

Anexo 11.3. Procesamiento muestras sanguíneas

Consideraciones importantes:

1. **Registre la hora** a la que los tubos de sangre llegan al laboratorio y cuando son introducidos en el congelador.
2. **Registre si alguno de los eppendorf** es una muestra parcial o se encuentra hemolizado su contenido.
3. Los tubos amarillos deben dejarse a temperatura ambiente hasta que se coagule su interior (30-45 minutos)
4. Procese la sangre de los tubos de tapa azul, morado, rojo y PAX GENE dentro de las 2 horas siguientes a la extracción de sangre.
5. Coloque un tubo morado y PAXgene en la mesa de trabajo a temperatura ambiente. ¡No en el agitador!
6. Si la centrifuga está en uso, coloque los tubos morado y en el agitador, mientras que el de tapa azul en el refrigerador.
7. El tiempo total del procesado de sangre durará aproximadamente 2 horas por participante.

Procesamiento vacutainers morados

Paso 1: Procesamiento de 4 vacutainers morados 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 16 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 P BMC (linfocitos y monocitos) durante este proceso.
4. Todo el material de este tubo será alícuotado de la siguiente manera:
 - a. Plasma:
 - i. Coloque alícuotas de **500 µL de plasma** en los **12 eppendorf** con etiquetas color púrpura (ej. 101_1_PP1, del participante 101, el tiempo 1 Purple plasma, en el caso del tiempo post intervención se debe etiquetar con el número 6, ej. 101_6_PP1) y colóquelos inmediatamente en la caja para su inmediata refrigeración. La ubicación de cada eppendorf en la caja transparente 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. 101_1_PL de Purple lymphocytes) la capa de linfocitos (buffy coat) de los 4 vacutainer morados centrifugados. La ubicación de cada eppendorf en la caja transparente quedará registrada en el Excel de gestión de muestras de sangre.
 - c. Eritrocitos
 - i. Coloque alícuotas de **1000 µL** de eritrocitos en los **4 eppendorf** con etiquetas color naranja (ej. 101_1_PE1, del participante 101, el tiempo 1 Purple erythrocytes, en el caso del tiempo post intervención se debe etiquetar con el número 6, ej. 101_6_PE1) y colóquelos inmediatamente en la caja para su inmediata refrigeración. La ubicación de cada eppendorf en la caja transparente 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 500 μ L de sangre completa en los **6 eppendorf** con etiquetas de color rojo (ej. 101_1_PB1, del participante 101, el tiempo 1 Purple blood, en el caso del tiempo post intervención se debe etiquetar con el número 6, ej. 101_6_PB1) y colóquelos inmediatamente en la caja para su inmediata refrigeración. La ubicación de cada eppendorf en la caja transparente quedará registrada en el Excel de gestión de muestras de sangre.

Procesamiento vacutainers azules

Consideraciones importantes:

1. **Registre la hora** a la que los tubos de sangre llegan al laboratorio.
2. Existirán 4 tubos azules de 2.7 ml que se utilizan para plasma.
3. Estos son los vacutainer que se procesarán en segundo lugar, posterior a los vacutainer morados.

Paso 1: Procesamiento de 4 vacutainers azules de 2.7 ml (plasma)

4. Coloque el tubo en la centrifuga durante 10 minutos a 2000 g a 4°.
5. Mientras las muestras se centrifugan, preparar los **6 eppendorf** (previamente etiquetados) en las gradillas para el posterior pipeteo.
6. Retire los tubos de la centrífuga. **NOTA: NO ALTERE LA CAPA BUFFY COAT** (la capa celular blanquecina / turbia debajo del plasma que contiene las P BMC (linfocitos y monocitos) durante este proceso.
7. El material de este tubo será alícuotado de la siguiente manera:
 - d. Plasma:
 - i. Coloque alícuotas de **500 μ L de plasma en los 6 eppendorf** con etiquetas color azul (ej. 101_1_BP1, del participante 101, el tiempo 1 Blue plasma, en el caso del tiempo post intervención se debe etiquetar con el número 6, ej. 101_6_BP1) y colóquelos inmediatamente en la caja verde para su congelación a -80°. La ubicación de cada eppendorf en la caja verde quedará registrada en el Excel de gestión de muestras de sangre.

Procesamiento vacutainers amarillos

Consideraciones importantes:

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

Paso 1: Procesamiento de 2 vacutainers amarillos de 5 ml (Suero)

5. Coloque el tubo en la centrifuga durante 10 minutos a 2000 g a 4°.
6. Mientras las muestras se centrifugan, preparar los 10 eppendorf (previamente etiquetados) en las gradillas para el posterior pipeteo.

7. Retire los tubos de la centrífuga.
8. El material de este tubo será alicuotado de la siguiente manera:
 - a. Suero:
 - i. Coloque alícuotas de 500 μ L de plasma en los 10 eppendorf con etiquetas color amarilla (ej. 101_1_YS1, del participante 101, el tiempo 1 yellow serum, en el caso del tiempo post intervención se debe etiquetar con el número 6, ej. 101_6_YS1) y colóquelos inmediatamente en la caja (Amarilla) para su congelación a -80° . La ubicación de cada eppendorf en la caja amarilla quedará registrada 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!!

4. Pegar la etiqueta correspondiente al vacutainer del participante. Esta etiqueta será de color blanca tendrá el formato según el siguiente ejemplo:
 - e. **101_1_PAX**, del participante 101, el tiempo 1, PAXgene, en el caso del tiempo post intervención se debe etiquetar con el número 6, ej. 101_6_PAX).
5. Coloque los tubos verticales en una rejilla de alambre (no poliestireno) en el congelador a -20°C durante 24 horas.
6. 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

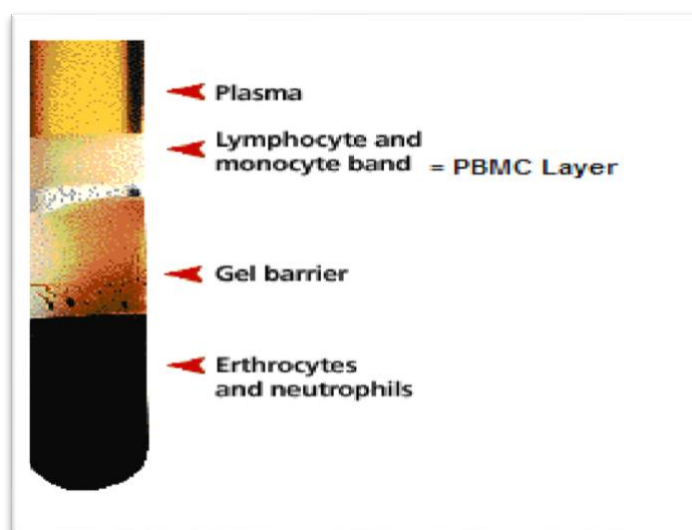


Figura 2. Ejemplo de capas del tubo azul/morado centrifugado

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 formulario de procesamiento de sangre. Además, marque la parte superior del eppendorf con una P utilizando un marcador negro.
- **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 formulario de procesamiento de sangre.
- **Tiempo de procesamiento:** si, por alguna razón inesperada, el centrifugado no se realiza dentro del tiempo requerido, intente procesar las muestras lo antes posible. Tenga en cuenta el retraso en los comentarios del formulario de procesamiento de sangre.