

Protocolo para el procesamiento y envío de muestras del Proyecto SPAIN

Índice

1.	SELECCIÓN DE PACIENTES.....	3
1.	1. Pacientes adultos	3
1.	2. Pacientes con NAI asociadas a cáncer o tratamientos con IC.....	3
1.	3. Pacientes pediátricos (<18 años)	3
1.2	Criterio general de exclusión	3
2.	MANEJO DE MUESTRAS.....	4
2.1	Tipos de muestras a recoger	4
2.1.1	Fundamentales	4
2.1.2	Opcionales	4
2.2	Procesamiento de Muestras	4
2.2.1	Suero.....	4
2.2.2	DNA y Plasma.....	5
2.2.3	PBMC	6
2.2.5	RNA	7
2.2.6	LCR	7
3.	ENVÍO	8
4.	CONTROL DE CALIDAD Y TRAZABILIDAD	8

1. SELECCIÓN DE PACIENTES

1. Pacientes adultos con diagnóstico confirmado o sospecha de:
 - CIDP, incluyendo variantes atípicas como CISP o MGUSP.
 - Síndrome de Guillain-Barré (SGB).
 - Neuropatía motora multifocal.
 - Neuralgia amiotrófica.
2. Pacientes con NAI asociadas a cáncer o tratamientos con ICI (immune-checkpoint inhibitors):
 - Neuronopatía sensitiva paraneoplásica.
 - Neuropatía sensitivo-motora desmielinizante asociada a tratamiento oncológico.
3. Pacientes pediátricos (<18 años):
 - Diagnóstico de cualquier forma de NAI indicada anteriormente, adaptado a la edad pediátrica.

1.2 Criterio general de exclusión

- Incapacidad para recoger datos y muestras de forma prospectiva.

2. MANEJO DE MUESTRAS

2.1 Tipos de muestras a recoger:

2.1.1 Fundamentales

- **Suero:** 3 tubos de 10 mL.
- **ADN:** 2 tubos EDTA.

2.1.2 Opcionales

- **PBMC:** 2 tubos CPT (cuando sea posible) o 2 tubos Heparina 10mL.
- **RNA:** 1 tubo Paxgene.
- **LCR (Líquido cefalorraquídeo):** solo en caso de realización de punción lumbar en el curso de la atención clínica.

2.2 Procesamiento de Muestras

A continuación, se detalla el procedimiento para la correcta obtención, manipulación y envío de las muestras.

2.2.1 Suero

Obtención del Suero

1. **Tipo de tubo para extracción:**
Utilizar **tubos con gel separador y sin aditivos**.
2. **Centrifugación:**
Las muestras de sangre deben ser centrifugadas a **2500 rpm durante 10 minutos** para lograr la separación de la fracción de suero.
3. **Separación del suero:**
Una vez finalizada la centrifugación, se deberá separar cuidadosamente la fracción correspondiente al suero.
4. **Alicuotado:**
El suero deberá ser alicuotado en **tubos correctamente etiquetados** con el código o identificación correspondiente a la muestra.

Condiciones de Envío

- **Si la muestra se envía el mismo día o al día siguiente de la extracción (opción preferible):**

No será necesario el uso de hielo seco, siempre que el transporte se realice de forma rápida y adecuada.

- **Si la muestra se congela antes del envío:**

Las muestras deberán mantenerse **congeladas durante todo el proceso de envío**. Para ello:

- Utilizar un **contenedor térmico apropiado**.
- Añadir **suficiente cantidad de hielo seco** para asegurar la conservación de la muestra en estado congelado hasta su recepción.

2.2.2 DNA y Plasma

Obtención del DNA

1. **Tipo de tubo para extracción:**

Tubo con EDTA.

2. **Dos opciones de procesado:**

1. Opción óptima

1. Separar fracción celular y plasma mediante centrifugación (2500 rpm 10 minutos)
 2. Alicuotar plasma en tubo sin aditivos (eppendorf, o similar)
 3. Enviar a ambos tubos (células y plasma) por separado.

2. Opción fácil

1. Enviar tubo de EDTA **a temperatura ambiente**, sin separar células

Condiciones de Envío

- **Si la muestra se envía el mismo día o al día siguiente de la extracción:**

No será necesario el uso de hielo seco, siempre que el transporte se realice de forma rápida y adecuada. Se pueden enviar las muestras a temperatura ambiente, tanto si es el DNA y el plasma por separado, como si es el tubo de EDTA sin separar.

- **Si la muestra se congela antes del envío:**

Las muestras deberán mantenerse **congeladas durante todo el proceso de envío**. Para ello:

- Utilizar un **contenedor térmico apropiado**.
- Añadir **suficiente cantidad de hielo seco** para asegurar la conservación de la muestra en estado congelado hasta su recepción.

**** En esta última opción, si se congela el tubo de EDTA sin separar las células del plasma, no es posible obtener plasma.**

Obtención de PBMC

Tipo de tubo para extracción y condiciones de la muestra antes del envío:

1. 2 tubos CPT de 10mL

Es imprescindible centrifugar los tubos antes de su transporte. Esto permite enviar las muestras a temperatura ambiente durante unas 48 horas.

1. El tubo BD Vacutainer® CPT™ Tube con Sodium Citrate debe estar a temperatura ambiente (18-25°C) debidamente rotulado con la identificación del paciente.
2. Recoger la sangre en el tubo con el método standard para BD Vacutainer® Evacuated Blood Collection Tubes (ver Venipuncture Technique & Sample Collection section and Prevention of Backflow section en las hojas que se adjuntan).
3. **Después de obtener la muestra de sangre invertir el tubo varias veces (8-10)**, dejar el tubo vertical a temperatura ambiente hasta su centrifugación. Las muestras deben ser centrifugadas en 2 horas después de la extracción para obtener resultados óptimos.
4. Centrifugar el tubo con la muestra de sangre a temperatura ambiente (18-25°C) en un rotor horizontal durante un mínimo de 20 minutos a entre **1500 to 1800 RCF (g)** (Relative Centrifugal Force o g). Asegurarse de que el tubo está colocado en el cubilete apropiado de la centrifuga. Tener en cuenta que son tubos un poco más largos de lo habitual por lo que hay que verificar que cuando el cubilete este girando no toque con el eje del rotor.
5. **Después de la centrifugación invertir el tubo suavemente (5-10 veces) antes de enviarlo.**

ATENCIÓN: Una excesiva velocidad de centrifugación (por encima de 2000 RCF (g)) puede causar rotura del tubo y por tanto exposición a la muestra de sangre.

2. 2 tubos Heparina 10mL.

La muestra se debe enviar el mismo día de la extracción:

Las muestras deben enviarse a **temperatura ambiente controlada**, idealmente entre **18 °C y 22 °C**.

- i. No enviar con hielo seco ni con refrigerantes, ya que el frío puede comprometer la viabilidad de las células.

Embalaje y transporte:

- Utilizar **contenedores rígidos y bien aislados térmicamente**.
- Etiquetar claramente el paquete como “**muestra biológica – no refrigerar**”.

2.2.5 RNA

Obtención de RNA

1. **Tipo de tubo para extracción:**
Tubo PAXgene.
2. **Obtención de la muestra:**
 - Extraer sangre venosa directamente en el **tubo PAXgene**.
 - Invertir el tubo suavemente **8 a 10 veces** inmediatamente después de la extracción para asegurar una correcta mezcla con el reactivo estabilizador.
3. Proceso previo al envío:
 - Dejar reposar el tubo a **temperatura ambiente (18–25 °C) durante un mínimo de 2 horas y un máximo de 24 horas** para permitir la estabilización del RNA.
 - Luego de ese tiempo, **congelar la muestra a -20 °C** (si el envío es próximo) o preferentemente a **-80 °C** si va a almacenarse por más tiempo antes del envío.

⚠ Es importante **no centrifugar** el tubo PAXgene antes del envío

Condiciones de envío:

- Las muestras deben enviarse **congeladas** (nunca a temperatura ambiente).
- Utilizar un **contenedor térmico adecuado con hielo seco suficiente** para mantener la temperatura de congelación durante todo el transporte.
- Etiquetar el paquete como “**Muestra biológica – mantener congelada – contiene hielo seco**”.

2.2.6 LCR

Obtención de LCR

1. **Tipo de tubo para extracción:**
Tubo estéril sin aditivos.
2. **Obtención de la muestra:**
Una vez obtenida la muestra deberá congelarse a -80°C.
Si no es posible congelar inmediatamente, almacenar temporalmente a 4 °C y asegurar que la muestra se congele en un plazo máximo de 24 horas desde la recolección (**esto no es lo ideal**).

Condiciones de envío:

- Las muestras deben enviarse congeladas (**ideal**) o a temperatura ambiente, siempre asegurando que puedan ser congeladas en un plazo máximo de 24 horas tras su recogida.
- En el caso del envío con muestras congeladas, utilizar un contenedor térmico adecuado con suficiente hielo seco.

- Etiquetar claramente el paquete como “Muestra biológica – mantener congelada – contiene hielo seco”.

3. ENVÍO

Para el envío de las muestras al Instituto de Investigación Sant Pau, se debe contactar con la empresa de transportes MTD LOGÍSTICA al número **691 859 108**. Al contactar, es importante indicar que las muestras forman parte del proyecto SPAiN, que se desean enviar al IR Sant Pau, y proporcionar la dirección exacta desde donde se realizará la recogida.

En caso de requerir hielo seco, enviar un correo electrónico a **trafico@mtd-logistica.com** incluyendo la siguiente información:

- Centro de recogida.
- Especificaciones del transporte: Congelado con hielo seco (-80°C)
- Indicar si es necesario que la empresa proporcione nevera de transporte y dimensiones aproximadas, o si, por el contrario, la muestra ya está preparada y embalada en Porex isotérmico, por lo que únicamente deberán encargarse del transporte, sin necesidad de manipulación.

4. CONTROL DE CALIDAD Y TRAZABILIDAD

- Cada muestra se identificará con un código alfanumérico anonimizador.

¿Cómo se identifican los pacientes?

Primero de todo, se deberá decidir si el paciente se introduce en la base de datos de Neuropatías Autoinmunes (NAi) agudas (solo pacientes con síndrome de Guillain Barré) o NAi crónicas.

Cada paciente se identificará con su código de hospital referente, seguido de -A o -C (si NAi agudas o crónicas), y seguido de un número. (Ej. *HSP-A-001*, *HSP-A-002*, *HSP-C-001*, *HSP-C-002*...). Cada hospital deberá tener un control interno de a qué paciente corresponde cada código ya que no se pueden incluir datos personales (como el nombre) en el RedCap.

Los códigos de cada hospital son:

1. Instituto de investigación del Hospital de Sant Pau → **HSP**
2. Instituto de investigación Sant Joan de Deu → **HSJD**
3. Instituto de investigación de Bellvitge → **HUBELL**
4. ICO Bellvitge → **ICO**
5. Fundació de recerca Clínic Barcelona - Institut d'investigacions biomèdiques August Pi i Sunyer → **HCB**
6. Instituto de investigación germans Trias i Pujol → **HUGTP**
7. Instituto Investigación Vall Hebrón → **HVH**
8. Instituto de investigación sanitaria la Fe Valencia → **HUPLF**
9. Instituto de investigación sanitaria del Hospital Clínico San Carlos → **HCSC**
10. Instituto de investigación sanitaria del hospital 12 de octubre → **HU12O**
11. Hospital Infanta Sofia → **HUIS**
12. Instituto de biomedicina de Sevilla -Hospital Virgen del Rocio → **HUVR**
13. Hospital Virgen de Macarena → **HVM**
14. Hospital de Valme → **HVA**
15. Hospital Torrecárdenas → **HTC**
16. Hospital Puerta del Mar → **HPM**
17. Hospital de Basurto → **HBA**
18. Hospital de Donosti → **HD**
19. Hospital de Cruces → **HC**
20. Hospital de Galdakao → **HG**
21. Hospital Universitario de Araba → **HUA**
22. Hospital Universitario de Uribe-Costa → **HUUC**
23. Fundación canaria instituto de investigación sanitaria de Canarias - Hospital nuestra señora de Candelaria → **HUNSC**
24. Instituto de investigación sanitaria del principado de Asturias - Hospital Central de Asturias → **HUCA**
25. Instituto de investigación Marqués de Valdecilla → **HUVAL**
26. Instituto de investigación sanitaria de Navarra → **HUNAV**
27. Hospital Universitario La Paz → **HULP**
28. Hospital Universitario de Canarias → **HUC**
29. Hospital Universitario Ramón y Cajal → **HURC**
30. Hospital Universitario Infanta Leonor → **HUIL**
31. Hospital La Ribera → **HLR**
32. Hospital Regional Universitario de Málaga → **HRUM**
33. Universidad Autónoma de Madrid → **UAM**
34. Hospital Universitario de Burgos → **HUBU**
35. Hospital Universitario A Coruña → **HUAC**
36. Hospital de Sant Joan Despí - Moisès Broggi → **HSDMB**
37. Hospital Clínico Santiago de Compostela → **CHUS**
38. Hospital General Universitario Dr. Balmis → **HGADB**
39. Hospital Rey Juan Carlos → **HRJC**
40. Hospital Insular → **HUICG**
41. Hospital de Fuenlabrada → **HFU**
42. Hospital Universitario Virgen de las Nieves → **HUVN**

43. Hospital Universitario de Getafe → HUG

44. Hospital Puerta de Hierro → HUPHM



¿Cómo se rotulan las muestras?

Cada hospital deberá codificar y rotular las muestras de la siguiente manera (y así enviarlas al centro de recogida). **Añadir fecha de muestra en el tubo.**

Se recogerán muestras en los siguientes tiempos, en función de si es una NAI aguda o crónica:

NAi agudas		NAi crónicas	
Tiempo muestra	Código	Tiempo muestra	Código
Basal	-0	Basal	-0
Semana 1	-1S	Tres meses	-3M
Semana 2	-2S	Seis meses	-6M
Semana 4	-4S	Doce meses	-12M
Semana 24	-24S	Dieciocho meses	-18M
Semana 52	-52S	Veinticuatro meses	-24M
Visita extra	-VE1 -VE2 -VE3...	Visita extra	-VE1 -VE2 -VE3...
<i>Ejemplos:</i> - HSP-A-001-0 - HSP-A-001-1S - HSP-A-001-2S - ...		<i>Ejemplos:</i> - HSP-C-001-0 - HSP-C-001-3M - HSP-C-001-6M - ...	

Después de este código, habrá que añadir -Suero, -Plasma, -DNA, -PBMC o -LCR según el tipo de muestra biológica que se esté procesando.

Ejemplos finales:

NAi agudas	NAi crónicas
HSP-A-001-0-Suero	HSP-C-001-0-Suero
HSP-A-001-1S-Plasma	HSP-C-001-3M-Plasma
HSP-A-001-2S-PBMC	HSP-C-001-6M-PBMC
HSP-A-001-4S-LCR	HSP-C-001-12M-LCR
HSP-A-001-24S-Suero	HSP-C-001-18M-Suero
HSP-A-001-VE1-Plasma	HSP-C-001-VE2-LCR

- Se llevará un registro centralizado de envíos, recepción, procesamiento y almacenamiento de cada muestra.