



Red Biobancos

Instituto de Salud Carlos III

Red Nacional
de Biobancos

Spanish National
Biobank Network

PNT Plasma

Grupo de Trabajo en Banco de Cerebros

REVISIÓN	REALIZADO	FECHA	APROBADO	FECHA	ENTRADA EN VIGOR
00	Grupo de Derivados Hemáticos	26/05/2011	Dirección	26/06/2015	19/07/2011
Modificaciones:					

Madrid 2011

Obtención, Procesado Y Almacenaje de Muestras de Plasma

La presente publicación está financiada por Subprograma de Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), dentro la Acción Estratégica en Salud 2009, RD09/0076/00113

M^a Ángeles Muñoz

Coordinadora del

Grupo de Trabajo

Manuel Morente.

Coordinador de la Red

Nacional de Biobancos - ISCIII

Red Nacional de Biobancos - ISCIII

www.redbiobancos.es

AUTORES.

El contenido de este Código de Buenas Prácticas ha sido elaborado por el **Grupo de Trabajo de Derivados Hemáticos** (www.redbiobancos.es):

Maribel García Sánchez, Hospital Virgen Macarena

Lina Mayorga, Hospital Carlos Haya

Tatiana Díaz, Hospital Carlos Haya

Inmaculada Martín, Hospital Carlos Haya

Pilar Giraldo Castellanos, Hospital Miguel Servet

Fernando Civeira Murillo, Hospital Miguel Servet

Miguel Pocoví Mieras, Hospital Miguel Servet

Pablo Isidro Marrón, Hospital Central de Asturias

Jacobo Martínez, Centro Superior de Investigación en Salud Pública (CSISP)

Inés Santiuste, Hospital Marqués de Valdecilla

José Manuel González de Buitrago, Hospital Universitario de Salamanca

Eduarne Pedrosa, Fundación Instituto de Investigación Germán Trías i Pujol

Alfonso Monje Hernández, San Juan de Dios. Servicios de Salud Mental

Gerard Pardo, Hospital Dr. Josep Trueta

Beatriz Bellosillo, Hospital del Mar

Luis Gallart Millán, Hospital Joan XXIII

Anna Bosch, Hospital Clínico y Provincial de Barcelona - IDIBAPS

Nieves Doménech García, Complejo Hospitalario Universitario de La Coruña

M^a Ángeles Muñoz Fernández, Hospital Gregorio Marañón

Almudena García Torres, Hospital Gregorio Marañón

Irene Consuegra, Hospital Gregorio Marañón

Rosario Martínez Marín, Hospital Virgen de La Arrixaca

M^a Antonia Fortuño Cebamanos, Clínica Universidad de Navarra

Isabel Gil Aldea, Hospital de Navarra

Inés Aroca Siendones, Hospital Universitario San Cecilio, Granada,

Clara Rodríguez, BioBanco Vasco/Centro Vasco de Transfusiones

Coordinador:

M^a Ángeles Muñoz, Hospital Gregorio Marañón

ÍNDICE

1.	ABREVIATURAS.....	6
2.	DEFINICIONES.....	6
3.	OBJETO	6
4.	ALCANCE.....	6
5.	MATERIALES	7
6.	DESARROLLO	8
6.1.	CONSIDERACIONES PREVIAS.....	8
6.2.	RECEPCIÓN DE LA MUESTRA EN EL BIOBANCO	9
6.3.	OBTENCIÓN DEL PLASMA Y CONSERVACIÓN DE LAS ALÍCUOTAS	9
7.	DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA.....	11
8.	DOCUMENTACIÓN RELACIONADA	11

1. ABREVIATURAS

- **EDTA:** Acido etilendiamintetraacético.
- **ACD:** Ácido citrato dextrosa.
- **CMSPs:** Células mononucleares de sangre periférica.

2. DEFINICIONES

- **Plasma sanguíneo:** fracción líquida y acelular de la sangre.
- **Pellet:** botón celular de color blanco (aunque en ocasiones puede tener color rojizo debido a la presencia de algunos eritrocitos). Se debe de evitar la presencia de eritrocitos, pero no es motivo suficiente para descartar la muestra
- **EDTA:** Acido etilendiamintetraacético. Agente anticoagulante que bloquea la cascada de la coagulación de la sangre mediante la atracción de calcio iónico.
- **ACD:** solución anticoagulante de dextrosa, citrato sódico y ácido cítrico que inhibe la coagulación mediante la atracción de iones.
- **Heparina:** agente anticoagulante que prolonga el tiempo de coagulación de la sangre a través de la activación de la antitrombina III.
- **Lipemia:** presencia de lípidos en sangre. El plasma adquiere una apariencia turbia o lechosa.
- **Ictericia:** unión de bilirrubina a la albúmina del plasma, dando lugar a plasma amarillo intenso.
- **Hemólisis:** fenómeno de desintegración de los eritrocitos que provoca que el plasma tenga un color rosado o rojo.

3. OBJETO

El objeto de este procedimiento es definir la actuación y establecer las directrices básicas de calidad, ya sea tanto en la obtención y manejo, como en el procesamiento de las muestras de plasma que serán depositadas en los biobancos pertenecientes a cualquier centro u hospital adscrito a la Red Nacional de BioBancos.

4. ALCANCE

Este procedimiento es aplicable a todas las muestras de plasma que sean obtenidas con la finalidad de ser almacenadas en un biobanco. Este protocolo no detalla los procesos para la seguridad e higiene laboral sobre materiales de riesgo biológico y/o productos químicos, y se recomienda que el personal siga las normas de Seguridad e Higiene establecidas en cada centro.

5. MATERIALES

- Servicio de mensajería con permiso de transporte de material biológico:

Material	Clasificación ONU		Instrucciones de embalaje				Observaciones
	Clase	Nº	ADR	RID	OACI	IMDG	
Muestras infecciosas para el ser humano	6.2	2814	620	620	692	620	Materiales grupos 2,3,4
Muestras para diagnóstico	6.2	3373	650	650	650	----	Materiales grupos 1,2,3

- Para muestras no infecciosas: Bolsa o contenedor de transporte interno en el centro hospitalario.
- Para muestras infecciosas o peligrosas : Contenedor de transporte de sustancias peligrosas que cumpla con la legislación vigente: Real Decreto 664/97, siguiendo la "Instrucción de embalaje 620 (IATA – OACI 602)"
- Jeringuillas y/o material necesario para la extracción de sangre.
- Tubo de extracción venosa con sistema tipo vacutainer que contenga anticoagulante (K₂ o K₃ EDTA, citrato o heparina)
- Gradillas para tubos de extracción sanguínea
- Centrífuga con los adaptadores adecuados para el tipo de tubos de recolección utilizados (tubos de 5ml, 10 ml y tubos Falcon de 15 ó 50mL)
- Guantes para protección en la manipulación
- Pipetas Pasteur estériles de 1 a 5 mililitros
- Pipetas que recojan volúmenes entre 0,2 y 1mililitro)
- Puntas estériles con o sin filtro adaptables al tipo de pipetas utilizadas
- Tubo Falcon 15 ml con tapón de rosca
- Criotubos estériles (desde 0.5 a 2 mililitros)
- Gradillas para criotubos
- Cajas de crioalmacenaje
- Etiquetas adecuadas al tipo de criotubos
- Impresora para etiquetado de muestras
- Ultracongelador de -80°C con sistema de registro de temperatura, sistema de mantenimiento de temperatura en caso de corte de corriente eléctrica (inyección de CO₂, sistema de administración de energía (SAE) interno, sistema electrógeno) y sistema de alarma telefónica
- Software de gestión de muestras (Maxwell, Bio-e Bank, NorayBanks...)

6. DESARROLLO

6.1. CONSIDERACIONES PREVIAS

- **Elección del anticoagulante:** En caso de que la muestra de sangre total se tome para una finalidad concreta, es recomendable elegir el tipo de anticoagulante en función del tipo de estudio/análisis que se vaya a realizar con las muestras derivadas.
 - EDTA con K2 ó K3: debido a sus características no se aconseja su uso para la obtención de muestras de plasma en las que se van a realizar ensayos que midan presencia de iones o que incluyan cationes divalentes como intermediarios de la reacción. Por el contrario, es aconsejable utilizarlo si la muestra de sangre se ha obtenido para obtener CMSPs o pellet celular.
 - ACD: debido a sus características no se aconseja su uso para la obtención de muestras de plasma en las que se van a realizar inmunoensayos, ya que disminuye los valores esperados. Se aconseja utilizarlo si la muestra de sangre se ha obtenido para obtener eritrocitos.
 - Heparina: por sus características no es recomendable para obtener plasma en el que se vayan a hacer análisis peptídicos o proteómicos porque puede interferir en algunos análisis de espectrometría de masas. Su uso es recomendable en caso de que la muestra se haya obtenido para realizar estudios celulares.
- **Tiempo:** Se recomienda ajustar el tiempo óptimo de procesamiento de la muestra al tipo de ensayo que se vaya a hacer con la muestra o sus productos derivados. Según la experiencia, el tiempo máximo recomendable:
 - Para estudios de biomarcadores en plasma, se aconseja centrifugar la sangre lo más rápido posible (idealmente dentro de los 30 minutos post-extracción) para evitar alteraciones en la composición del plasma debidas a los cambios de expresión que ocurren en las células sanguíneas como consecuencia de la hipoxia.
 - Para ensayos celulares: 1,5 horas
 - Para estudios virológicos: 24 horas
- **Temperatura:** Para decidir la temperatura que minimice la alteración de la muestra deberemos tener en cuenta principalmente el tiempo que estimamos que se va a tardar en procesar (ver punto 6.3.2).
- **Número de centrifugaciones:** Se estima que por lo menos el 14% de los péptidos que componen el plasma proceden de las plaquetas debido a su activación post-extracción o a la existencia de plaquetas residuales tras la centrifugación de la sangre. El mejor método para reducir la cantidad de plaquetas en plasma hasta <10/nL es hacer una doble centrifugación. En cualquier caso, hay que tener en cuenta las necesidades del estudio para el cual se está haciendo el muestreo y adaptar el PNT, en caso de que sea requerible, del siguiente modo:
 - Como recomendación general y para la medición de biomarcadores libres en plasma será recomendable eliminar las plaquetas y minimizar la liberación de su contenido mediante doble centrifugación. Es lo que se ha tenido en cuenta en este PNT.
 - Excepcionalmente, para la medición de biomarcadores secuestrados en plaquetas o para estudios específicos de hematología y cardiología relacionados con la función plaquetaria, será necesario adaptar las condiciones de centrifugación a las necesidades del estudio.
- **Tiempo de almacenamiento:** Es recomendable tener en cuenta el tiempo y la temperatura a la que han estado almacenadas las muestras, puesto que muchos componentes del plasma son inestables incluso a -80°C y dejan de ser detectables con el tiempo.
- **Registro de datos:** Es muy importante anotar y registrar los valores de las variables preanalíticas consideradas en este punto con el fin de tener las muestras bien documentadas. De este modo, se podrán restringir los valores de los parámetros de búsqueda a las necesidades del estudio para el cual se ha solicitado la muestra, lo que nos permitirá seleccionar muestras más homogéneas que darán resultados más reproducibles.

6.2. RECEPCIÓN DE LA MUESTRA EN EL BIOBANCO

- 6.2.1 Verificar la información e identificación de los tubos y asegurar la correcta relación entre los tubos y la información del paciente, siguiendo el compromiso de confidencialidad exigido por la Ley de Protección de Datos. Etiquetar y registrar la muestra según el procedimiento de gestión de muestras utilizado por cada centro.
- 6.2.3 Se aconseja recoger la máxima información posible relativa a la muestra, tanto en el momento de la recepción como tras el procesado y almacenaje, y en función de los estudios destinados a la misma, por ejemplo:
- Fecha y hora de recepción y/o procesamiento
 - Condiciones de transporte hasta la recepción en el biobanco: temperatura y tiempo transcurrido desde su extracción.
 - Volumen de sangre recibida
 - Tipo de tubo y de anticoagulante
 - Grado de hemólisis
 - Grado de Lipemia Grado de Ictericia
 - Nivel de coagulación
 - Tiempo de procesamiento
 - Fecha y hora de congelación
- 6.2.4 Registrar en el sistema informático la entrada de la muestra y datos asociados.

6.3. OBTENCIÓN DEL PLASMA Y CONSERVACIÓN DE LAS ALÍCUOTAS

6.3.1 Partimos de sangre total extraída por venopunción. El procesamiento de sangre total para la obtención de plasma consiste en separar la fracción celular de la sangre con el fin de obtener alícuotas de plasma que sean lo más representativas posible del estado fisiológico del donante en el momento que se le ha extraído y conservarlas en condiciones de Biobanco, evitando interferencias en los análisis diagnósticos que se lleven a cabo.

6.3.2 Temperatura:

- Si la muestra de sangre va a ser centrifugada inmediatamente (dentro de los 30 minutos posteriores a la extracción), lo aconsejable es mantenerla a temperatura ambiente (16-24°C) hasta el momento de su procesado, para minimizar la activación plaquetaria que se produce a bajas temperaturas provocando la liberación de proteínas que alteran la composición del plasma de manera irreversible.
- Si sabemos que el procesamiento de la muestra se va a demorar, es aconsejable mantenerla refrigerada (2-6°C) hasta el momento de su procesado con el fin de evitar la degradación de componentes de la muestra sensibles a la temperatura.

6.3.3 Tiempo de procesamiento:

Se recomienda que el tiempo transcurrido entre la extracción de la sangre y su congelación sea **inferior a 2 horas**, minimizando en lo posible la demora en la primera centrifugación. El tiempo máximo aceptable para ciertos estudios es de hasta 72 horas si la muestra ha estado conservada a 4°C.

6.3.4 Centrifugar la muestra a **1300-1500g durante 10min**. Para elegir la temperatura, seguiremos el mismo criterio que en el punto 6.3.2.

6.3.5 Con esta primera centrifugación se consigue separar el plasma de la fracción celular de la sangre. Encontraremos en el tubo 3 fases:

- La fracción superior, con aspecto claro y transparente, de color amarillo corresponde al plasma.
- La fase intermedia, que es muy fina y de color gris claro, es donde encontramos los leucocitos
- La fracción inferior, de color rojo oscuro, corresponde a los eritrocitos.

- 6.3.6 Aspirar cuidadosamente con una pipeta el plasma (fase superior amarilla) y transferirlo a un tubo de 15ml estéril convenientemente identificado/etiquetado.
- 6.3.7 Centrifugar el material transferido a **2500g durante 15min** a la misma temperatura utilizada en el punto 6.3.4. Con esta segunda centrifugación se consigue eliminar la mayoría de las plaquetas contenidas en el plasma.
- 6.3.8 Alicuotar en fracciones de al menos 0.5 ml en viales de criocongelación adecuados, debidamente etiquetados e identificados. Sellar correctamente los tubos para conseguir un cierre hermético. Registrar el número de alícuotas obtenidas para cada muestra. Almacenar en un tiempo inferior o igual a 2 horas. Una vez obtenido el plasma pobre en plaquetas, es recomendable mantenerlo a 4°C si no se va a guardar inmediatamente a -80°C.
- 6.3.9 Registrar la ubicación de la muestra en el software de gestión de muestras que maneje el biobanco, así como la información detallada en el punto 6.2.3

7. DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA

- Norma UNE-EN-ISO 9001:2008. Sistemas de gestión para la calidad. Requisitos.
- **Specimen collection and handling: standardization of blood sample collection.** Tammen H. *Methods Mol Biol.* 2008;428:35-42
- **Immunoassay and antibody microarray analysis of the HUPO Plasma Proteome Project reference specimens: systematic variation between sample types and calibration of mass spectrometry data.** Haab BB, Geierstanger BH, Michailidis G, Vitzthum F, Forrester S, Okon R, Saviranta P, Brinker A, Sorette M, Perlee L, Suresh S, Drwal G, Adkins JN, Omenn GS. *Proteomics.* 2005 Aug;5(13):3278-91
- **HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: towards the standardization of parameters for plasma proteome samples.** Rai AJ, Gelfand CA, Haywood BC, Warunek DJ, Yi J, Schuchard MD, Mehig R, Cockrill SL, Scott GB, Tammen H, Schulz-Knappe P, Speicher DW, Vitzthum F, Haab BB, Siest G, Chan DW. *Proteomics.* 2005 Aug;5(13):3262-77
- **Standard Operating Procedures.** Australia's Healthy Ageing Biobank. October 2009, version 2.
- **The UK Biobank sample handling and storage protocol for the collection, processing and archiving of human blood and urine.** Paul Elliott, Tim C Peakman. *International Journal of Epidemiology* 2008;37:234-244.
- **Stability of plasma analytes after delayed separation of whole blood: implications for epidemiological studies.** Sarah Clark, Linda D Youngman, Alison Palmer, Sarah Parish, Richard Peto, Rory Collins. *International Epidemiological Association* 2003;32:125-130.
- **Serum biobank certification and the establishment of quality controls for biological fluids: examples of serum biomarker stability after temperature variation.** Chrastine Chaigneau, Thomas Cabioch, Katy Beaumont and Fotini Betsou. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2007; 45 (10): 1390-1395
- **Human Biospecimen Research: Experimental Protocol and Quality Control Tools**
- **Biospecimen Reporting for Improved Study Quality (BRISQ)**
- **Issues on fit-for-purpose validations of a panel of ELISAs for application as biomarkers in clinical trials of anti-Angiogenic drugs**
- **Reversible alterations in platelet morphology produced by anticoagulants and cold**
- **Peptidomic analysis of human blood specimens: Comparison between plasma specimens and serum by differential peptide display.** Harald Tammen, Imke Schulte, Rudiger Hess, Christoph Menzel, Markus Kellmann, Thomas Mohring and Peter Schulz-Knappe. *Proteomics* 2005, 5, 3414-3422

8. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA

- PNT sobre extracción de sangre
- Hoja de recogida de datos asociados a la muestra
- PNT control de calidad

Red Nacional de Biobancos

Spanish National
Biobank Network



Red Biobancos

Instituto de Salud Carlos III