

Manejo de las Centrífugas

FECHA: 10/Jun/2024

1. Objeto

Dar a conocer el uso de las centrifugadoras Allegra 6 no refrigerada, la Boeco S - 8, Boeco C-28 y la centrifuga Hettich Eba 200 las cuales se utilizan para la separación de muestras.

2. Alcance

Este instructivo debe ser aplicado por el personal encargado de separación y clasificación de muestras en todas las sedes.

3. Como determinar las revoluciones por minuto para cada centrifuga

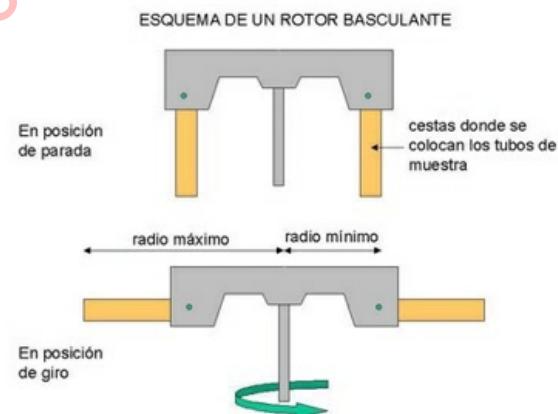
Generalidades:

La centrifugación es un método que utiliza la propiedad de sedimentación de partículas con base en la masa de las moléculas para la separación de partículas de una solución. Una de las técnicas más empleadas es la centrifugación. Se basa en hacer girar el tubo a gran velocidad de forma que se produzca la acumulación en el fondo del mismo de las partículas que tienden a hundirse por tener una densidad menor que la del medio en que se encuentran. Así, después de la centrifugación la muestra, homogénea, se habrá separado en dos fracciones: sobrenadante (supernatant), fracción homogénea que no ha sedimentado, y el sedimento (pellet) que ha quedado adherida al fondo del tubo. La fuerza centrífuga es aplicada a cada partícula de la muestra la cual será sedimentada en un índice que es proporcional a la fuerza centrífuga aplicada.

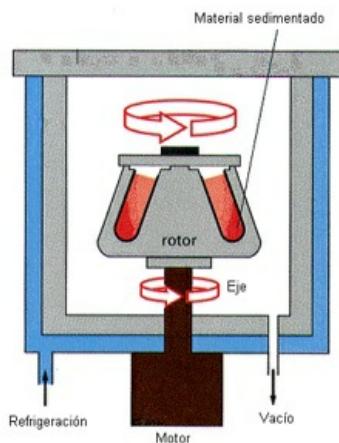
Centrifuga:

Las centrifugadoras son instrumentos que permiten someter a las muestras a intensas fuerzas que producen la sedimentación en poco tiempo de las partículas que tienen una densidad mayor que la del medio que las rodea. En general se diferencian en función de los márgenes de aceleración a que someten a las muestras en: centrifugadoras (de pocas g a aprox. 3000 g), super-centrifugadoras (o centrifugadoras de alta velocidad, rango de 2000 g a 20000 g) y ultracentrifugadoras (de 15000 g a 600000 g). En las ultracentrifugadoras, la velocidad extrema (más de 100000 rpm), hace que sea necesario hacer un intenso vacío en la cámara de la centrifugadora para evitar el calentamiento de rotor y muestra. En una centrifugadora el elemento determinante es el rotor, dispositivo que gira y en el que se colocan los tubos. Existen varios tipos:

. Rotor basculante. Los tubos se colocan en un dispositivo (cestilla) que, al girar el rotor, se coloca en disposición perpendicular al eje de giro. Así pues los tubos siempre giran situados perpendicularmente al eje de giro.



. Rotor de ángulo fijo. Los tubos se insertan en orificios en el interior de rotores macizos. El caso extremo es el de los rotores verticales en los que el tubo se sitúa paralelo al eje de giro.



Los parámetros a tener presentes en cualquier centrifugación, que determinarán las condiciones son :

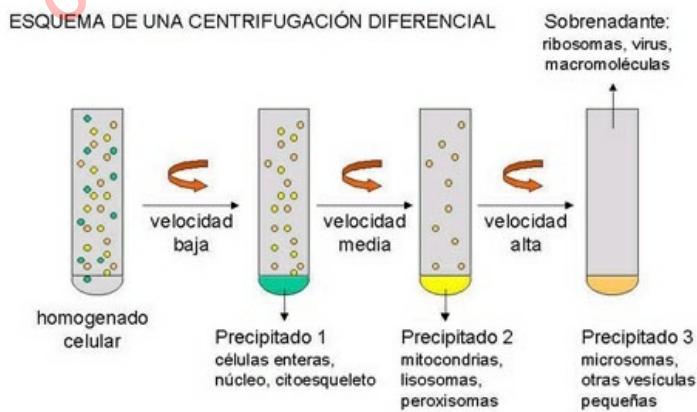
- . Volumen de solución a centrifugar, que determinará el tipo de tubos y rotores a emplear.
- . Naturaleza química de la solución, que determinará la naturaleza del tubo a emplear
- . Diferencial de densidad entre la partícula a sedimentar y la densidad del medio en el que se encuentra. En general cuanto mayor sea esa diferencia antes (menor tiempo y menor fuerza de aceleración) sedimentará. Cuando el diferencial es muy pequeño se pueden aplicar centrifugaciones de cientos de miles de g durante horas.

Todo rotor tiene unas propiedades que determinan las condiciones en que se podrá centrifugar la muestra. Son especialmente importantes el ángulo de giro, el radio mínimo, medio y máximo, y la velocidad máxima de giro. La relación entre la velocidad de giro, medida en revoluciones por minuto (rpm) y la fuerza de aceleración (fuerza centrífuga relativa, RCF : relative centrifuge force) a que se somete la muestra (g) se recoge en la expresión siguiente :

$$RCF = 1.118 * 10^{-5} * r * (rpm)^2$$

Centrifugación diferencial:

La centrifugación diferencial se basa en la existencia de diferentes partículas en la suspensión que difieren en su densidad de la del medio. Si se centrifuga en condiciones suaves (poco tiempo, poco fuerza de aceleración) sedimentarán las partículas mayores y/o más densas. Cuando el sobrenadante de la primera centrifugación es centrifugado de nuevo en condiciones de mas tiempo y más fuerza de aceleración sedimentan de nuevo las partículas más densas presentes y así sucesivamente. Se pueden aplicar condiciones crecientes de severidad en la centrifugación y obtener una colección de sedimentos que corresponden sucesivamente a fracciones de partículas de diferente tamaño y/o densidad.



Sedimentación:

Es el transporte de partículas en un campo de fuerza de centrifugación. Permite determinar peso molecular, densidad y forma de macromoléculas y organelas celulares.

Centrifugación en el laboratorio:

Está establecido que los sueros y plasmas diferentes a coagulación se deben centrifugar a 1300 g, orinas a 450 g, líquidos a 228 g y plasmas para pruebas de coagulación a 1500 g. Para poder calcular las revoluciones por minuto se aplica la fórmula de la fuerza centrífuga relativa. Ejemplo:

La centrifuga Boeco tiene un radio de 10, esta información está en el manual del usuario, esta centrifuga se va a usar en la separación de sueros es decir a 1300 g, a cuantas revoluciones por minuto la debo usar?

Aplico la formula:

$$RCF = 1.118 * 10^{-5} * r * rpm^2$$

$$1300 g = 1.118 * 10^{-5} * r * rpm^2$$

$$\frac{1300}{0.0001118} = rpm^2$$

$$\sqrt{11627906.97} = rpm$$

$$rpm = 3409$$

Cada centrifuga del laboratorio que tiene diferentes revoluciones por minuto tiene una placa con la indicación de las revoluciones que se deben manejar de acuerdo a la muestra a centrifugar.

4. Recomendaciones del CLSI para la obtención de las muestras de suero

Pre-centrifugación

- ✓ Los tubos deben ser invertidos suavemente de 5 a 10 veces para mezclar el contenido con el aditivo, esto evitará la formación de fibrina posterior a la centrifugación.
- ✓ Mantener a los tubos en una posición vertical para promover la completa formación del coágulo disminuyendo la agitación del tubo, esto prevendrá la formación de fibrina por la adhesión del coágulo al tapón del tubo así como el potencial de hemólisis.
- ✓ Las muestras no centrifugadas enviadas al laboratorio para análisis, deberán llegar en un tiempo límite para ser centrifugadas y proteger la estabilidad de los metabolitos. De no ser posible, la muestra debe ser centrifugada en el sitio donde se realizó la recolección, posteriormente enviar la muestra separada al laboratorio bajo las condiciones apropiadas.

Centrifugación

- ✓ Las muestras deberán estar completamente coaguladas antes de la centrifugación (30 min). Rodear el coágulo con un aplicador para desprendérselo de las paredes del tubo no es recomendable ya que incrementa el potencial de hemólisis.
- ✓ Determinar las rpm requeridas para centrifugar el tubo siguiendo las recomendaciones del fabricante ya que los tubos pueden requerir diferentes velocidades y tiempos de centrifugación.
- ✓ Aumentar las rpm para acelerar la separación puede ocasionar un calentamiento excesivo en la centrifuga, lo que afectará la estabilidad de la muestra y el desempeño del tubo.

Post-centrifugación

- ✓ La muestra de suero debe ser físicamente separada del contacto con las células tan pronto como sea posible, esto a menos de que exista evidencia concluyente que indique que los períodos largos de contacto no contribuyen a un error en el resultado. El tiempo de contacto no debe ser mayor a 2 hrs, para ello es recomendable el uso de separadores.
- ✓ Los tubos primarios no deben ser re-centrifugados. Algunas mediciones, principalmente el potasio, pueden resultar en valores falsamente incrementados. Si la re-centrifugación es requerida el suero debe ser transferido a otro tubo para ser centrifugado.
- ✓ Para el uso de tubos con separadores como la barrera de gel es importante seguir las recomendaciones del fabricante.
- ✓ El laboratorio debe establecer los criterios para el rechazo de muestras no adecuadas para el análisis. Lo anterior cuando se tenga una incorrecta identificación de la muestra, un inapropiado volumen, el uso de tubos no adecuados, presencia de hemólisis y un inapropiado almacenamiento y transporte.

5. Actividades

ALLEGRA 6 NO REFRIGERADA

1. Al encender la centrífuga, el tablero electrónico (ACCU - SET - RPM) debe marcar 0000 rpm.
2. Confirmar que el botón de velocidad este ubicado en las revoluciones adecuadas.
3. Si se desea, se debe verificar la velocidad programada, presionando el botón de la parte inferior del tablero electrónico.
4. Programar el freno según necesidad (rápido, lento, sin freno).
5. Al cerrar la centrífuga, presionar fuerte la tapa hacia abajo hasta escuchar que quede asegurada.
6. Mover el seguro de la tapa hacia la derecha y programar el tiempo necesario según la muestra a separar.
7. Cuando la centrífuga termine, el tablero de las rpm se pone en 000, esto indica que ya se puede abrir.
8. Retirar el seguro girando hacia la izquierda.
9. Abrir la tapa del botón DOOR oprimiéndolo hacia la parte que dice OPEN.

El panel de control esta dividido en cuatro áreas:

1. Área donde selecciono las revoluciones por minuto, tiene dos flechas ▼ ▲ para escoger si deseo aumentar ▲ o disminuir ▼ las revoluciones, en el tablero me aparece con dos números para indicar las rpm.
2. Área donde me indica si la centrífuga esta funcionando: Cuando no esta funcionando la centrífuga me muestra una raya indicando que no esta en movimiento, de lo contrario se ve en la pantalla que la raya se convierte en un círculo en movimiento.
3. Área donde me indica el tiempo programado para centrifugar.
4. Área para dar inicio a la centrifugación (START) o para parar (STOP).
5. Para abrir la tapa se debe presionar al lado izquierdo de la tecla STOP.

HETTICH EBA 200

Teclas del panel de manejo

- ▼ ▲ RPM/RCF :Introducir directamente el número de revoluciones. Manteniendo pulsada la tecla el valor cambia con velocidad creciente.
- ▼ ▲ t. Introducir directamente el tiempo de ejecución. Ajustable hasta un minuto en pasos de un segundo y a partir de un minuto en pasos de un minuto. Introducir los parámetros de centrifugado. Manteniendo pulsada la tecla el valor cambia con velocidad creciente.

SELECT: Tecla para seleccionar los parámetros individuales. Por cada nueva pulsación de la tecla se selecciona el parámetro siguiente.

RCF: Comutar entre indicación RPM (RPM) y indicación RCF (>RCF<) los valores RCF se indican entre paréntesis ><. RPM número de revoluciones RCF aceleración centrífuga relativa.

START/PULSE: Inicia el ciclo de centrifugado. Centrifugado de corta duración. El ciclo de centrifugado se ejecuta mientras se tenga presionada la tecla.

STOP/OPEN: Termina el ciclo de centrifugado, el motor marcha por inercia con el nivel de frenado preseleccionado. El pulsado doble de la tecla activa la parada de emergencia. Desbloquear la tapa.

6. Limpieza de las centrífugas

- * Realice una limpieza rápida de la centrífuga por dentro y por fuera con un trapo húmedo con alcohol al 70%.
- * Saque los portatubos y límpielos con hipoclorito lávalos con agua y jabón suave, estos deben secarse hacia abajo y no ubicarlos en la centrífuga hasta que no estén secos.
- * Utilice cepillos plásticos de cerdas suaves en las actividades de limpieza del rotor y detergente suave en baja concentración.
- * No humedezca demasiado la centrífuga, verifique que no le caiga ni agua ni jabón al rotor.
- * Lavar el rotor inmediatamente en caso de que se presenten derrames.

7. Bibliografía

Tood, Stanford. Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio. 1988. Salvat. Tomo I. Pág 14.
Manuales de cada centrífuga.

Si este documento se encuentra impreso no se garantiza su vigencia, por lo tanto es copia NO CONTROLADA, la versión actual se encuentra en Isolución

VERSION	FECHA	RAZON DE LA ACTUALIZACION
02	02/May/2006	Se elimina la centrífuga Clay Adams y se adiciona la Boeco S - 8 con sus pasos para el manejo.
03	12/Ago/2009	Se revisa y no es necesario modificarlo.
04	04/Ago/2011	Se modifican las revoluciones de la centrífuga Boeco.
04	12/Nov/2013	Se revisa el instructivo y no es necesario modificarlo.
05	23/Feb/2015	Se adiciona centrífuga Hettich y limpieza de las centrífugas.
05	19/Ene/2016	Se revisa y no se modifica
06	08/Feb/2017	Se adiciona Como determinar las revoluciones por minuto para cada centrífuga.
06	09/Ene/2018	Se revisa y no se modifica
06	14/Ene/2019	Se revisa y no se modifica
06	07/Feb/2020	Se revisa y no se modifica
06	14/Ene/2021	Se revisa y no se modifica.
06	07/Ene/2022	Se revisa y no se modifica.
06	03/Ene/2023	Se revisa y no se modifica.
06	05/Ene/2024	Se revisa y no se modifica.
07	10/Jun/2024	Se cambia limpieza con hipoclorito a 5000 ppm por alcohol al 70%
07	23/Ene/2025	Se revisa y no se modifica.



ELABORÓ	REVISÓ	APROBO
Nombre: Yulime Andrea Monsalve Martinez Cargo: Dirección de Calidad Fecha: 10/Jun/2024	Nombre: Diana Patricia Bedoya Jaramillo Cargo: Bacteriólogo(a) de Hematología Centro Fecha: 10/Jun/2024	Nombre: Carlos Gonzalo Robledo Restrepo Cargo: Director General Fecha: 11/Jun/2024

COPIA CONTROLADA