - a. Plasma:
    - i. Coloque alícuotas de **250 µL de plasma** en los **6 eppendorf** con etiquetas color púrpura (ej. HB\_101\_1\_PP1, del participante 101, el tiempo 1 Purple plasma, en el caso del tiempo post intervención se debe etiquetar con el número 3, ej. HB\_101\_3\_PP) y colóquelos inmediatamente en la caja para su inmediata refrigeración. La ubicación de cada eppendorf en la caja quedará registrada en el Excel de gestión de muestras de sangre.
  - b. Linfocitos (BUFFY COAT)
    - i. Coloque cuidadosamente en **un único eppendorf** (con etiqueta de color verde, ej. HB\_101\_1\_PL de Purple lymphocytes) la capa de linfocitos (buffy coat) del vacutainer morados centrifugado. La ubicación de cada eppendorf en la caja quedará registrada en el Excel de gestión de muestras de sangre.
  - c. Eritrocitos
    - i. Coloque alícuotas de **250 µL** de eritrocitos en los **6 eppendorf** con etiquetas color naranja (ej. HB\_101\_1\_PE1, del participante 101, el tiempo 1 Purple erythrocytes, en el caso del tiempo post intervención se debe etiquetar con el número 3, ej. HB\_101\_3\_PE) y colóquelos inmediatamente en la caja para su inmediata refrigeración. La ubicación de cada eppendorf en la caja quedará registrada en el Excel de gestión de muestras de sangre.

### Paso 3: Procesamiento del vacutainer morado de 4 ml restante. NO CENTRIFUGAR!!

1. Coloque alícuotas de 250 µL de sangre completa en los **12 eppendorf** con etiquetas de color rojo (ej. HB\_101\_1\_PB, del participante 101, el tiempo 1 Purple blood, en el caso del tiempo post intervención se debe etiquetar con el número 3, ej. HB\_101\_3\_PB1) y colóquelos inmediatamente en la caja para su inmediata refrigeración. La ubicación de cada eppendorf en la caja quedará registrada en el Excel de gestión de muestras de sangre.

### Importante: problemas que pueden surgir

- **Volumen de muestra bajo:** si no hay suficiente muestra de un tipo de muestra en particular para llenar el conjunto completo de alícuotas, llene tantos eppendorf como sea posible. Si alguna alícuota es menor que el volumen especificado, anótelos como un volumen parcial (P). en el Excel de gestión de muestras de sangre
- **Muestra hemolizada:** si algo del suero o plasma está hemolizado (de color rosa o rojo debido a la alteración de los glóbulos rojos), anótelos como muestra hemolizada (H) en el Excel de gestión de muestras de sangre.

## Procesamiento Vacutainer PAXgene

### Consideraciones importantes:

1. **Registre la hora** a la que los vacutainer llegan al laboratorio.
2. Coloque el vacutainer PAXgene en la mesa de trabajo a temperatura ambiente. ¡No en el agitador! Los tubos PAXgene deben **estar exactamente 2 horas a temperatura ambiente**.
3. Este es el último de los vacutainer que se procesará.

### Paso 1: Procesamiento del vacutainer PAXgene: NO CENTRIFUGAR!!

1. Pegar la etiqueta correspondiente al vacutainer del participante. Esta etiqueta será de color blanca tendrá el formato según el siguiente ejemplo:
  - a. **HB\_101\_1\_PAX**, del participante 101, el tiempo 1, PAXgene, en el caso del tiempo post intervención se debe etiquetar con el número 3, ej. HB\_101\_3\_PAX).
2. Coloque los tubos verticales en una rejilla de alambre (no polietileno) en el congelador a -20°C durante 24 horas.
3. Después de 24 horas, mueva a -80° para almacenamiento. Colóquelo en la caja en el congelador -80, es una caja de espuma de polietileno (corcho) (ver figura 1). La ubicación de cada vacutainer en la caja de corcho quedará registrada en el Excel de gestión de muestras de sangre.



**Figura 1. Ejemplo almacenamiento vacutainer PAXgene**