

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD
LICENCIATURA EN LABORATORIO CLINICO



Tema:

Comparación de la prueba cruzada en tubo y en gel.

Ensayo final de pre-especialización en banco de sangre

Presentado por:

Jenny Alejandra Aguilar Ávila.

Asesor:

Licda. Yanira Elizabeth Cerón Cerón

Sábado 27 de Septiembre de 2024

AUTORIDADES DE UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MSC JUAN ROSA QUINTANILLA

VECERRECTORA

DRA. EVELIYN BEATRIZ FARFÁN

VECERRECTOR ADMINISTRATIVO

MSC. ROGER ALAS

SECRETARIO GENERAL

LICENCIADO PEDRO ROSALÍO ESCOBAR CASTANEDA

DEFENSORA DE LOS DERECHOS UNIVERSITARIOS

LICENCIADA ANA RUTH AVELAR

FISCAL

LICENCIADO CARLOS AMILCAR SERRANO RIVERA

AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE MEDICINA

DECANO

DR. SAÚL DÍAZ PEÑA.

VICEDECANO

LICENCIADO FRANKLIN ARNULFO MÉNDEZ DURÁN.

SECRETARIO

LICENCIADO ROBERTO CARLOS HERNÁNDEZ MARROQUÍN

ADMINISTRADOR ACADÉMICO

MSC. JOSEFA MORAN DE COREAS.

DIRECTORA DE ESCUELAS DE CIENCIAS DE LA SALUD

MSC. MÓNICA RAQUEL VENTURA DE RAMOS.

DIRECTORA DE LA CARRERA

LICDA. YANIRA ELIZABETH CERÓN CERÓN.

Índice

Contenido

Introducción	1
Desarrollo	2
Procedimiento de la Fase Salina	2
Procedimiento de la fase Proteica	3
Falsos negativos	4
Principios del CAT/GEL	6
Prueba en tubo.....	7
Técnica en tubo	9
Conclusión	10
Referencias Bibliográficas	12

Introducción

Dentro del Banco de sangre existe diversidad de pruebas a realizar ya sea antes de una donación y después, así como pruebas que controlan el proceso de transfusión.

En este apartado el enfoque será dirigido a pruebas pretransfusionales inmuno hematológicas; dentro de ellas está la determinación del grupo sanguíneo ABO/ Rh, estudio del fenotipo, Rastreo de Anticuerpos Irregulares y la Prueba cruzada, que es conocida como la prueba de compatibilidad. Su objetivo es prevenir la transfusión de sangre incompatible evitando las reacciones transfusionales agudas o tardía, ya que se busca ayudar a la pronta recuperación del paciente sin ocasionarle daños a su salud o intervención.

Dentro del contexto histórico está Karl Laisteiner quien fue el primer científico que descubrió que la sangre de dos individuos podía ser compatible o incompatible, estudiaba el porqué de esa relación entre los componentes de la sangre. Debido a sus asombrosos estudios el señor Hektoen en 1907 logró detectar por qué se llegaba a esa incompatibilidad ABO, posteriormente comenzaron las pruebas de compatibilidad. En el año 1908 Reuben Ottenberg desarrolló y modifico los medios de reacción, temperatura y tiempo. Procedimiento que detectaba la presencia de anticuerpos y donde se llevó a cabo la incompatibilidad in vitro. La palabra compatibilidad fue relacionada al cruce que se realiza con la sangre de un donante y la sangre del receptor. (Perez, 2015)

Podemos definir entonces, como prueba cruzada una prueba inmunohematológica cuyo principio es la hemaglutinación y el objetivo final es el evitar reacciones adversas al receptor como lo son falla renal aguda y problemas hemorrágicos, evitando así que cualquier anticuerpo que sea absorbido y llegue directamente a la membrana del eritrocito y cause menor tiempo de vida al eritrocito, debido a que los glóbulos rojos transfundidos solo tienen un periodo de vida de máximo 60 días; es una de las pruebas más importantes en Banco de sangre, por lo cual debe existir una correlación entre las pruebas serológicas y el tiempo de vida de los hematíes.

Desarrollo

Por medio de este procedimiento como profesionales en Laboratorio Clínico nos permite conocer si existe la compatibilidad serológica entre el donador y el receptor. Por lo tanto, se garantiza la compatibilidad de glóbulos rojos ABO compatibles. Cabe mencionar que la prueba cruzada trata de evitar reacciones inmediatas a la transfusión, La prueba cruzada no detecta anticuerpos contra plaquetas y leucocitos, tiene características específicas que favorecen a la realización in vitro. Es sencilla porque su procedimiento se sigue de acuerdo a la técnica estandarizada, en el suero del receptor no debe haber anticuerpos de importancia clínica contra los antígenos eritrocitarios del donante.

De igual forma en el plasma a transfundir no deben haber anticuerpos de importancia clínica contra los antígenos eritrocitarios del receptor, a estas características también las podemos definir como prueba cruzada mayor y prueba cruzada menor.

Entonces, prueba cruzada Mayor es la prueba que más se utiliza en el Banco de sangre en donde se selecciona suero del paciente junto a glóbulos rojos del donante, para comprender mejor este proceso se consideran 3 fases en las que se lleva a cabo y son (Bonilla-Zavala, 2006):

- ✓ Fase salina: es de centrifugación inmediata y se lleva a cabo de 20 a 24 °C un procedimiento que se realiza a temperatura ambiente se conoce que los anticuerpos de tipo IgM y son anticuerpos que son dirigidas contra antígeno A1, M, P1, I, H, Le, C, E, c. conocidos como anticuerpos frío.
- ✓ Fase proteica: a 37°C o Fase térmica: se ven involucrados antígenos del sistema Rh como lo son el antígeno D, E, c, Lea, Leb
- ✓ Fase Antiglobulina o fase de Coombs: anticuerpos de tipo inmune tipo IgG dirigidos contra antígenos

Procedimiento de la Fase Salina

Se debe preparar una suspensión de Glóbulos rojos al 5% se rotula el tubo y se agregan dos gotas de suero y se agrega 1 gota de la suspensión de glóbulos rojos al 5% se centrifuga por 15 segundos a 3,400 rpm y se lee. (Perez, 2015)

Procedimiento de la fase Proteica

Se agreda 2 gotas de albúmina, mezclar e incubar a 37°C de 15 a 30 minutos.

En la lectura se observa si hay hemolisis o aglutinación. Cabe mencionar que la albúmina actúa como potenciador para mejorar la reacción entre el antígeno y el anticuerpo. Se pueden potenciar algunos anticuerpos de tipo IgG cuando están presentes en altas dosis. (Perez, 2015)

Pero en la tercera fase se conoce que ya han desaparecido los anticuerpos fríos, cuando hablamos de anticuerpos inmunes o anticuerpos IgG y su título este en alta dosis es ahí donde aumenta la reactividad.

La fase de Coombs se detecta la presencia de anticuerpos de tipo inmune que son dirigidos contra los antígenos más importantes y se sabe son conocidos por ser origen proteico entre ellos está el Rh, Le, Dy, Kidd, Diego, por lo tanto en la prueba cruzada mayor pretendemos buscar anticuerpos de tipo IgG unidos a los glóbulos rojos.

Cabe recalcar que así hay presencia de la fracción C3b del complemento en los hematíe, esto será detectados con antisueros monoespecíficos esto es común en los casos donde la prueba cruzada nos da incompatible. (L. Barbolla. Hospital de Móstoles, 2008)

Cuando la prueba cruzada es compatible podemos tener la certeza y garantizar la confiabilidad de la unidad a transfundir, pero hay que tomar en cuenta que muchas veces como profesionales cometemos errores en la fase analítica como lo son lecturas incorrectas, esto se puede ver influenciado por la luz, o por técnicas incorrectas dando así un resultado erróneo, por ello siempre que se posea una boleta de orden para transfusión, siempre debemos hacer el tipeo correspondiente de las bolsas. Además el tiempo de lectura es importante ya que si prologamos el procedimiento no sería la técnica adecuada y si la lectura se realiza antes del tiempo podría presenciarse un falso positivo, además contribuye el tipo de centrifugación, aquellos materiales que no se lavaron correctamente, reactivos vencidos y la contaminación bacteriana de glóbulos rojos y suero así como aquellas muestras de pacientes que presenten anticuerpos fríos.

Falsos negativos

son aquellas situaciones donde una mala técnica será desde la forma de lectura hasta la forma como decantamos el lavado.

Para la suspensión de los glóbulos, se puede dar el caso que se omita algún elemento a procesar en la lectura, así como el almacenamiento de las bolsas y el tiempo de conservación, así mismo la contaminación y hemólisis son factores que hay que tomar en cuenta y considerar no omitir al momento de realizar una prueba cruzada.

Todos los materiales que ingresan a banco de sangre deben pasar por el control de calidad del banco.

En otras ocasiones podemos enfrentarnos a la presencia de Anticuerpos con efecto de dosis, para comprender mejor este apartado, nos referimos a que si existen glóbulos rojos que poseen mayor sitio antigénico, al observar una reacción de aglutinación podemos ver en un reporte de 4 cruces (4+) aquel aglutinado fuerte un botón bien definido mientras que en otros tipos de aglutinación se lleva a cabo con menor intensidad. (Almonacid., 2016)

La prueba Cruzada menor es aquella donde se va utilizar el plasma del donador y glóbulos rojos del receptor. La técnica nos dice que vamos agregar 2 gotas del suero o plasma del plasma del donador 1 gota de eritrocitos del receptor, siempre vamos a utilizar la suspensión de glóbulos rojos al 5% y en este caso se busca observar en la intensidad de la reacción observar la presencia de anticuerpos irregulares en el suero del donador. (Calidad, 2007)

Autotestigo: glóbulos rojos del receptor más plasma del receptor, la técnica dice agregas plasma y glóbulos rojos lavados al 5% del receptor.

Los métodos para realizar una prueba cruzada comprenden, la técnica en tubo que nos permite detectar anticuerpos inmunes y se considera una técnica muy utilizada en los bancos de sangre y técnica en tarjeta de gel, el cual es un procedimiento muy utilizado en la actualidad (vicuña, 2016)

Tarjetas Comerciales con Gel son Dispositivos comerciales, constituidos por microtubos, que contienen antisueros anti A, anti B y anti D, suspendidos en gel, además de anti IgG+ C3d para la determinación de la prueba de Coombs, prueba que confirma la prueba cruzada.

Para comenzar a trabajar en técnica de tarjeta de Gel tenemos que tener en cuenta que la muestra a utilizar ya sea plasma o suero no tenga fibrina.

En cuanto a la sangre o paquete globular que no esté hemolizada, y que no posea cambio en el color o indique sospecha de contaminación, se trabaja con diluyentes y se necesita tenerlos en temperatura ambiente, las tarjetas a utilizar siempre deben ir identificadas con el registro del paciente o el número de muestra a trabajar por ejemplo si el la dilución es la muestra número 100 en la tarjeta debe ir identificada como número 100.

Para reparar una suspensión de células de la unidad de GR a transfundir así: 1 mL de diluyente comercial #2 con 10 microlitros de los GR a transfundir y depositar en tubo plástico rotulado con el número de la unidad de GR a transfundir. (Perez, 2015)

Preparar una suspensión de células del receptor así: 1mL de diluyente comercial #2 con 10 microlitros de los GR del receptor (paciente) y depositar en tubo plástico rotulado como autocontrol.

A continuación tomar la tarjeta de prueba cruzada identificada como Anti IgG+C3d, y marcar con el nombre del paciente (receptor) a transfundir y rotular los microtubos de la misma tarjeta posteriores a la reclasificación así: primer y segundo microtubos: con el número de identificación de la unidad de GR a cruzar y el tercer microtubo con el autocontrol

Dispensar 25 microlitros de la dilución del tubo rotulado como autocontrol en los microtubos A, B, D y 50 microlitros en el microtubo marcado como autocontrol. Luego dispensar de la dilución del tubo marcado con el número de la unidad de GR a trasfundir, 25 microlitos en los microtubos A, B, D y 50 microlitros en el microtubo identificado con el número de la unidad de GR a transfundir. Agregar 25 microlitros de suero o plasma del receptor (paciente) en los microtubos marcados como autocontrol y como número (s) de la (s) unidad (es) de GR a transfundir. Incubar durante 15 minutos a una temperatura de 37°C en incubadora. Centrifugar durante 10 minutos a 1300 revoluciones

En caso de no compatibilidad se debe tomar otra unidad y realizar nuevamente el procedimiento. Si no se obtienen unidades compatibles, se debe transfundir la que menos cruces de incompatibilidad presente, previo análisis del caso con el médico tratante y el jefe del banco de sangre y Servicio de medicina transfusional. (ZR, 2006)

Si éstos acuerdan identificación de anticuerpos irregulares y transfusión con sangre fenotipada, se remitirá muestra del paciente (receptor) a Banco de sangre de referencia, para la realización de dichas pruebas. Si los resultados de las pruebas de hemoclasificación no concuerdan con la hemoclasificación en gel, se debe efectuar nuevamente hemoclasificación en tarjeta comercial y proceder según procedimiento “Hemoclasificación en gel” (Calidad, 2007)

Principios del CAT/GEL.

Se base en que los hematíes test y el plasma o suero del paciente se dispensan en una cámara situada encima de la columna. Después de una centrifugación, los hematíes son forzados a atravesar el la columna de gel/microesferas donde las aglutinaciones quedarán atrapadas, mientras que los hematíes no aglutinados viajarán hasta el fondo de la columna, formando un botón

Se conoce como reacción positiva: La porción Fc de la molécula de anticuerpo de AGH es ligada por la proteína A Los hematíes sensibilizados son ligados a la superficie del pocillo por inmovilización de las moléculas de AGH. Una reacción positiva está caracterizada por una capa de hematíes.

Se conoce como reacción negativa: cuando los hematíes no sensibilizados sedimentan en el fondo del pocillo después del último paso de centrifugación. La reacción Negativa es caracterizada por un botón de células después de la centrifugación

La combinación entre las fuerzas de rotura y las fuerzas de presión de las fuerzas de centrifugación maximiza las diferencias entre las reacciones positivas y negativas

En los métodos de Gel/CAT estas fuerzas de rotura las proporciona la centrifugación forzando a las células a pasar por una matriz de gel sephadex o de microesferas de cristal.

- Diferentes efectos de la fuerza de rotura Tubo
- Fuerzas de rotura aplicadas mediante la agitación del tubo CAT/Gel
- Fuerzas de rotura a través de la matriz aplicadas por centrifugación Capture
- Emplea las dos fuerzas para promover la adhesión, fuerzas de rotura y de presión.

Es importante mencionar aquellos diluyentes que se utilizan para potenciar una reacción entre ellas la albumina, el LISS y solución salina utilizado en el proceso de lavado, solo los potenciadores más usados al momento de hacer una dilución. (Calidad, 2007)

Solución salina de baja fuerza iónica (LISS) Aspecto; sin turbidez ni partículas. No hemolizar ni causar aglutinación de las células. El LISS se puede utilizar de dos maneras: suspendiendo los GR de prueba en LISS (1,5 - 2%) o agregando un volumen igual de la solución de LISS al suero y utilizando GR suspendidos en salino (3%). Las células suspendidas en LISS no se deben conservar más de 24 horas para ser usadas. (Calidad, 2007)

La interacción antígeno-anticuerpo depende de la densidad de antígeno, de la concentración del anticuerpo, pH, concentración iónica del medio de reacción y de la temperatura. Al reducir la concentración iónica del medio de reacción se incrementa la absorción de anticuerpos débiles por los antígenos de los hematíes. El uso de una solución salina iónica débil ayuda en la detección de anticuerpos débiles.

En Tubo: la lectura se puede realizar en tres fases permitiendo diferenciar la detección de anticuerpos que actúan a temperatura ambiente, a 37°C y con SAGH. Aglutinación en columna: la lectura se puede realizar en una fase permitiendo detectar los anticuerpos clínicamente significativos, pero no estableciendo el tipo y la temperatura a la cual son activos. (clinico, 2018)

Prueba en tubo

En el test en tubo la fuerza de rotura se aplica agitando el tubo. La desventaja de la aglutinación es el riesgo de disgregación de las reacciones débiles causando falsos negativos.

Para esta prueba es necesario rotular los tubos como: mayor, menor y autotestigo.

Como primer paso separamos el suero del paciente que será utilizado y en otro tubo tendremos la suspensión, para la prueba cruzada mayor se utiliza dos gotas de suero de la paciente 2 gotas para el autotestigo y plasma de la bolsa de sangre serán 2 gotas en la prueba cruzada menor, considerando que la suspensión de glóbulos rojos deben ser al 5%

A continuación para la prueba cruzada mayor vamos agregar 1 gota de células del donante más 2 gotas del suero del paciente.

Para la prueba cruzada menor vamos a agregar 2 gotas del suero del donante más 1 gota de células del paciente. (Calidad, 2007)

Para el tubo rotulado como autocontrol vamos a agregar una gota de células del paciente y dos gotas del suero del paciente, mezclamos cada tubo con movimiento suave y rotativo o con golpecitos suaves. Vamos a la centrifugación que se lleva a cabo 3,400RPM por 1 minuto.

Al retirar de la centrifuga observamos si hay una reacción de aglutinación o hemolisis, mezclamos los tubos y observamos frente a la luz y a la altura de los ojos, esto con el fin de evitar lecturas erróneas, además podemos observar despacio y con precisión por si tenemos alguna confusión podemos solicitar una segunda opinión e incluso repetir el resultado.

Para la aglutinación en tubo la lectura puede ser desde 4+ a 1+ o hemolisis, importante conocer y diferenciar una lectura de hemolisis a una reacción no reactiva. (clínico, 2018)

Fase albumina: se agrega 1 gota de albumina bovina al 22 o 36% a cada tubo, mezclamos y centrifugamos y resuspendemos a modo de encontrar hemolisis o aglutinación, la lectura siempre va a tener las mismas consideraciones del procedimiento anterior. Si no observamos ni aglutinación ni hemolisis procedemos a la siguiente fase:

Técnica de incubación: incubamos los 3 tubos a 37°C durante 15 o 60 minutos centrifugamos y suspendemos, para realizar la lectura será a la altura de los ojos y frente a la luz. (clínico, 2018)

Que se pretende con estos procedimientos y porque es tan importante leer una aglutinación??

Parte desde una buena técnica a realizar como profesionales y si el paciente puede ser o no transfundido, una lectura incorrecta puede llevar a reacciones post-transfusión agudas o graves al paciente y ocasionar la muerte.

Si hay presencia de aglutinación se dice esta positivo a la presencia de anticuerpos de importancia clínica no se procede a la transfusión. Es un resultado incompatible.

Si no aglutina se dice que no hay presencia de anticuerpos en el suero por lo tanto la sangre es aceptable para la donación de ese paciente en estudio. Es compatible.

Ahora analizando las dos técnicas tanto la técnica en tubo y técnica en tarjetas de gel y analizando fundamentos podemos analizar ventajas y desventajas, a partir de ello hacemos la comparación de estas técnicas, veamos

Técnica en gel

- necesita incubadoras especiales, su lectura es por aglutinación o hemolisis de igual forma que el tubo.
- Sus costos son mayores ya que necesita de centrifugas especiales
- Se obtiene una mejor comprensión en la lectura ya que la separación de hematíe se da por su tamaño
- Se pueden realizar varias pruebas cruzadas para cada paciente, con el fin de agilizar el trabajo.
- Se trabaja con una metodología más avanzada y actualizada en el área de banco de sangre.

Técnica en tubo.

- Sus costos son menores, por lo cual como profesionales del área no existe un reporte que no se pueda realizar.
- Habilidad para interpretar resultados.
- Identificación de muestras hemolizadas.
- Técnica tradicional y minuciosa.
- Existe riesgo de quebraduras en el material sino se centrifuga adecuadamente.
- Interferencias en el lavado del material.
- Puede haber interferencia en la lectura.
- Errores al momento de centrifugar e incubar

Conclusión

No existe metodología 100% Sensible y 100% específica tanto para la determinación de antígenos eritrocitarios como para la investigación de anticuerpos irregulares. Debido a las diferencias de desempeño entre metodologías, es recomendable utilizar la misma metodología para el estudio y la identificación de anticuerpos. La elección del método o métodos a utilizar va a depender de: Tipo de muestras a trabajar (donantes, pacientes, gestantes), Sensibilidad a anticuerpos de significado clínico, Numero de muestras a estudiar (automatización), disponibilidad de células con los antígenos más representativos de la población específica. Es conveniente tener implementada más de una metodología en el laboratorio para obtener una investigación más completa. Las pruebas cruzadas y la búsqueda de anticuerpos son de suma importancia, ya que permiten que los antígenos y anticuerpos puedan ser detectados y estudiados en el laboratorio; ayudan a prevenir la transfusión de sangre incompatible y proveen al paciente el máximo de seguridad y beneficio. Aunque a primera vista pareciera que se trata de un tema muy conocido para quien realiza las pruebas, es importante que se tomen en cuenta los pasos y procedimientos por realizar, con énfasis en el control de calidad. En las pruebas cruzadas incompatibles es crucial el cuidado en todo el estudio del paciente, el protocolo a seguir y la correcta interpretación de los resultados; no debe perderse de vista que en las técnicas básicas existen muchas limitaciones, por ello sensible. Combinan varias metodologías para tener un amplio panorama de detección de acuerdo al rango térmico de acción de cada anticuerpo, así como el medio en el cual se pueden potenciar o destruir, principalmente cuando existe mezcla de los mismos.

En prueba mayor: se utilizan dos gotas de suero del receptor más una gota de eritrocitos lavados del donador mientras que en la prueba menor son dos gotas de suero o plasma del donador más una gota de eritrocitos del receptor y en el Autotestigo: una gota de eritrocitos del receptor más dos gotas de suero del receptor. (clinico, 2018)

La técnica en tarjeta de gel: Es una microtécnica utilizada en inmunohematología para investigar e identificar antígenos y anticuerpos antieritrocitarios. Se basa en la separación por tamaño de los eritrocitos aglutinados durante un proceso de centrifugación en un gel poroso.

Por lo tanto depende del profesional en laboratorio realizar la prueba cruzada con eficiencia en sus métodos y técnicas de la prueba cruzada, el profesional en laboratorio es quien va a considerar el reporte final para la pronta recuperación y transfusión del paciente-

Referencias Bibliográficas

- ✓ Roback JD, editor. AABB Technical Manual, 17th ed., Bethesda, Maryland, 2011.
- ✓ American Association of Blood Banks. AABB Standards for Blood Bank and
- ✓ Transfusion Services, 25th ed., Bethesda, Maryland, 2008
- ✓ Guidelines for the blood transfusion services in the United Kingdom, 7th edition 2005.
- ✓ Guidelines for pre-transfusion compatibility procedures in blood transfusion laboratories. Transfusion Medicine 23, 3-35, 2013.
- ✓ Orientaciones para Centros de Sangre y Unidades de Medicina Transfusional, Ministerio de Salud de Chile, 2007.
- ✓ Resolución Exenta N° 1026 del Ministerio de Salud de Chile, que aprueba la Guía Técnica: Orientaciones sobre las Unidades de Medicina Transfusional, 2013.
- ✓ Bonilla ZR. Importancia de las pruebas cruzadas y de la búsqueda de anticuerpos. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2006;44(Suppl: 2):43-46.
- ✓ <https://intranet.promedanips.co/wp-content/uploads/2020/04/PR-04-023-LAB-Pruebas-cruzadas.pdf>
- ✓ Arrunátegui AM, Ramón DS, Viola LM, Olsen LG, Jaramillo A. Technical and clinical aspects of the histocompatibility crossmatch assay in solid organ transplantation. Biomedica. 2022 Jun 1;42(2):391-413. English, Spanish. doi: 10.7705/biomedica.6255.