

CONTENIDO

1.	OBJETIVOS Y ALCANCE	2
2.	MATERIALES	2
2.1.	EQUIPOS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES.	2
3.	PROCEDIMIENTO	2
3.1.	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	2
3.2.	OBTENCIÓN DE SUERO.....	3
3.2.1.	Obtención de suero mediante centrifugación	3
3.2.2.	Obtención de suero manualmente	3
3.3.	RECOLECCIÓN DE SUERO	3
3.4.	ALMACENAMIENTO DE SUERO	4
3.4.1.	Almacenamiento de suero en refrigeración	4
3.4.2.	Almacenamiento de suero en congelación	4
4.	ANEXOS.....	4

1. OBJETIVOS Y ALCANCE

El objetivo de este instructivo es dar a conocer el manejo de muestras de sangre entera (tubo sin anticoagulante) para permitir la obtención de suero sanguíneo, con la finalidad de favorecer la preservación de la muestra para su posterior análisis en el Laboratorio de Bacteriología del Sub-Departamento Laboratorio sanidad Animal del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG).

Este documento está enfocado en proporcionar las directrices para el manejo de muestras correspondientes al Plan Anual de Vigilancia para Brucelosis Bovina en zona libre, en tiempos de contingencia nacional, en donde, el envío de muestras de sangre entera al Laboratorio no pueda ser realizado inmediatamente posterior a su colección.

2. MATERIALES

2.1. EQUIPOS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES.

- Congelador (-18° a -20°C).
- Refrigerador (2° a 8°C).
- Centrifuga de tubos de 2000 rpm (opcional).
- Baño termostático (opcional).
- Micropipeta monocal ajustable 10-100 µl (opcional).
- Micropipeta monocal ajustable 100-1000 µl (opcional).
- Puntas para micropipetas desechables (opcional).
- Pipeta Pasteur o gotario plástico desechable (opcional).
- Tubos de tapa rosca estériles (1, 1.5 o 2 ml) o similar; o tubos Vacutainer de plástico sin anticoagulante.

3. PROCEDIMIENTO

3.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Posterior a la recolección de la muestra de sangre entera (tubo sin anticoagulante), ésta debe permanecer a temperatura ambiente (18° a 25°C) en posición inclinada para permitir la retracción natural del coágulo. Este proceso comienza entre los 30-40 minutos posteriores a la toma de muestra. Si se decide no desuero en las próximas horas, las muestras pueden ser refrigeradas por hasta 5 días, sin que se altere la condición de la muestra. Una vez transcurrido este periodo, se debe extraer el suero para evitar la hemólisis o contaminación del suero sanguíneo.

3.2. OBTENCIÓN DE SUERO

Iniciado el proceso de coagulación natural de la muestra de sangre entera, se puede proceder a la obtención del suero, para lo cual existen dos metodologías. El método por seleccionar dependerá de la disposición o no, de una centrífuga de tubos.

3.2.1. Obtención de suero mediante centrifugación

Una vez transcurrido el tiempo mínimo requerido para la retracción natural del coágulo (30-40 minutos), se deben centrifugar los tubos a 2000 rpm durante 5-10 minutos, con la finalidad de separar el suero del coágulo de la muestra.

3.2.2. Obtención de suero manualmente

Para la obtención manual de suero, las muestras de sangre entera deben permanecer a temperatura ambiente (18° a 25°C) hasta 12 horas tras haber sido tomada la muestra. Luego pueden refrigerarse por hasta 5 días, hasta que sean desueradas.

3.3. RECOLECCIÓN DE SUERO

Sin importar la metodología de obtención utilizada, el suero debe ser recolectado en un tubo de tapa rosca estéril y debidamente identificado, utilizando los siguientes elementos:

- Micropipeta monocal, con puntas de micropipeta adecuadas según volumen a utilizar, y cuidando cambiar cada punta entre muestras (esquema 1).
- Pipeta Pasteur o gotario plástico, desechable e individual para cada muestra (esquema 1).
- Traspaso directamente desde el tubo, por vaciamiento (esquema 2).

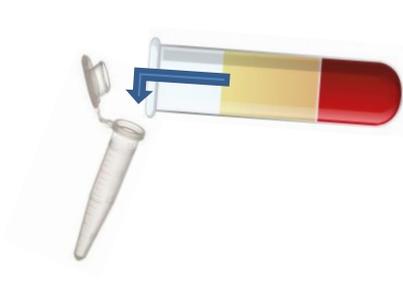
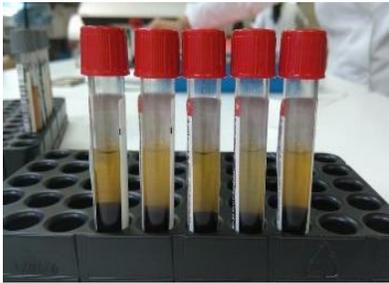
Este último, procedimiento debe ser realizado cuidadosamente, teniendo la precaución de extraer sólo el líquido correspondiente al suero, sin romper ni tomar el coágulo formado en el fondo del tubo, ya que de lo contrario se obtendrá suero hemolizado, lo que implica una muestra no apta para su posterior análisis serológico y, como consecuencia, se deberá realizar obligatoriamente un proceso de centrifugación para lograr nuevamente la obtención de suero.

El volumen mínimo de suero a recolectar de cada muestra debe ser de **0,5 ml**.

Esquema 1. Recolección de suero utilizando Micropipeta o pipeta Pasteur.



Esquema 2. Recolección de suero mediante vaciamiento manual.



3.4. ALMACENAMIENTO DE SUERO

El proceso de recolección del suero permite que este tipo de muestra sea preservada en el tiempo, favoreciendo su aptitud para la realización de los análisis serológicos, en circunstancias en que las muestras de sangre entera no puedan ser enviadas y/o procesadas dentro de 5 días posteriores a la toma de muestra.

3.4.1. Almacenamiento de suero en refrigeración

Las muestras de suero pueden ser almacenadas a temperatura de refrigeración (2° a 8°C), conservando sus propiedades y características inmunológicas, por un periodo que no supere los 7 días. Por lo tanto, esta es sólo una opción de almacenamiento a corto plazo.

3.4.2. Almacenamiento de suero en congelación

Las muestras de suero deben ser almacenadas a temperatura de congelación (-15° a -20°C) inmediatamente después de su recolección, en situaciones en las que se requiera realizar un correcto almacenamiento a largo plazo.

Una vez congeladas las muestras de suero, evitar ciclos de congelación-descongelación, ya que esto perjudicará las propiedades inmunológicas de las muestras. Las muestras de suero en congelación duran sin inconvenientes varios meses o años (cuidando las condiciones de temperatura de congelación).

4. ANEXOS

Muestras de sangre entera gelificadas

Existen muestras en las que el proceso de coagulación puede verse alterado, impidiendo la formación del coágulo debido a la gelación de la muestra de sangre entera.

Manejo de muestras de sangre entera, obtención y conservación de suero para el diagnóstico serológico

Este proceso suele ocurrir por varios factores, por ejemplo: en lugares donde la temperatura ambiente no alcanza el rango mínimo de 18°C; en sitios en que la altura sobre el nivel del mar provoca una disminución de la concentración de oxígeno de la sangre; cuando las condiciones fisiológicas del animal se encuentran alteradas por deshidratación, tratamientos hormonales o enfermedades concomitantes.

Para lograr la obtención de suero en estos casos, se debe pinchar un par de veces la muestra de sangre entera gelificada con una aguja o punta de micropipeta previo a su centrifugación u obtención de forma manual a temperatura ambiente. Si este procedimiento no logra generar completamente la obtención de suero, las muestras deben someterse a baño termorregulado a una temperatura de 56° C durante 30 minutos y luego centrifugar.