

CBE/SEA/USAL	
EXTRACCIÓN DE SANGRE (RATA, RATÓN Y COBAYO)	REVISADO: 04-2012
PNTSEA#1	PÁGINA 1 DE 7

1-PROPÓSITO

Extraer sangre siguiendo pautas recomendadas. Este es un PTN general que debe completarse con información específica por parte del IP. Cualquier desviación de éste procedimiento debe describirse en la “solicitud oficial del Proyecto experimental de uso de animales”

2-ÁMBITO

Aplicable a la extracción de sangre de ratas, ratones, hámsters y cobayos.

3-SEGURIDAD

Usar ropa de protección , guantes y gafas. Utilizar las agujas y el material cortante con precaución y disponer de los contenedores adecuados para desechar el material en contacto con la sangre.

4. INFORMACIÓN REQUERIDA

4.1 Especie:

4.1.1 Edad:

4.1.2 Sexo:

4.1.3 Peso aproximado:

4.2 Trayecto vascular elegido (marcar la casilla correspondiente)

<input type="checkbox"/>	Sección de cola
<input type="checkbox"/>	Vena safena
<input type="checkbox"/>	Yugular (con aguja)
<input type="checkbox"/>	Yugular (con catéter)
<input type="checkbox"/>	Femoral (con catéter)
<input type="checkbox"/>	Seno venoso orbitario
<input type="checkbox"/>	Punción cardiaca
<input type="checkbox"/>	Decapitación
<input type="checkbox"/>	Submandibular
<input type="checkbox"/>	Otras(especificar)

4.3 Volumen extraído(en cada punción)

4.4 Frecuencia de extracción:

4.5 Hay cambios en éste procedimiento que consten en la solicitud oficial

4.6 Fecha

4.7 Firma

POR FAVOR, ADJUNTAR SÓLO ESTA HOJA FIRMADA A LA SOLICITUD OFICIAL DEL CBE/USAL PARA SU APROBACIÓN

CBE/SEA/USAL	
EXTRACCIÓN DE SANGRE (RATA, RATÓN Y COBAYO)	REVISADO: 04-2012
PNTSEA#1	PÁGINA 2 DE 7

5 Equipo

- 5.1 Alcohol etílico al 70%.
- 5.2 Algodón o gasas.
- 5.3 Jeringas (1 o 5 ml)
- 5.4 Agujas (23 G.
- 5.5 Tubos Eppendorf.

6 Volumen de colección aceptable en todas las especies

6.1 Sangrado único

- Hasta un 10% del volumen de sangre circulante en animales sanos. La extracción o reposición de líquidos se debe efectuar lentamente (1-2 min.) y a un ritmo constante.
- Si se repone la sangre extraída, se deben utilizar suero salino templado en igual cantidad, administrado por vía endovenosa o intraperitoneal.
- Volumen de sangre circulante
 - Rata- 60 ml/kg
 - Ratón- 80 ml/kg
 - Cobayo- 80 ml/kg
 - Hámster- 78 ml/kg

6.2 Sangrado repetido en intervalos cortos

- Se puede extraer hasta un 1% del volumen de sangre circulante en animales sanos cada 24 horas La extracción o reposición de líquidos se debe efectuar lentamente (1-2 min.) y a un ritmo constante.

6.3 Síntomas clínicos a considerar

- Shock hipovolémico: pulso rápido e irregular, membranas mucosas pálidas y secas, piel y extremidades frías, inquietud, hiperventilación e hipotermia.
- Anemia: mucosas y lengua pálidas, intolerancia al ejercicio, taquipnea en reposo.

6.4 Ayuno preanestésico

- Las ratas, ratones y hámsters no vomitan y poseen una alta tasa metabólica no estando recomendado su ayuno previo. El cobayo puede ser sometido a ayunas durante 2-4 horas

7 Métodos aconsejados:

7.1 Volúmenes de menos de 100 µl.

7.1.1 Corte de cola en rata y ratón

- En animal sin anestesiar y utilizando un método o dispositivo de inmovilización adecuado para la especie, calentar la cola mediante una lámpara o agua caliente durante 5-10 minutos.
- Lavar la cola de cualquier resto de heces u orina y aplicar etanol al 70% dejándolo evaporar.
- Situar la cola sobre una superficie plana y limpia y cortar perpendicularmente con una hoja estéril de bisturí, aproximadamente 1-2 mm desde el extremo de la cola. Cambiar la hoja entre animales.

CBE/SEA/USAL	
EXTRACCIÓN DE SANGRE (RATA, RATÓN Y COBAYO)	REVISADO: 04-2012
PNTSEA#1	PÁGINA 3 DE 7

- Aplicar una suave presión proximalmente al corte y recoger la sangre mediante capilares o tubos apropiados.
- Aplicar hemostasia mediante presión suave, torunda estéril o similar durante 30-45 segundos. Si persiste la hemorragia puede aplicarse un apósito con hemostático .
- Devolver el animal a su jaula.
- Se pueden obtener muestras seriadas durante cortos periodos de tiempo retirando la postilla de la herida.
- No se deben realizar más de tres amputaciones del mismo animal. En ratas, pueden provocarse problemas locomotores y granulomas.

7.1.2 Vena safena lateral: rata, ratón , hámster y cobayo

- Se realiza en animal consciente
- Introducir el animal en un inmovilizador apropiado y extender una de las extremidades posteriores cogiendo un pliegue de piel entre la cola y el muslo.
- Rasurar o depilar la zona baja de la extremidad para visualizar la vena. Aplicar alcohol al 70% y dejar evaporar.
- Aplicar vaselina estéril para facilitar la recogida de sangre y presionar proximalmente al sitio de punción.
- Punzar la vena con una aguja de 25G y recoger la sangre con un capilar.
- Se pueden obtener muestras seriadas durante cortos periodos de tiempo retirando la postilla de la herida.

7.1.3 Vena yugular: rata y cobayo

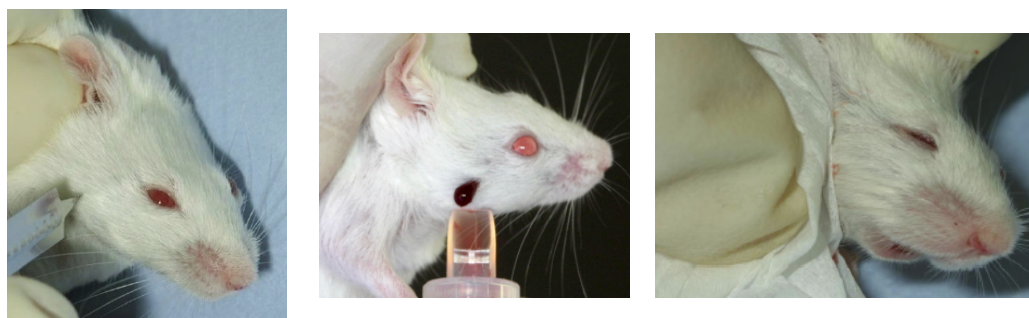
- El animal se anestesia (PNSEA#2) comprobando que existe un plano profundo de la misma antes de comenzar el procedimiento. (falta de reflejos al pinchar la almohadilla plantar, relajación y respiración regular)
- Poner el animal en decúbito supino y con la cabeza hacia el operador
- Extender el cuello y afeitar o depilar lateralmente a la línea media del lado donde se va a punzar. Aplicar povidona yodada o etanol al 70% y dejar evaporar.
- Usando el ángulo mandibular como guía, con una jeringa de 2 ml y una aguja de 21G, introducir la aguja lentamente a través de la piel en esta dirección con un ángulo de 30° y siguiendo la línea entre el ángulo de la mandíbula y el hombro.
- Retraer un poco el émbolo de la jeringa hasta que salga sangre lo que indica que hemos canalizado la vena
- Extraer lentamente la sangre.
- Aplicar presión moderada sobre la zona con una torunda estéril durante 30-45 s para realizar hemostasia y prevenir la formación de un hematoma.
- Se pueden obtener muestras seriadas durante cortos periodos de tiempo retirando la postilla de la herida. Los intervalos entre muestras deben ser de al menos 24 horas y preferiblemente de 48 horas

CBE/SEA/USAL	
EXTRACCIÓN DE SANGRE (RATA, RATÓN Y COBAYO)	REVISADO: 04-2012
PNTSEA#1	PÁGINA 4 DE 7

7.2 Volúmenes de hasta **250 µl**.

7.2.1 Seno venoso submandibular: ratón

- Se realiza en animal consciente
- Se inmoviliza al animal cogiendo un pellizco de piel lo más amplio posible de la región dorsocervical y estirando la piel del cuello para practicar éstasis venoso en la región cefálica durante un corto período de tiempo
- Es útil aplicar vaselina estéril para facilitar la recogida de sangre
- Punzar con lanceta o aguja de 18-21G junto al ángulo caudal mandibular y recoger la sangre con capilar o en un eppendorf



- Aplicar algo de presión con una gasa estéril
- Devolver al animal a su jaula

7.3 Cateterizaciones endovenosas crónicas (CONSIDERACIONES GENERALES)

- Las venas sufren vasoconstricción cuando se manipulan, así que es conveniente dejarlas sin perturbar durante uno o dos minutos antes de la cateterización.
- El catéter debe mantenerse limpio diariamente para asegurar su buen funcionamiento y disminuir la probabilidad de infección. Para ello se extraerá la solución de heparina y se limpiará con solución salina estéril los restos que queden en el catéter para que vuelvan de nuevo a la circulación, reponiendo con solución heparinizada estéril.
- Se debe vigilar diariamente el sitio de implantación para observar cualquier síntoma de inflamación (enrojecimiento, abultamiento) o infección (descarga purulenta o olor inusual).

7.3.1 Cateterización de la vena yugular: rata y cobayo

- Técnica recomendada para extracción de muestras seriadas en estudio crónicos.
- Emplear catéteres estériles del calibre apropiado y con un conector terminal adecuado al tipo de jeringa.

CBE/SEA/USAL	
EXTRACCIÓN DE SANGRE (RATA, RATÓN Y COBAYO)	REVISADO: 04-2012
PNTSEA#1	PÁGINA 5 DE 7

- El animal es anestesiado mediante el PNSEA#2 comprobando que existe un plano profundo de la misma antes de comenzar el procedimiento. (falta de reflejos al pinchar la almohadilla plantar, relajación y respiración regular)
- Poner el animal en decúbito supino y con la cabeza hacia el operador
- Extender el cuello y afeitar o depilar lateralmente a la línea media del lado donde se va a punzar. Aplicar povidona yodada o etanol al 70% y dejar evaporar.
- Realizar una incisión de 1,5-2 mm a un lado de la línea media. Remover la grasa despejando el campo y procurando no tocar la vena.
- Deslizar dos hilos de seda bajo la vena ayudados por un mosquito. Ocluir la ligadura anterior dejando la posterior sin anudar.
- Ayudándonos del hilo posterior levantar ligeramente al vena y realizar un ojal entre los dos hilos con una tijera de iris.
- Introducir un catéter estéril y relleno de solución heparinizada (20UI/ml) en dirección hacia el corazón, retirar la guía y anudar la ligadura posterior sobre el catéter y la vena.
- Verificar la posición del catéter conectando una jeringa con solución salina estéril y comprobando si sale sangre para volver a rellenar el mismo con la solución heparinizada a efectos de conseguir un tapón a prueba de coagulaciones.
- Realizar una tercera ligadura en el punto de entrada del catéter.
- Para exteriorizar el catéter, se afeita la región dorsal del cuello y se aplica etanol 70%. Se realiza una incisión de 0,5-1 cm y se realiza un túnel subcutáneo con un mosquito desde el dorso hasta la incisión del catéter.
- Ayudados por el mosquito o similar introducimos el catéter siguiendo una curva amplia por el túnel sacándolo por la incisión dorsal y procurando que no exista tensión en su trayecto.
- Se deja el catéter sobresalir unos 2,5-3 cm y se tapa. Se sutura la incisión aplicando antibióticos tópicos.
- El cuello se envuelve con una ligera venda que incluya el catéter y que deje pasar un dedo entre éste y la piel del cuello.

7.3.2 Cateterización de la vena femoral: rata y cobayo

- Técnica recomendada para extracción de muestras seriadas en estudio crónicos.
- Emplear catéteres estériles del calibre apropiado y con un conector terminal adecuado al tipo de jeringa.
- El animal es anestesiado mediante el PNSEA#2 comprobando que existe un plano profundo de la misma antes de comenzar el procedimiento. (falta de reflejos al pinchar la almohadilla plantar, relajación y respiración regular)
- Poner el animal en decúbito supino y con la cabeza hacia el operador
- Medir la longitud de catéter requerida
- Extender el muslo y afeitar o depilar la superficie medial. Aplicar povidona yodada o etanol al 70% y dejar evaporar.

CBE/SEA/USAL	
EXTRACCIÓN DE SANGRE (RATA, RATÓN Y COBAYO)	REVISADO: 04-2012
PNTSEA#1	PÁGINA 6 DE 7

- Realizar una incisión de 1,5-2 mm exponiendo la arteria y la vena femoral. La vena, más gruesa y de color azul, está rodeada de un fino tejido conectivo que se disecciona con cuidado, separándola de la arteria
- Deslizar dos hilos de seda bajo la vena ayudados por un mosquito. Ocluir la ligadura anterior dejando la posterior sin anudar.
- Ayudándonos del hilo posterior levantar ligeramente al vena y realizar un ojal entre los dos hilos con una tijera de iris.
- Introducir un catéter estéril y relleno de solución heparinizada (20UI/ml) en dirección craneal, retirar la guía y anudar la ligadura posterior sobre el catéter y la vena.
- Verificar la posición del catéter conectando una jeringa con solución salina estéril y comprobando si sale sangre para volver a rellenar el mismo con la solución heparinizada a efectos de conseguir un tapón a prueba de coagulaciones.
- Realizar una tercera ligadura en el punto de entrada del catéter.
- Para exteriorizar el catéter, se afeita la región dorsal del cuello y se aplica etanol 70%. Se realiza una incisión de 0,5-1 cm y se realiza un túnel subcutáneo con un mosquito desde el dorso hasta la incisión del catéter.
- Ayudados por el mosquito o similar introducimos el catéter siguiendo una curva amplia por el túnel sacándolo por la incisión dorsal y procurando que no exista tensión en su trayecto.
- Se deja el catéter sobresalir unos 2,5-3 cm y se tapa. Se sutura la incisión aplicando antibióticos tópicos.
- El cuello se envuelve con una ligera venda que incluya el catéter y que deje pasar un dedo entre éste y la piel del cuello.

7.4 Volúmenes de más de 100 µl.

7.4.1 Métodos no terminales

- **Vena yugular (percutáneo)**
- **Vena yugular (cateterismo)** ver 7.2.1
- **Vena femoral (cateterismo)** ver 7.2.2

7.4.2 Métodos terminales

- **Seno venoso retroorbitario**
 - El animal es anestesiado mediante el PNT xx comprobando que existe un plano profundo de la misma antes de comenzar el procedimiento. (falta de reflejos al pinchar la almohadilla plantar, relajación y respiración regular)
 - El animal se dispone en decúbito prono con la cabeza hacia el operador.
 - Utilizar el índice y pulgar para retraer la piel de la cara y protuir el globo ocular.

CBE/SEA/USAL	
EXTRACCIÓN DE SANGRE (RATA, RATÓN Y COBAYO)	REVISADO: 04-2012
PNTSEA#1	PÁGINA 7 DE 7

- Insertar un capilar de microhematocrito heparinizado por la parte superior del globo ocular en dirección medial hasta romper el seno orbitario
- Repetir el llenado de más capilares hasta que sea dificultoso llenarlos par continuar con el otro seno orbitario.
- Eutanasiar al animal cuando se complete la extracción de sangre.

- **Punción cardiaca**
 - El animal es anestesiado mediante el PNSEA#2 comprobando que existe un plano profundo de la misma antes de comenzar el procedimiento. (falta de reflejos al pinchar la almohadilla plantar, relajación y respiración regular)
 - Poner al animal en decúbito supino
 - Utilizar una jeringa de (1ml /aguja de 25g en ratón; 5-10ml/ aguja 23G en rata o hámster)
 - Localizar la apófisis xifoides del esternón y pinchar lateralmente a esta en dirección craneoventral con un ángulo de 30° ejerciendo una pequeña presión negativa en la jeringa una vez introducida hasta que salga sangre.
 - Terminar de llenar la jeringa retrayendo el émbolo lentamente.
 - Eutanasiar al animal cuando se complete a extracción

- **Decapitación**
 - Anestesiarse al animal cuando no exista contraindicación expresa
 - Decapitar utilizando un aparato adecuado con cuchillas en buen estado de forma rápida y por un operador experto
 - Recoger la sangre mediante un recipiente adecuado