



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
2021 - Año de Homenaje al Premio Nobel de Medicina Dr. César Milstein

Disposición

Número:

Referencia: EX-2020-77502066-APN-DGA#ANMAT

VISTO el expediente N° EX-2020-77502066-APN-DGA#ANMAT del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por los presentes actuados la firma HEMOMEDICA S.R.L. solicita autorización para la venta a laboratorios de análisis clínicos de los Productos Médicos para diagnóstico de uso “in vitro” denominados 1) Gamma ELU KIT II. 2) Gamma EGA Kit. 3) Gamma Quin. 4) W.A.R.M. el mencionado expediente consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico que establece que el producto reúne las condiciones de aptitud requeridas para su autorización.

Que el Instituto Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia.

Que se ha dado cumplimiento a los términos que establece la Ley N° 16.463, Resolución Ministerial N° 145/98 y Disposición ANMAT N° 2674/99.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por el Decreto N° 1490/92 y sus modificatorios.

Por ello;

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE
MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA

D I S P O N E:

ARTÍCULO 1°.- Autorízase la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología

Médica (RPPTM) de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) de los productos médicos para diagnóstico de uso in vitro denominados 1) Gamma ELU KIT II. 2) Gamma EGA Kit. 3) Gamma Quin. 4) W.A.R.M., con los Datos Característicos que figuran al pie de la presente, de acuerdo con lo solicitado por la firma HEMOMEDICA S.R.L.

ARTICULO 2º.- Autorícese los textos de los proyectos de rótulos y Manual de Instrucciones que obran en el documento GEDO N° IF-2021-111709945-APN-INPM#ANMAT.

ARTÍCULO 3º.- En los rótulos e instrucciones de uso autorizados deberá figurar la leyenda “Autorizado por la ANMAT PM N° 1049-75”, con exclusión de toda otra leyenda no contemplada en la normativa vigente.

ARTICULO 4º. - Extiéndase el Certificado de Autorización e Inscripción en el RPPTM con los datos característicos mencionados en esta disposición.

ARTÍCULO 5º.- Regístrese. Inscríbase en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica al nuevo producto. Por el Departamento de Mesa de Entrada, notifíquese al interesado, haciéndole entrega de la presente Disposición, conjuntamente con rótulos e instrucciones de uso autorizados y el Certificado mencionado en el artículo 4º. Gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a los fines de confeccionar el legajo correspondiente. Cumplido, archívese. -

DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERISTICOS

LABORATORIO: HEMOMEDICA S.R.L.

NOMBRE COMERCIAL: 1) Gamma ELU KIT II. 2) Gamma EGA Kit. 3) Gamma Quin. 4) W.A.R.M.

INDICACIÓN DE USO: 1) Está diseñado para una elución ácida rápida de anticuerpos unidos a hematíes a partir de hematíes intactos. 2) Está indicado para su uso en la disociación de IgG de los hematíes de tal forma que los hematíes tratados se pueden clasificar también en función del tipo de antígeno o ser usados para pruebas serológicas. 3) Está diseñado para la disociación de inmunoglobulinas unidas a hematíes. 4) Se utiliza para separar autoanticuerpos calientes de los hematíes para facilitar la interpretación de complejidad serológica.

FORMA DE PRESENTACIÓN: 1) Gamma ELU-KIT II consta de tres soluciones, en volúmenes suficientes para al menos diez eluidos usando el procedimiento detallado en el prospecto de instrucciones (1 kit compuesto por tres viales). • Solución de lavado concentrada (1vial por 50ml): Solución tamponada concentrada que debe diluirse en una proporción 1 a 10 con agua de calidad de reactivo de laboratorio para preparar la solución de lavado de trabajo. Contiene azida sódica al 0,1% como conservante. • Solución de elución (1 vial por 11ml): Un tampón de glicina de pH bajo. • Solución tampón (1 vial por 12ml): Una solución de TRIS (hidroximetil)-aminometano que contiene albúmina bovina. Contiene azida sódica al 0,1 % como conservante. Se añade un indicador de color azul para ayudar a ajustar el eluido al pH correcto para la prueba. 2) Gamma EGA consta de tres soluciones, con volúmenes suficientes para al menos veinte procedimientos de disociación de anticuerpos (1 kit compuesto por tres viales). • Solución EGA 1 (1 vial por 4ml): Una solución concentrada de EDTA sódica. Contiene azida sódica al 0,1 % como conservante. • Solución EGA 2 (1 vial por 10ml): Una solución de glicina con un pH bajo. Esta solución no contiene conservantes. • Solución EGA 3 (1vial por 4ml): Una solución de TRIS (hidroximetil)-aminometano. Contiene azida sódica al 0,1 % como conservante. 3) Gamma-Quin (1 vial por 10ml) es una solución a aproximadamente el 16 % de difosfato de cloroquina en una solución salina

tamponada con fosfato con un pH de $5,0 \pm 0,1$. No se han añadido conservantes. 4) W.A.R.M (1 vial con material liofilizado) es una preparación formulada especialmente de ditiotreitol y papaína activada con cisteína en tampón de fosfato. El producto se ha filtrado y liofilizado. Este producto se debe reconstituir con agua desionizada.

PERIODO DE VIDA ÚTIL Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 1) Gamma ELU KIT II: 2 años, conservar a 15°C a 30°C. 2) Gamma EGA Kit: 2 años, conservar a 15°C a 30°C. 3) Gamma Quin: 2 años, conservar 1°C a 10°C. 4) W.A.R.M: 2 años, conservar 1°C a 10°C.

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL FABRICANTE: 1), 2), 3) y 4) Immucor, Inc. 3130 Gateway Drive Norcross, GA 30071, Estados Unidos.

EXPEDIENTE N° EX-2020-77502066-APN-DGA#ANMAT

Fd

rl

Digitally signed by GARAY Valeria Teresa
Date: 2021.12.15 22:55:55 ART
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Date: 2021.12.15 22:56:11 -03:00



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
2021 - Año de Homenaje al Premio Nobel de Medicina Dr. César Milstein

Certificado - Redacción libre

Número:

Referencia: EX-2020-77502066-APN-DGA#ANMAT

CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN E INSCRIPCIÓN

PRODUCTOS PARA DIAGNÓSTICO DE USO IN VITRO

Expediente N° EX-2020-77502066-APN-DGA#ANMAT

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) certifica que de acuerdo con lo solicitado por la firma HEMOMEDICA S.R.L. se autoriza la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM), de nuevos productos médicos para diagnóstico de uso in vitro con los siguientes datos:

NOMBRE COMERCIAL: 1) Gamma ELU KIT II. 2) Gamma EGA Kit. 3) Gamma Quin. 4) W.A.R.M.

INDICACIÓN DE USO: 1) Está diseñado para una elución ácida rápida de anticuerpos unidos a hematíes a partir de hematíes intactos. 2) Está indicado para su uso en la disociación de IgG de los hematíes de tal forma que los hematíes tratados se pueden clasificar también en función del tipo de antígeno o ser usados para pruebas serológicas. 3) Está diseñado para la disociación de inmunoglobulinas unidas a hematíes. 4) Se utiliza para separar autoanticuerpos calientes de los hematíes para facilitar la interpretación de complejidad serológica.

FORMA DE PRESENTACIÓN: 1) Gamma ELU-KIT II consta de tres soluciones, en volúmenes suficientes para al menos diez eluidos usando el procedimiento detallado en el prospecto de instrucciones (1 kit compuesto por tres viales). • Solución de lavado concentrada (1 vial por 50ml): Solución tamponada concentrada que debe diluirse en una proporción 1 a 10 con agua de calidad de reactivo de laboratorio para preparar la solución de lavado de trabajo. Contiene azida sódica al 0,1% como conservante. • Solución de elución (1 vial por 11ml): Un tampón de glicina de pH bajo. • Solución tampón (1 vial por 12ml): Una solución de TRIS (hidroximetil)-aminometano que contiene albúmina bovina. Contiene azida sódica al 0,1 % como conservante. Se añade un indicador de color azul para ayudar a ajustar el eluido al pH correcto para la prueba. 2) Gamma EGA consta de tres soluciones, con volúmenes suficientes para al menos veinte procedimientos de disociación de anticuerpos (1 kit compuesto por tres viales). • Solución EGA 1 (1 vial por 4ml): Una solución concentrada de EDTA sódica. Contiene azida sódica al 0,1 % como conservante. • Solución EGA 2 (1 vial por 10ml): Una solución de glicina

con un pH bajo. Esta solución no contiene conservantes. • Solución EGA 3 (1 vial por 4ml): Una solución de TRIS (hidroximetil)- aminometano. Contiene azida sódica al 0,1 % como conservante. 3) Gamma-Quin (1 vial por 10ml) es una solución a aproximadamente el 16 % de difosfato de cloroquina en una solución salina tamponada con fosfato con un pH de $5,0 \pm 0,1$. No se han añadido conservantes. 4) W.A.R.M (1 vial con material liofilizado) es una preparación formulada especialmente de ditiotreitól y papaína activada con cisteína en tampón de fosfato. El producto se ha filtrado y liofilizado. Este producto se debe reconstituir con agua desionizada.

PERIODO DE VIDA ÚTIL Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 1) Gamma ELU KIT II: 2 años, conservar a 15°C a 30°C. 2) Gamma EGA Kit: 2 años, conservar a 15°C a 30°C. 3) Gamma Quin: 2 años, conservar 1°C a 10°C. 4) W.A.R.M: 2 años, conservar 1°C a 10°C.

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL FABRICANTE: 1), 2), 3) y 4) Immucor, Inc. 3130 Gateway Drive Norcross, GA 30071, Estados Unidos.

Se extiende el presente Certificado de Autorización e Inscripción del PRODUCTO PARA DIAGNOSTICO USO IN VITRO PM N° 1049-75 . -----

Expediente N° EX-2020-77502066-APN-DGA#ANMAT



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
2021 - Año de Homenaje al Premio Nobel de Medicina Dr. César Milstein

Documentación varia

Número:

Referencia: Rótulos y manuales

Se adjuntan rótulos y manuales solicitados a la empresa, como archivos embebidos.

Digitally signed by Gestion Documental Electronica
Date: 2021.11.17 13:14:13 -03:00

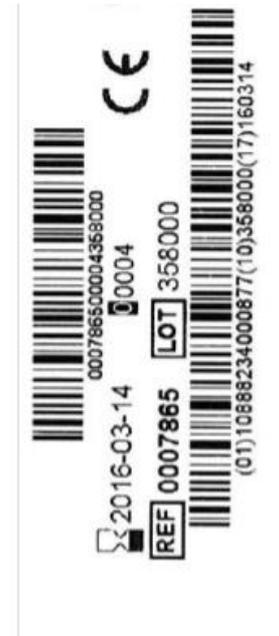
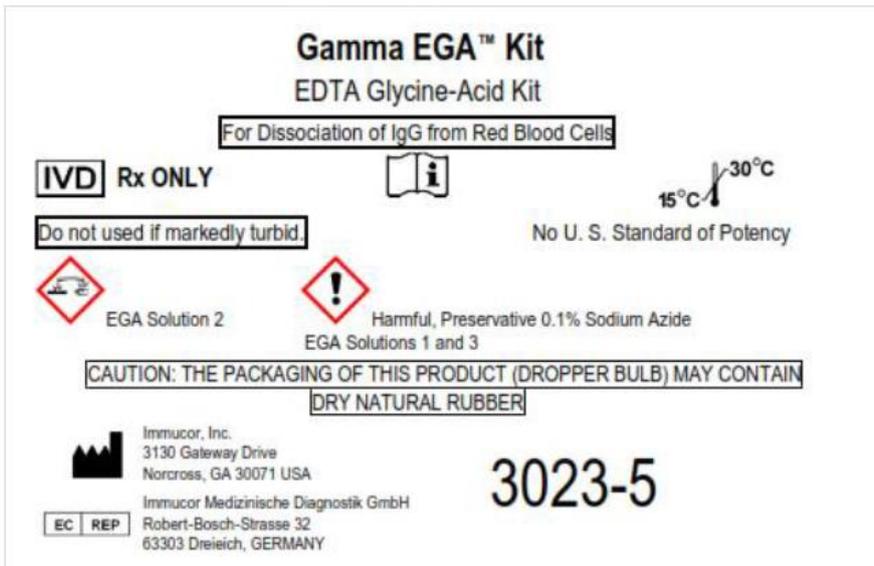
Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Date: 2021.11.17 13:14:15 -03:00

Rótulos Originales

Rótulo interno



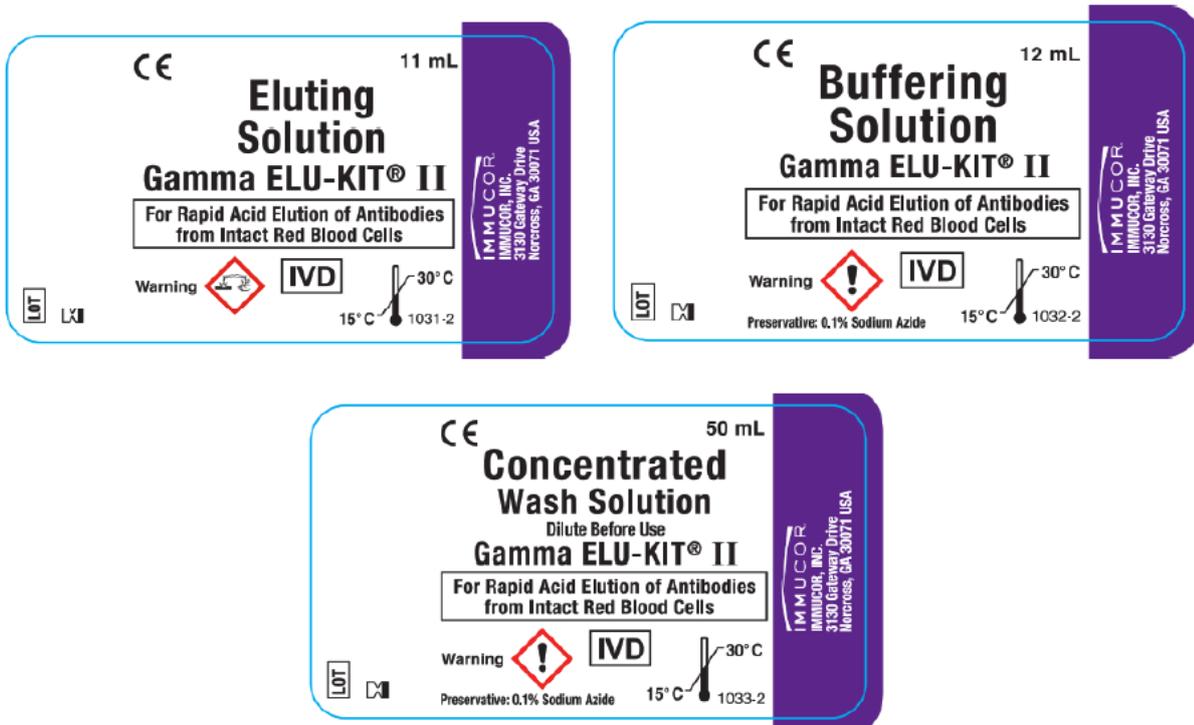
Rótulo externo



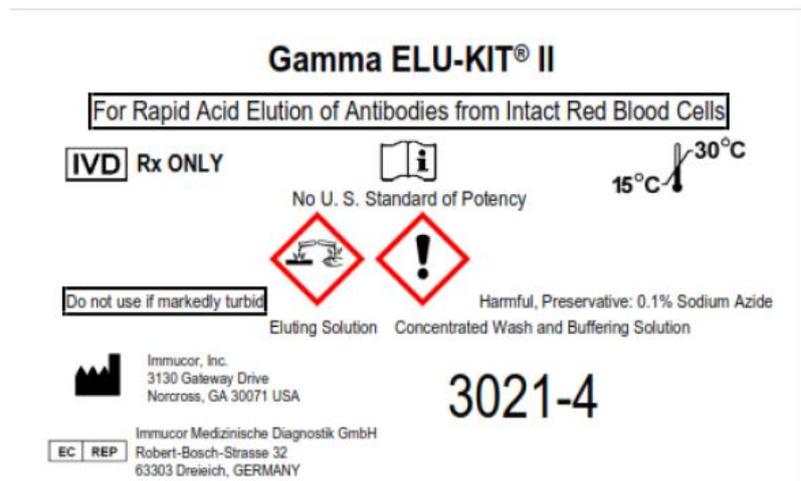
Paula Zucchini
Farmaceutica
M.N. 12.855

HEMO MEDICA S.R.L.
DISTRIB. A. REINOC

Rótulo interno



Rótulo externo



Paula Zucchini
 Farmacêutica
 M.N. 12.855

HEMOMEDICA S.R.L.
 CRISTINA A. REINOSO

Rótulo interno

CE 10 mL

Gamma-Quin®
Chloroquine Diphosphate
Solution

For Removal of Red
Cell-Bound Immunoglobulin

IVD 1041-3

1°C 10°C

IMMUCOR, INC.
3130 Gateway Drive
Norcross, GA 30071 USA

123124164560107902
2016-05-03
LOT 123456

Rótulo externo

**IMMUCOR
GAMMA**

00078900004456321
(01) 10888234000891
(10) 456321 (17) 160315

REF 0007890
LOT 456321
2016-03-15

0004
740.241 Rev 4

CE

Gamma-Quin®
Chloroquine Diphosphate Solution

For Removal of Red Cell-Bound Immunoglobulin

IVD No U. S. Standard of Potency

Do not use if turbid or discolored. CAUTION: THE PACKAGING OF THIS PRODUCT (DROPPER BULB) MAY CONTAIN DRY NATURAL RUBBER.

Immucoor, Inc.
3130 Gateway Drive
Norcross, GA 30071 USA

3027-3

Immucoor Medizinische Diagnostik GmbH
Adam-Opel-Strasse 26 A
63322 Rödelheim, GERMANY

Paula Zucchini
Farmacéutica
M.N. 12.855

HEMOMEDICA S.R.L.
GIUSTO A. REINGO

Rótulo interno

WM123
2016-05-03
LOT

Recon. Exp.

CE

W.A.R.M.™ 5 mL

Warm Autoantibody Removal Medium

IVD

1°C 10°C

099-5

IMMUCOR.
IMMUCOR, INC.
3130 Gateway Drive
Norcross, GA 30071 USA

Rótulo externo

740 244-6

00573190004WM0000

CE

Qty 10

2016-03-14

REF 0057319

LOT WM0000

(01)08882340010106(10)WM0000(17)160314

W.A.R.M.™
Warm Autoantibody Removal Medium

- IVD
- 1°C 10°C
- No US standard of potency
- Discard if markedly turbid

Rx ONLY

347-10

Immucor, Inc.
3130 Gateway Drive
Norcross, GA 30071 USA

Immucor Medizinische Diagnostik GmbH
Robert-Bosch-Strasse 32
63303 Dreieich, GERMANY

EC REP

Paula Zucchini
Farmaceutica
M.N. 12.855

HEMOMEDICA S.R.L.
RISTORANTE S. RENZO

Sobre r tulo

HemoMedica

Importado por:

HEMOMEDICA S.R.L.

California 2082, Piso 2, Of D217, Ciudad Autónoma de Buenos Aires
Argentina

Autorizado por ANMAT PM 1049-75

Directora Técnica Ana Paula Zucchini.

Farmac utica M.N. 12.855



HEMOMEDICA S.R.L.
FARMAC UTICA



Paula Zucchini
Farmac utica
M.N. 12.855

Gamma EGA™ Kit

EDTA Glycine-Acid Kit

For Dissociation of IgG from Red Blood Cells

IVD Rx ONLY

Do not use if markedly turbid.



EGA Solution 2



Harmful, Preservative 0.1% Sodium Azide
EGA Solutions 1 and 3

15°C - 30°C

No U. S. Standard of Potency

CAUTION: THE PACKAGING OF THIS PRODUCT (DROPPER BULB) MAY CONTAIN DRY NATURAL RUBBER

Immucor, Inc.
3130 Gateway Drive
Norcross, GA 30071 USA

Immucor Medizinische Diagnostik GmbH
Robert-Bosch-Strasse 32
63303 Dreieich, GERMANY

EC REP

3023es-5

For Dissociation of IgG from Red Blood Cells

Para la disociación de IgG de los hematíes

USO PREVISTO: El juego Gamma EGA está indicado para su uso en la disociación de IgG de los hematíes de tal forma que los hematíes tratados se pueden clasificar también en función del tipo de antígeno o usados para pruebas serológicas.

RESUMEN DEL ENSAYO: Se puede esperar que los hematíes revestidos de inmunoglobulina, como en la anemia hemolítica autoinmune o en la enfermedad hemolítica del neonato, presenten una prueba de antiglobulina directa positiva. Por consiguiente, no se les puede realizar la prueba de antígenos de superficie por medio de la prueba de antiglobulina indirecta ni con reactivos que contengan potenciadores de aglutinación si su revestimiento de IgG es suficiente para causar aglutinación espontánea bajo dichas condiciones. La capacidad de disociar inmunoglobulina de los hematíes sin dañar la reactividad de los antígenos de superficie es de un gran valor al permitir la clasificación de los hematíes como una ayuda en el reconocimiento e identificación de uno o más aloanticuerpos que coexisten con autoanticuerpos calientes en el suero de un paciente[1,2,3].

PRINCIPIO DEL ENSAYO: En primer lugar, los hematíes revestidos de IgG se lavan bien y, posteriormente, se suspenden brevemente en una solución ácida de glicina/EDTA para disociar el anticuerpo unido. La mezcla se introduce de forma inmediata en un pH neutro con un tampón TRIS; los hematíes se separan mediante centrifugación y se lavan más con tres cambios de solución salina. Si la prueba de antiglobulina directa resulta negativa, los hematíes lavados están preparados para realizar la prueba de sus antígenos de superficie empleando la prueba de antiglobulina (o con un reactivo que contenga potenciadores). El tratamiento inactiva los antígenos del sistema del grupo sanguíneo Kell[4], así como Er^a[5], Bg[6], y posiblemente otros. Este reactivo no desnaturaliza los antígenos sensibles a enzimas, como aquellos de los sistemas MNSs y Duffy. Se ha informado que el método ácido-glicina/EDTA es el procedimiento de elección para la clasificación de hematíes revestidos de aloanticuerpos o autoanticuerpos IgG reactivos en caliente[7].

REACTIVO: El juego Gamma EGA consta de tres soluciones, con volúmenes suficientes para al menos veinte procedimientos de disociación de anticuerpos.

- **Solución EGA 1:** Una solución concentrada de EDTA sódica. Contiene azida sódica al 0,1 % como conservante.
- **Solución EGA 2:** Una solución de glicina con un pH bajo. Esta solución no contiene conservantes.
- **Solución EGA 3:** Una solución de TRIS (hidroximetil)-aminometano. Contiene azida sódica al 0,1 % como conservante.

PRECAUCIONES:

Para uso diagnóstico in vitro. Guárdelo a temperatura ambiente (de 15 a 30 °C) cuando no la emplee. Estas soluciones son estables en un entorno refrigerado, aunque la refrigeración puede provocar que la solución EGA 1 se cristalice. En caso de que esto ocurra, los cristales volverán a disolverse a temperatura ambiente, momento a partir del cual la solución debe mezclarse bien antes de su uso. Debe procurarse minimizar la contaminación durante el uso.

Clave:

Subrayado = Adición o cambio significativo ▲ = Eliminación de texto

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

Gamma EGA™ Kit

EDTA Glycine-Acid Kit

For Dissociation of IgG from Red Blood Cells

IMMUCOR

Do not use if markedly turbid. No debe utilizarse si presenta turbidez evidente. No lo congele. No la utilice después de la fecha de caducidad.

Para las soluciones 1 y 3 del juego Gamma EGA:



Este reactivo contiene azida sódica al 0,1 %. Advertencia: H302 Nocivo en caso de ingestión.

Para la solución 2 del juego Gamma EGA:



Este reactivo es una solución con un pH bajo. Advertencia: H314 Provoca daños oculares y quemaduras cutáneas graves. H318 Provoca daños oculares graves.

Advertencia: La azida sódica puede reaccionar con el cobre y el plomo de las tuberías para formar azidas metálicas muy explosivas. Si se desecha por el desagüe, debe añadirse un gran volumen de agua para evitar la acumulación de azidas.

Las soluciones de los componentes se pueden intercambiar entre lotes, siempre y cuando no estén caducados.

CAUTION: The packaging of this product (dropper bulb) may contain dry natural rubber.

PRECAUCIÓN: El envase de este producto (ampolla cuentagotas) puede contener caucho natural seco.

El formato de la fecha de caducidad se expresa como AAAA-MM-DD (año-mes-día).

EXTRACCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS: No se requiere una preparación especial del paciente con anterioridad a la recogida de muestras. La sangre se debe extraer mediante una técnica aséptica y debe realizarse la prueba mientras todavía está fresca. En caso de que se produzca un retraso en la prueba, la muestra debe guardarse a una temperatura de 1 a 10 °C, preferiblemente un tiempo no superior a 72 horas. Los hematíes procedentes de muestras guardadas durante más de 72 horas pueden mostrar un incremento en la hemólisis al ser tratados según el procedimiento recomendado.

Es preferible un muestra anticoagulada de personas cuyos hematíes estén revestidos in vivo debido al volumen de hematíes requeridos para este procedimiento. EDTA es el anticoagulante de elección. Asimismo, es adecuada una muestra desfibrinada.

PROCEDIMIENTO:

Materiales suministrados: Gamma EGA Kit

HEMOMEDICA S.R.I
PAULA ZUCCHINI
Directora Técnica
• T.N. 12 855

Otros materiales necesarios: Tubos de ensayo, pipetas, solución salina isotónica o solución salina isotónica tamponada con fosfato (aproximadamente 15 mM) con un pH 6,5-7,5, temporizador y centrifuga.

MÉTODO DEL ENSAYO:

NOTA: El procedimiento de tratamiento aquí descrito es, asimismo, de aplicación para clasificar hematíes sin revestimiento de IgG con el objetivo de destruir la reactividad del antígeno del sistema Kell como una ayuda para la identificación de anticuerpos. En tal caso, no es necesario el paso 9 del siguiente procedimiento.

1. Lave los hematíes revestidos tres veces en una solución salina y vuelva a suspenderlos a una concentración del 3-5 %.
2. Coloque 30 gotas de la suspensión de hematíes lavados en un tubo de ensayo limpio.
3. Centrifugue para sedimentar los hematíes de la manera más completa posible y retire con cuidado el sobrenadante sin alterar los hematíes. Como guía, un minuto a 3400 rpm (rcf 900-1000) debería agrupar suficientemente los hematíes.
4. En un tubo de ensayo separado, prepare la solución ácida de glicina/EDTA añadiendo 4 gotas de solución EGA 1 a 16 gotas de solución EGA 2.
5. Añada de forma inmediata la solución ácida de glicina/EDTA recién preparada a los hematíes lavados y sedimentados y mézclelo suavemente.
6. Inicie el cronómetro y deje a la mezcla a temperatura ambiente (23 ± 3 °C) durante no más de dos minutos. Si los hematíes adquieren un marcado color canela o aparecen agrupados tras esta exposición, puede que sea necesario acortar el tiempo de tratamiento (en incrementos de 15 segundos) hasta que se alcance un nivel de tratamiento que no provoque el marcado color canela o la agrupación de los hematíes.
7. Añada de forma inmediata 4 gotas de solución EGA 3; mézclelo bien y centrifugue durante 30 segundos a 3400 rpm (rcf 900-1000).
8. Retírelo y deshágase del sobrenadante; posteriormente vuelva a suspender los hematíes tratados en solución salina. Si, en este punto, los hematíes tratados no presentan un marcado color canela o aparecen agrupados (véase paso 6), proceda a lavar los hematíes con al menos tres cambios de solución salina.
NOTA: Aunque el sobrenadante eliminado de los hematíes tratados puede contener anticuerpos eluidos, este se disuelve de forma sustancial. Por consiguiente, no se recomienda que se trate como un eluido (esto es, usado para determinar la especificidad del anticuerpo que reviste los hematíes).
9. Realice la prueba de antiglobulina directa en los hematíes tratados y lavados. En caso de que fuera negativa, proceda a realizar la prueba a los hematíes para los antígenos que desee mediante el procedimiento de antiglobulina indirecta, siguiendo las indicaciones del fabricante del reactivo. **NOTA:** El tratamiento EGA hace que los hematíes muestren una tendencia creciente a hemolizarse tras permanecer en posición vertical. Por consiguiente, si existe un retraso entre el lavado de los hematíes y la prueba de estado del antígeno, puede que sea necesario un mayor lavado antes de su uso.

Si la prueba de antiglobulina directa de los hematíes tratados es todavía positiva tras un tratamiento, se puede repetir el procedimiento de tratamiento, aunque no más de una vez. Debe tenerse en cuenta que una mayor exposición a condiciones ácidas puede provocar un daño permanente irreversible a la membrana de los hematíes.

CONTROL DE CALIDAD:

Como prueba de que el tratamiento no destruye los antígenos que se van a examinar en los hematíes tratados, se recomienda que se traten hematíes apropiados conocidos por ser positivos para el antígeno en paralelo con hematíes revestidos con IgG y examinados con los reactivos adecuados para control positivo. Este control puede omitirse si el laboratorio ha confirmado previamente que los antígenos relevantes no se han destruido con el tratamiento.

Además, se recomienda realizar una prueba de antiglobulina indirecta con un reactivo control inerte, como albúmina bovina al 6 %, como confirmación de que el revestimiento de inmunoglobulina se ha eliminado con éxito de los hematíes.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO: Si la prueba de antiglobulina directa es negativa en los hematíes tras el tratamiento, se puede realizar la prueba a los hematíes para ver el estado del antígeno (para otros antígenos que se sabe que no han resultado destruidos por el tratamiento) mediante el procedimiento de antiglobulina indirecta.

LIMITACIONES: Los factores que pueden dar lugar a resultados erróneos incluyen los siguientes:

1. El tratamiento de los hematíes debe limitarse a las veces recomendadas en el prospecto del envase. La incubación prolongada de los hematíes en el medio

Clave:

Subrayado = Adición o cambio significativo ▲ = Eliminación de texto

ácido de glicina/EDTA altera la membrana de los hematíes de forma irreversible. Los signos visibles de un tratamiento en exceso pueden ser el desarrollo de una coloración marrón canela y el agrupamiento.

2. El tratamiento de hematíes mediante este procedimiento hace que los hematíes sean incapaces de ser clasificados para antígenos del sistema Kell. Esta característica se puede emplear para aprovecharse de una situación donde la muestra que está siendo investigada contenga una mezcla de anticuerpos de los que se sospecha que incluyen una especificidad que pertenece al sistema Kell. En tales casos, se pueden tratar los hematíes sin revestimiento clasificados para otros antígenos para su uso en procedimientos de identificación de anticuerpos.
3. Se ha informado, asimismo, de que el antígeno del grupo sanguíneo Er^a y Bg se considera inactivo mediante el tratamiento. Otros antígenos pueden aparecer dañados de forma similar. Los únicos antígenos que se ha demostrado que no se desnaturalizan y destruyen mediante el tratamiento son; M, N, S, s, D, C, E, c, e, Fy^a, Fy^b, Jk^a y Jk^b.
4. El procedimiento de tratamiento puede que no tenga éxito en la eliminación completa del IgG de hematíes revestidos en todos los casos. Algunas veces, la fuerza de la prueba de antiglobulina directa (PAD) solo puede reducirse, aunque lo suficiente como para hacer posible una interpretación fiable de la prueba de antiglobulina indirecta. En otros casos, la fuerza de la reacción PAD no se puede reducir de forma perceptible. En dos informes publicados, los hematíes tratados una o dos veces con soluciones similares a aquellas que componen el juego EGA no pudieron usarse para realizar fenotipados en el 15 % [1] y en el 18 % [2] de los casos, respectivamente.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE RENDIMIENTO: Las soluciones que componen el juego Gamma EGA se han examinado mediante el procedimiento que se detalla en el prospecto de instrucciones y se ha descubierto que disocian el IgG de los hematíes revestidos. La disociación es suficiente en la mayoría de los casos para permitir realizar la prueba a los hematíes tratados en busca de antígenos de superficie (excepto aquellos destruidos por el tratamiento) usando la prueba de antiglobulina indirecta. Asimismo, se ha demostrado que los hematíes no revestidos pierden los antígenos del sistema Kell K y k como consecuencia del tratamiento. El rendimiento de este producto va ligado al cumplimiento de los métodos recomendados en este prospecto.

Para obtener más información o para ponerse en contacto con el servicio técnico, llame a Immucor al número 855-IMMUCOR (466-8267).

BIBLIOGRAFÍA:

1. Louie JE, Jiang AF, Zaroulis CG. Preparation of intact antibody-free red blood cells in autoimmune hemolytic anemia. *Transfusion* 1986; 26:550 [abstract].
2. Kosanke J, McDowell MA, Stocker I. Treatment of DAT positive red cells with EDTA-glycine acid for antigen typing. *Transfusion* 1989; 29:57S [abstract].
3. Pallas C, Wiler M, McGee B. Comparison of glycine acid-EDTA to chloroquine diphosphate for IgG removal. *Transfusion* 1991; 31: 27S [abstract].
4. Julleis J, Sapp C, Kakaiya R. Glycine-EDTA as a substitute for AET in the inactivation of Kell System antigens on red blood cells. *Transfusion* 1992; 32:14S [abstract].
5. Liew YW, Uchikawa M. Loss of Er^a antigen in very low pH buffers. *Transfusion* 1987; 23:442-443 [Cartas al editor].
6. Champagne K, Spruell P, Chen J, Voll L, Schlanser G. EDTA glycine-acid vs chloroquine diphosphate treatment for stripping Bg antigens from red blood cells. *Transfusion* 1996; 36:21S [abstract].
7. Burin des Rozières N, Squalli S. Removing IgG antibodies from intact red cells: comparison of acid and EDTA, heat and chloroquine elution methods. *Transfusion* 1997; 37:497-501.

CE

Código del prospecto: IC3023es-5

Revisado: 03/17

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

HEMOMEDICA S.R.L.
PAULA ZUCCHINI
Directora Técnica
• T.N. 12 855

Gamma-Quin®
Chloroquine Diphosphate Solution

For Removal of Red Cell-Bound Immunoglobulin

IVD Rx ONLY



10°C

No U.S. Standard of Potency

Do not use if turbid or discolored.

CAUTION: THE PACKAGING OF THIS PRODUCT (DROPPER BULB) MAY CONTAIN DRY NATURAL RUBBER.



Immucor, Inc.
3130 Gateway Drive
Norcross, GA 30071 USA

3027es-4

EC REP

Immucor Medizinische Diagnostik GmbH
Robert-Bosch-Strasse 32
63303 Dreieich, GERMANY

USO PREVISTO:

For Removal of Red Cell-Bound Immunoglobulin

Disociación de inmunoglobulinas unidas a hematíes

Gamma-Quin está diseñada para la disociación de inmunoglobulinas unidas a hematíes.

RESUMEN DEL ENSAYO: Las dificultades a la hora de realizar estudios de antígenos en los hematíes que tienen una prueba de antiglobulina directa positiva pueden ser un obstáculo para la investigación minuciosa de algunos problemas serológicos. Cuando la proteína que recubre los hematíes es IgG, resulta imposible la tipificación con reactivos empleando el procedimiento de antiglobulina indirecta y solo pueden llevarse a cabo pruebas para otros antígenos si se dispone de reactivos en solución salina (fabricados a partir de IgM o IgG modificado químicamente) o reactivos de determinación del grupo sanguíneo monoclonales.

En 1964, Domokos y Aszódi estudiaron el efecto de la cloroquina en las reacciones de antígeno-anticuerpo de los hematíes [1] y su influencia in vivo en la reacción antígeno-anticuerpo Rh(D) [2]. La cloroquina es un derivado de la quinolina comúnmente utilizado como un agente antimalaria, que también se ha utilizado empíricamente en el tratamiento de varias enfermedades inmunes. En 1976, Mantel y Holtz estudiaron el uso del difosfato de cloroquina como agente in vitro para disociar los autoanticuerpos de los hematíes de pacientes con anemia hemolítica autoinmune y fueron capaces de obtener eluidos reactivos mediante este procedimiento [3]. En la mayoría de casos de anemia hemolítica autoinmune, los autoanticuerpos se pudieron dividir completamente de los hematíes por incubación con una solución de difosfato cloroquina y proporcionaron un resultado negativo de la prueba de antiglobulina directa después del tratamiento. En pacientes con anemia hemolítica autoinmune sintomática, se obtuvieron eluidos fuertemente reactivos tras la incubación con cloroquina, aunque la prueba de antiglobulina directa permaneció positiva la mayoría de las veces, como lo hizo en los casos de dos donantes de sangre aparentemente sanos con hematíes revestidos de autoanticuerpos y en dos pacientes con enfermedades no relacionadas con la hemólisis. Edwards, Moulds y Judd aplicaron el procedimiento de la cloroquina como un medio para disociar suficiente anticuerpo de los hematíes recubiertos de inmunoglobulina como para permitir a los hematíes tratados que se examinaran con reactivos de determinación del grupo sanguíneo mediante la prueba de antiglobulina indirecta [4]. Aunque la cloroquina no puede disociar los autoanticuerpos totalmente de los hematíes positivos para la prueba de antiglobulina directa en todos los casos, puede que sea suficiente incluso una disociación parcial para permitir que se estudie el estado de los antígenos de grupos sanguíneos de los hematíes o para que se empleen con éxito en la autoadsorción de los autoanticuerpos calientes.

PRINCIPIO DEL ENSAYO: Los hematíes que obtienen una prueba de antiglobulina directa positiva se incuban en una solución isosmótica de difosfato de cloroquina durante un tiempo límite de dos horas a temperatura ambiente, luego se lavan y se resuspenden en solución salina. La reactividad de los antígenos de los hematíes posterior al tratamiento de cloroquina apenas se ve afectada, como se ha comprobado mediante reacciones con reactivos que cumplen los requisitos de

Clave:

Subrayado = Adición o cambio significativo ▲ = Eliminación de texto

Gamma-Quin®
Chloroquine Diphosphate Solution

For Removal of Red Cell-Bound Immunoglobulin

IMMUCOR

potencia de la FDA y se comportan como reactivos en un sistema de ensayo con alta concentración de proteínas, o bien mediante la prueba de antiglobulina indirecta. De la misma manera, en los casos en los que la prueba de antiglobulina directa se vuelve negativa después del tratamiento, los hematíes se pueden determinar con reactivos con alta concentración proteínica o con aquellos reactivos mediante la prueba de antiglobulina indirecta. Sin embargo, aquellas sustancias que sean reactivas a soluciones salinas (tanto si están fabricadas a partir de IgM o de IgG químicamente modificado) y reactivos de determinación del grupo sanguíneo monoclonales pueden proporcionar reacciones perceptiblemente más débiles con hematíes tratados con cloroquina de que lo que cabría esperar con hematíes sin tratar y por esta razón se recomienda que no se realice la tipificación de antígenos con estos reactivos tras el tratamiento. En cualquier caso, la aglutinación espontánea de hematíes revestidos de inmunoglobulina es relativamente extraña en las pruebas realizadas con reactivos de concentración proteínica. En la mayoría de las situaciones, no es necesario tratar los hematíes positivos para la antiglobulina directa con cloroquina para llevar a cabo la tipificación de antígenos para los que están disponibles sustancias que son reactivas a la solución salina

y reactivos monoclonales de la especificidad requerida. En función del rendimiento de una prueba de control apta para detectar la autoaglutinación espontánea (de acuerdo con la recomendación del fabricante del reactivo del prospecto del envase), las pruebas con sustancias que son reactivas a la solución salina y reactivos monoclonales pueden realizarse en hematíes revestidos con inmunoglobulina sin un tratamiento previo con cloroquina. Los hematíes tratados con cloroquina se pueden asimismo emplear para la autoadsorción de autoanticuerpos calientes desde el suero del paciente antes de las pruebas para la detección de la presencia de autoanticuerpos. Incluso cuando el tratamiento efectúe únicamente una disociación parcial de la inmunoglobulina unida, la fuerza de la prueba de antiglobulina directa puede reducirse lo suficiente como para permitir la interpretación de los resultados de las pruebas obtenidos en procedimientos de determinación del grupo sanguíneo o como para mejorar la eficacia de la autoadsorción caliente. El tratamiento no disocia los componentes del complemento de los hematíes, aunque no estos no interfieren con las pruebas de antiglobulina indirectas realizadas con reactivos anti-IgG.

REACTIVO: Gamma-Quin es una solución a aproximadamente el 16 % de difosfato de cloroquina en una solución salina tamponada con fosfato con un pH de $5,0 \pm 0,1$. No se han añadido conservantes.

PRECAUCIONES:

Para uso diagnóstico in vitro. Debe conservarse a una temperatura de entre 1 y 10 °C cuando no se utilice. No lo diluya. No lo congele. Se deben realizar esfuerzos para minimizar la contaminación. No lo utilice después de la fecha de caducidad.

Do not use if turbid or discolored.

No usar si presenta turbidez o decoloración.

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

HEMOMEDICA S.R.L.
PAULA ZUCCCHINI
Directora Técnica
*4.N. 12.855

CAUTION: THE PACKAGING OF THIS PRODUCT (DROPPER BULB) MAY CONTAIN DRY NATURAL RUBBER NATURAL SECO.

PRECAUCIÓN: EL ENVASE DE ESTE PRODUCTO (AMPOLLA CUENTAGOTAS) PUEDE CONTENER CAUCHO NATURAL SECO.

El formato de la fecha de caducidad se expresa como AAAA-MM-DD (año-mes-día).

EXTRACCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS: No se requiere una preparación especial del paciente con anterioridad a la recogida de muestras. La sangre debe extraerse mediante una técnica aséptica, preferiblemente en un anticoagulante. La muestra deberá analizarse lo antes posible tras la extracción. Si se retrasa el análisis, la muestra se puede conservar a una temperatura entre 1 y 10 °C. Si la muestra presenta contaminación bacteriana, los resultados pueden ser erróneos. Las muestras extraídas con EDTA no deberán almacenarse más de siete días. Es mejor analizar las muestras de sangre con oxalato o heparinizadas en los dos días posteriores a la extracción. Las muestras coaguladas son aptas, aunque se pueden experimentar dificultades a la hora de obtener el volumen requerido de hematíes para el procedimiento. Los hematíes de los coágulos o de las muestras extraídas en el ACD o el CPD se pueden tratar hasta 21 días después de su recogida.

PROCEDIMIENTO:

Materiales suministrados: Gamma-Quin

Otros materiales necesarios: Tubos de ensayo (se recomiendan de 12 x 75 mm), pipetas, solución salina isotónica o solución salina isotónica tamponada con fostato (aproximadamente 15 mM) con un pH 6,5-7,5, centrifuga y temporizador. Antiglobulina humana y reactivos de determinación del grupo sanguíneo apropiados para cualquier prueba posterior prevista.

MÉTODO DEL ENSAYO:

1. Prepare los hematíes a tratar lavándolos al menos tres veces en grandes volúmenes de solución salina para eliminar el suero o el plasma humanos contaminados. Calcule para un mínimo de 0,5 ml de hematíes empaquetados. Si son necesarios los hematíes tratados para la autoadsorción caliente, será necesario un volumen mayor y el volumen de Gamma-Quin que se añade en el paso 3 se deberá ajustar conforme a ello. El cociente de reactivo con respecto a los hematíes empaquetados y lavados debe ser de 4:1.
2. Introduzca 10 gotas (aproximadamente, 0,5 ml) de los hematíes empaquetados y lavados en un tubo de ensayo debidamente etiquetado.
3. Añada 40 gotas (aproximadamente, 2,0 ml) de Gamma-Quin y mézclelas bien.
4. Incube la mezcla durante un período de hasta dos horas a temperatura ambiente (23 ± 3 °C). El tiempo de disociación varía entre los pacientes. Treinta minutos debe considerarse como el tiempo mínimo en el cual se espera que ocurra una disociación significativa de la inmunoglobulina. Si se desea, se puede llevar a cabo una prueba de antiglobulina directa en intervalos de 30 minutos en los hematíes que se están tratando para así controlar el progreso de la disociación. No alargue el tratamiento más de dos horas.
5. Lave los hematíes al menos tres veces con abundante solución salina para eliminar la solución de cloroquina. Se puede observar una ligera hemólisis en algunas muestras, aunque no se debe prestar demasiada atención a este fenómeno. *NOTA: Puede que sean necesarios más de tres lavados si se lleva a cabo la prueba en un tubo de ensayo más pequeño que el que se recomienda.*
6. Efectúe una prueba de antiglobulina directa para comprobar si el autoanticuerpo se ha disociado lo suficiente como para permitir determinar de forma precisa de qué tipo son los antígenos de los hematíes.
7. Vuelva a suspender los hematíes en una concentración al 3-4 % de solución salina para posteriores ensayos. Si los hematíes se van a usar para la autoadsorción caliente, se deben dejar empaquetados. Los hematíes se pueden tratar con una enzima antes de usarse para la autoadsorción, si así se desea.

CONTROL DE CALIDAD: El único control necesario es la prueba de antiglobulina directa en los hematíes después del tratamiento, como se indica en el paso 6 del procedimiento del tratamiento. Este no se volverá negativo en todos los casos, pero su fuerza se puede reducir lo suficiente mediante el tratamiento para permitir que se lleven a cabo y se interpreten correctamente las pruebas de determinación del grupo sanguíneo, o para permitir que los hematíes tratados se usen de forma eficaz para la autoadsorción caliente.

El procedimiento de disociación de la cloroquina puede que no funcione en todos los casos, pero si el tratamiento no consigue reducir la fuerza de la prueba de

Clave:

Subrayado = Adición o cambio significativo ▲ = Eliminación de texto

antiglobulina directa in vivo en hematíes revestidos de diferentes pacientes en repetidas ocasiones, puede ser indicio de que el producto está deteriorado. La eficacia del producto se puede probar incubando los hematíes D+ con anti-D e intentando disociar a continuación el anticuerpo que lo reviste mediante el procedimiento del tratamiento. El anticuerpo que reviste los hematíes in vitro por lo general es más resistente a la disociación de lo que lo suelen ser mayoría de los autoanticuerpos. No obstante, si la potencia de la reacción antiglobulínica se reduce de forma significativa con posterioridad al tratamiento, sería indicativo que el producto continúa siendo eficaz.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR EL

TRATAMIENTO: Una prueba de antiglobulina directa negativa en los hematíes tratados indica que la inmunoglobulina se ha disociado completamente de estos y que los hematíes tratados se pueden tipificar mediante el procedimiento de prueba de antiglobulina indirecta o con reactivos que contengan potenciadores que pueden producir la aglutinación espontánea de hematíes revestidos con inmunoglobulina. Incluso una reducción sustancial en la fuerza de la prueba de antiglobulina directa después del tratamiento puede ayudar en estudios posteriores de los hematíes del paciente o hará que el procedimiento de autoadsorción caliente sea más efectivo.

La reactividad de algunos antígenos de grupos sanguíneos puede verse perjudicada de alguna manera por el tratamiento de cloroquina. Edwards, Moulds y Judd, en su estudio original, no notaron ninguna pérdida de reactividad mediante la prueba de antiglobulina indirecta con los anticuerpos de grado reactivo [4]. Sin embargo, un estudio posterior de Sasseti y Nicholls indicó que pueden darse resultados negativos falsos en la prueba cuando examinamos los hematíes tratados con cloroquina con reactivos Rh fabricados a partir del IgG modificado químicamente [5]. Aunque normalmente no es necesario tratar los hematíes revestidos con antiglobulina como un paso preliminar para obtener resultados verdaderos con sustancias reactivas a la solución salina (tanto fabricados a partir de IgM como IgG modificada químicamente), esta observación sí que indica que el tratamiento con cloroquina puede verse acompañado de daños en las estructuras de la superficie de los antígenos, con independencia de que estos sean indetectables o no en el transcurso de una prueba normal. Estudios más modernos [6,7] sugieren que el tratamiento de cloroquina puede causar resultados de prueba negativos falsos incluso cuando se usa la prueba de antiglobulina indirecta para la determinación del antígeno. McShane y Cornwall [7] desaconsejan utilizar anticuerpos de baja avidéz o bajo título de un único donante para tipificar los hematíes tratados con cloroquina y apoyan la idea de que los reactivos para la determinación del grupo sanguíneo con licencia pueden considerarse fiables para esta finalidad. Se puede concebir, sin embargo, que incluso los anticuerpos de grado reactivo puedan ofrecer reacciones engañosas cuando se usan para examinar las células tratadas con cloroquina si el antígeno en cuestión resulta tener una expresión débil. A la luz de las observaciones anteriormente mencionadas, se deben tomar precauciones a la hora de interpretar los resultados de los procedimientos de determinación de los antígenos en los hematíes tratados con cloroquina.

Si la prueba de antiglobulina directa con antiglobulina humana anti-IgG-C3d; poliespecífica sigue siendo positiva después del tratamiento con cloroquina, se debe considerar la posibilidad de que solo los componentes de complemento se quedan unidos a los hematíes. Se debe llevar a cabo la prueba de antiglobulina directa con antiglobulina humana anti-IgG. Si esta ofrece un resultado negativo, la determinación del antígeno solo se puede realizar con seguridad con antiglobulina humana anti-IgG.

Si el procedimiento del tratamiento no reduce de una manera significativa la fuerza de la reacción de antiglobulina directa con antiglobulina humana anti-IgG, este método no se puede usar para disociar el anticuerpo en este caso.

LIMITACIONES: Como en todos los exámenes serológicos, factores tales como los materiales contaminados, un tiempo de incubación, una temperatura, una centrifugación y un examen de la aglutinación incorrectos, así como el no seguimiento del procedimiento de prueba recomendado pueden dar lugar a resultados falsos en las pruebas. Además:

1. La aplicación del tratamiento durante un período de dos horas puede que no consiga obtener un resultado positivo de la prueba de antiglobulina directa en todos los casos. La prolongación del tratamiento, o su repetición en hematíes ya tratados una vez, puede provocar el deterioro de la reactividad del antígeno.
2. El tratamiento no disocia los componentes de complemento de los hematíes.
3. Puede producirse hemólisis durante el tratamiento con algunas muestras de sangre, pero es posible ignorarla siempre y cuando no sea excesiva. La hemólisis puede ir asociada a la maduración de la muestra de los hematíes que se están tratando, la naturaleza del anticoagulante al cual fue extraído o, en pocas ocasiones, a la mayor fragilidad de los hematíes que se están tratando.

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

HEMOMEDICA S.R.L.
PAULA ZUCCHINI
Directora Técnica
*t.N. 12.855

4. Los resultados obtenidos en la tipificación de antígenos mediante hematíes tratados con cloroquina se deben interpretar con precaución, ya que las reacciones pueden ser algo más débiles que con hematíes no tratados, incluso si se utilizan reactivos de antiglobulina o reactivos con alta concentración proteínica que cumplan los requisitos de potencia de la FDA. Los reactivos de determinación del grupo sanguíneo monoclonales o reactivos a la solución salina (tanto fabricados a partir de IgM o de IgG modificado químicamente) no deben emplearse para la tipificación de antígenos en hematíes tratados con cloroquina, ya que las reacciones pueden ser marcadamente más débiles a las esperadas, lo que trae como consecuencia la posibilidad de falsos resultados negativos.
5. Se ha propuesto un método alternativo al uso de difosfato de cloroquina en estudios serológicos de grupo sanguíneo, concretamente la extracción de los llamados antígenos Bg de los hematíes a modo de ayuda para la identificación de los anticuerpos [8]. Este método está basado en la observación de que los antígenos HLA se pueden disociar de las plaquetas y de los neutrófilos mediante el tratamiento de cloroquina, y puede tener éxito en la reducción de la reactividad de los antígenos Bg en los hematíes. Los resultados obtenidos en esta aplicación deben interpretarse con un cuidado extremo, ya que existen evidencias claras de que la reactividad de los antígenos de la superficie de los hematíes puede presentar daños por el tratamiento con cloroquina, lo que puede provocar una reacción negativa con un anticuerpo reactivo débil diferente a uno de la especificidad "anti-Bg".

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE RENDIMIENTO: Los ensayos a los que se ha sometido la solución de difosfato de cloroquina Gamma-Quin han demostrado que, cuando se emplea con el tratamiento recomendado, disocia la IgG unida in vivo e in vitro a los hematíes humanos. Este efecto se consigue reduciendo marcadamente la reactividad de los antígenos heredados comunes de los hematíes tratados, como se ha medido con los reactivos de determinación del grupo sanguíneo con licencia a través de la prueba de antiglobulina indirecta o en un sistema de pruebas con alta concentración proteínica. El producto no se ha probado para verificar su capacidad de disociar los antígenos llamados Bg de los hematíes. Estos están sujetos a una amplia variación en la fuerza de su expresión y no sería posible generalizar sobre la eficacia del procedimiento con tan solo las pruebas de unos ejemplos disponibles de hematíes "Bg+". El rendimiento de este producto va ligado al cumplimiento de los métodos recomendados en este prospecto.

Para obtener más información o para ponerse en contacto con el servicio técnico, llame a Immucor al número 855-IMMUCOR (466-8267).

BIBLIOGRAFÍA

1. Domokos V, Aszódi L. The effect of chloroquine on the isoantibody reaction of red blood cells. *Haemat Hung* 1964; 4:179-186.
2. Domokos V, Aszódi L. The in vivo influencing of Rh(D) antigen-antibody reaction by chloroquine. *Haemat Hung* 1964; 4:355-360.
3. Mantel W, Holtz G. Characterisation of autoantibodies to erythrocytes in autoimmune haemolytic anaemia by chloroquine. *Vox Sang* 1976; 30:453-463.
4. Edwards JM, Moulds JJ, Judd WJ. Chloroquine dissociation of antigen-antibody complexes: A new technic for typing red blood cells with a positive direct antiglobulin test. *Transfusion* 1982; 22:59-61.
5. Sassetti R, Nicholls D. Decreased antigen reactivity caused by chloroquine. (Letter to the editor.) *Transfusion* 1982; 22:537-538.
6. Mallory D, Reid M. Misleading effects of chloroquine. (Letter to the editor.) *Transfusion* 1984; 24:412.
7. McShane K, Cornwall S. Chloroquine reduces antigen strength. (Letter to the editor.) *Transfusion* 1985; 25:83.
8. Swanson JL, Sastamoinen R. Chloroquine stripping of HLA A,B antigens from red cells. (Letter to the editor.) *Transfusion* 1985; 25:439-440.

CE

Código del prospecto: 3027es-4
Revisado: 03/2017

Clave:
Subrayado = Adición o cambio significativo ▲ = Eliminación de texto

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

HEMOMEDICA S.R.L.
PAULA ZUCCHINI
Directora Técnica
*I.N. 12 855

W.A.R.M.™

Warm Autoantibody Removal Medium

• IVD

• 1°C / 10°C

• No US standard of potency



• Discard if markedly turbid

Rx ONLY



Immunor, Inc.
3130 Gateway Drive
Norcross, GA 30071 USA

347es-10

EC REP

Immunor Medizinische Diagnostik GmbH
Robert-Bosch-Strasse 32
63303 Dreieich, GERMANY

Uso previsto:

Warm Autoantibody Removal Medium

Medio de extracción de autoanticuerpos calientes

W.A.R.M. se utiliza para separar autoanticuerpos calientes de los hematíes para facilitar la interpretación de complejidades serológicas.

Resumen del ensayo:

Los autoanticuerpos reactivos en caliente constituyen complejos problemas serológicos que pueden ocasionar grandes pérdidas de tiempo al tratar de resolverlos, particularmente en aquellos pacientes que requieren una prueba de compatibilidad pretransfusional. Tales autoanticuerpos son producidos por pacientes con anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos calientes, con anemia hemolítica inducida por medicamentos y en cierta población de individuos normales sin síntomas clínicos aparentes.

Algunos de los autoanticuerpos presentan una especificidad única (ej. anti-c, anti-E, anti-e y anti-Jk^a). Sin embargo, la mayoría de los autoanticuerpos encontrados presentan especificidades que no se pueden clasificar sin el uso de hematíes infrecuentes, tales como hematíes K_o o con eliminación de Rh. Las muestras de pacientes con autoanticuerpos y que requieren transfusión pueden manifestarse mediante: 1) una prueba de antiglobulina directa (PAD) positiva debido al recubrimiento in vivo de hematíes autólogos, y 2) una prueba de antiglobulina indirecta (PAI) o de detección de anticuerpos positiva debido a los autoanticuerpos libres en el suero. El autoanticuerpo suele reaccionar con prácticamente todos los reactivos y hematíes de donantes. Por tanto, es muy difícil determinar si en la muestra existen aloanticuerpos subyacentes con una posible importancia clínica.

En el pasado se han utilizado múltiples técnicas para ayudar en la detección de aloanticuerpos en muestras con autoanticuerpos reactivos en caliente. A veces, puede resultar útil la utilización de procedimientos de valoración con hematíes indicadores de fenotipos variados. Sin embargo, los estudios con titulaciones asumen que los aloanticuerpos tienen un título más alto que el autoanticuerpo. Además, los resultados de las titulaciones suelen ser difíciles de interpretar.

Los procedimientos de adsorción han demostrado ser más útiles en el reconocimiento de autoanticuerpos subyacentes. La adsorción de muestras de donantes con hematíes R₁R₁, R₂R₂ y rr ha servido para determinar la presencia de aloanticuerpos en pacientes con autoanticuerpos libres en suero. Aunque el procedimiento es útil, es muy laborioso y consume mucho tiempo. En la mayoría de los laboratorios, no se dispone fácilmente de los hematíes con el fenotipo requerido en cantidades suficientes. Además, existe un riesgo inherente de que un aloanticuerpo no detectado pueda ser adsorbido simultáneamente por los hematíes del donante.

El procedimiento de adsorción autólogo para extraer los autoanticuerpos reactivos en caliente es la técnica más adecuada para ayudar en la interpretación de estas complejidades serológicas, en especial en pacientes que no han recibido una transfusión recientemente. Los hematíes necesarios para realizar estos procedimientos están disponibles en la muestra del paciente. Dado que el procedimiento es una autoadsorción, existe una pequeña preocupación de que los antígenos extraños extraigan un aloanticuerpo oculto a menos que el paciente haya sido recientemente transfundido.

El autoanticuerpo libre en suero no suele estar presente hasta que los locus antigénicos correspondientes de los propios hematíes del paciente no se hayan saturado con

Clave:

Subrayado = Adición o cambio significativo; ▲ = Eliminación de texto

W.A.R.M.™

Warm Autoantibody Removal Medium

IMMUCOR

anticuerpos. Por tanto, los hematíes de estos pacientes suelen asociarse a una prueba de antiglobulina directa positiva. Los sitios antigénicos saturados extraen los anticuerpos adicionales de una muestra muy deficiente en anticuerpos. Para maximizar la eficiencia de una autoadsorción, deben extraerse todas o casi todas las proteínas fijadas (principalmente las inmunoglobulinas IgG).

Los autoanticuerpos pueden extraerse de los hematíes tratando los hematíes con enzimas, sometiéndolos a altas temperaturas (entre 45 y 56 °C) o tratándolos con ciertos productos químicos (como la cloroquina difosfato).¹⁻⁶

W.A.R.M. es una solución de sulfhidrilos y enzimas diseñada para preparar los hematíes recubiertos con IgG para el procedimiento de autoadsorción en caliente. El reactivo se basa en el reactivo ZZAP descrito por Branch y Petz⁶, en el que se emplea ditiotreitól y papaína activada con cisteína para eluir el anticuerpo. La preparación de sulfhidrilos/enzimas disocia algunos depósitos de IgG y C3 de los hematíes sensibilizados. Venyaminov et al.⁷ postulan que el componente de sulfhidrilo reduce las fijaciones de disulfuro entre cadenas de las moléculas de la inmunoglobulina y, como resultado, hace a la molécula más susceptible a la digestión por el enzima. Los estudios sobre tratamientos consecutivos realizados por Branch y Petz⁶ apoyan esta hipótesis.

Dado que W.A.R.M. contiene un enzima proteolítico, los hematíes tratados con el reactivo también muestran características de hematíes premodificados con enzimas; por ejemplo, la potenciación de los antígenos del Rh y la destrucción o alteración de los antígenos sensibilizados con enzimas (Fy^a, Fy^b, M, N, etc.). Los antígenos del sistema del grupo sanguíneo Kell se desnaturalizan con el componente ditiotreitól, a excepción del K_o, que ha quedado demostrado que se ve potenciado, mientras que K_m ha demostrado no verse afectado.^{6,8} Los antígenos de los sistemas LW, Sc, Yt e In y de los grupos Knops, Gregory y JMH se desnaturalizan de la misma forma.⁹

Tras la extracción de una porción del autoanticuerpo del recubrimiento, los hematíes autólogos tratados se pueden utilizar para la autoadsorción. El suero adsorbido se puede utilizar en la detección e identificación de anticuerpos.

Principio del ensayo:

Los hematíes de un paciente con PAD positiva y autoanticuerpos libres en suero se tratan con W.A.R.M. Mediante este tratamiento, se extraen los autoanticuerpos y, en consecuencia, se reduce la potencia de la PAD positiva y se liberan los locus antigénicos para la adsorción. Al mismo tiempo, el enzima premodifica los hematíes. Los hematíes preparados de esta forma se combinan con suero autólogo y la mezcla se incuba a 37 °C. El autoanticuerpo reactivo en caliente se fija al antígeno presente en los hematíes del paciente. Esta interacción inmunocompleja se ve potenciada por el tratamiento enzimático de los hematíes. Tras la incubación, la mezcla se centrifuga y se extrae el suero adsorbido para analizarlo. Al comparar los resultados obtenidos con el suero adsorbido con W.A.R.M. y los obtenidos con el suero no adsorbido, normalmente se puede confirmar la presencia de autoanticuerpos reactivos en caliente, además de detectar o identificar cualquier aloanticuerpo adicional que pueda estar presente.

Reactivos:

W.A.R.M. es una preparación formulada especialmente de ditiotreitól y papaína activada con cisteína en tampón de fosfato. El producto se ha filtrado y liofilizado.

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

HEMOMEDICA S.R.L.
PAULA ZUCCHINI
Directora Técnica
• T.N. 12 855

Este producto se debe reconstituir con agua desionizada y mezclarse concienzudamente antes de su uso. Consulte la etiqueta del contenedor para conocer el volumen de reconstitución.

W.A.R.M. está fabricado por Immucor.

Precauciones:

Para uso diagnóstico in vitro.

No existen normas de potencia estadounidenses.

Almacene el medio W.A.R.M. liofilizado y el medio W.A.R.M. reconstituido a temperaturas comprendidas entre 1 y 10 °C. **No lo congele.** No la utilice después de la fecha de caducidad. No lo utilice transcurridos cinco (5) días de la reconstitución.

Discard if markedly turbid	Descartar si presenta turbidez evidente.
----------------------------	--

Pueden aparecer partículas o una ligera turbidez una vez reconstituido. Una turbidez muy marcada puede indicar un posible deterioro del reactivo, que puede confirmarse con las pruebas serológicas descritas en la sección de **controles**.

El formato de la fecha de caducidad se expresa como AAAA-MM-DD (año-mes-día).

Extracción y preparación de muestras:

Extraiga una muestra en un anticoagulante adecuado o sin anticoagulante utilizando una técnica de flebotomía adecuada. Si la muestra se extrae en EDTA, heparina o sin anticoagulante, el ensayo debe realizarse en 48 horas. Si no puede evitar un retraso superior a las 48 horas, la muestra debe extraerse en un anticoagulante o conservante y conservarse refrigerada a una temperatura entre 1 y 10 °C. Las muestras extraídas y conservadas en estas condiciones conforme a los requisitos previos de transfusión deben ser satisfactorias para los ensayos durante la vida útil del anticoagulante en el que se ha extraído la muestra y el intervalo de tiempo necesario para la retención de las muestras.

Procedimiento:

Material suministrado.

W.A.R.M. en viales precintados.

Otros materiales necesarios.

1. Suero o plasma para ser adsorbido.
2. Solución salina isotónica
3. Tubos de ensayo y gradilla para tubos de ensayo.
4. Pipetas de transferencia.
5. Centrífuga serológica capaz de proporcionar una fuerza centrífuga relativa (FCR) de 900-1000 g.
6. Baño María a 37 ± 2 °C o incubador de aire seco.
7. Agua desionizada.
8. Rotulador.
9. Cronómetro de intervalos.

Método del ensayo:

1. Identifique los tubos que va a utilizar en el procedimiento de adsorción.
2. Reconstituya un vial de W.A.R.M. añadiendo 5 ml de agua desionizada. Mézclelo bien.
3. Añada 1 volumen de concentrado de hematíes del paciente al tubo. No es necesario lavar los hematíes del paciente antes del tratamiento con W.A.R.M.
4. Añada al tubo 2 volúmenes de W.A.R.M. reconstituido (por ejemplo, 1 ml de hematíes por cada 2 ml de W.A.R.M.).
5. Mézclelo bien e incúbelo a 37 ± 2 °C durante aproximadamente 30 minutos.
6. Lavar los hematíes tratados con W.A.R.M. un mínimo de tres (3) veces con una solución salina. Elimine la máxima cantidad posible de solución salina después de cada lavado.
7. Añada un volumen igual de suero o plasma de paciente al concentrado de hematíes tratados con W.A.R.M.
8. Mézclelo bien e incúbelo durante un período de 30 a 60 minutos a 37 ± 2 °C. Una incubación de 60 minutos puede ofrecer una mayor adsorción que una incubación de 30 minutos.

Nota: Debido a la fragilidad de ciertos hematíes, se puede observar hemólisis durante el tratamiento. El tratamiento de dichos hematíes con W.A.R.M. debe limitarse a treinta (30) minutos.

Clave:

Subrayado = Adición o cambio significativo; ▲ = Eliminación de texto

9. Centrifúguelo durante aproximadamente dos (2) minutos o hasta que los hematíes estén bien compactados.
10. Recoja el suero (o plasma) adsorbido con una pipeta de transferencia.
11. Analice una alícuota de la muestra adsorbida a 37 ± 2 °C y en la fase de antiglobulina para determinar si se han extraído todos los autoanticuerpos reactivos en caliente. (Consulte **Interpretación de los resultados**). Si el resultado indica que la adsorción ha sido insuficiente, repita los pasos del 1 al 10 con una nueva alícuota de hematíes del paciente. Si la adsorción es completa, la muestra adsorbida del paciente está lista para su uso en la detección e identificación de anticuerpos.

Control de calidad:

La actividad de W.A.R.M. puede ser comprobada tras de su reconstitución para asegurar la efectividad de la solución. Se puede suponer que W.A.R.M. es suficientemente activo si se demuestra que los hematíes tratados presentan potenciamiento del antígeno del Rh y desnaturalización de los antígenos del sistema Kell. Se recomienda tratar con W.A.R.M. los hematíes reactivos con fenotipo conocido para demostrar el potenciamiento y la desnaturalización con los anticuerpos correspondientes.

Interpretación de los resultados:

ADSORCIÓN COMPLETA

La adsorción completa de los autoanticuerpos reactivos en caliente se consigue cuando el suero adsorbido ya no reacciona más veces donde previamente lo hacía con:

- a. los propios hematíes del paciente tratados con W.A.R.M., y
- b. los hematíes reactivos que no cuentan con antígenos a los que están dirigidos los aloanticuerpos adicionales.

ADSORCIÓN INCOMPLETA

Si los autoanticuerpos reactivos en caliente no han sido suficientemente extraídos, o los autoanticuerpos no pueden ser adsorbidos por hematíes tratados con W.A.R.M., la aglutinación se detectará cuando el suero se analice según los puntos a o b citados anteriormente.

NOTA: La adsorción completa de autoanticuerpos reactivos en caliente puede no ser siempre posible. Sin embargo, en algunos casos, una adsorción parcial de los autoanticuerpos puede ser suficiente para revelar la presencia de aloanticuerpos subyacentes.

Limitaciones:

Marsh y sus colaboradores¹⁰ han indicado que aproximadamente uno (1) de cada doscientos cincuenta (250) individuos con inmunidad a los hematíes presentan autoanticuerpos dirigidos contra especificidades del sistema de grupo sanguíneo Kell. Dado que el tratamiento con W.A.R.M. destruye o desnaturaliza los antígenos del sistema Kell, los autoanticuerpos de este sistema no se adsorberán. La especificidad de los autoanticuerpos del sistema Kell puede confirmarse con la obtención de unos resultados negativos al analizar un eluido preparado a partir de hematíes del paciente con un conjunto de hematíes reactivos tratados con W.A.R.M.

Algunos autoanticuerpos se dirigen a antígenos sensibilizados enzimáticamente, tales como M o Xg^a.¹¹ Dado que el tratamiento con W.A.R.M. destruye estos antígenos, la autoadsorción con hematíes tratados con W.A.R.M. no extraerá el autoanticuerpo correspondiente.

No se recomienda la utilización de hematíes tratados con W.A.R.M. para la tipificación de los antígenos puesto que los antisueros comerciales pueden ser o no ser específicos cuando se emplean de esta manera.

En ocasiones, es posible que los hematíes tratados con W.A.R.M. no adsorban completamente un autoanticuerpo reactivo en caliente. Como resultado, puede que no sea posible asignar una especificidad definitiva a las reacciones obtenidas tras la adsorción. Y lo que es más, la completa adsorción de autoanticuerpos reactivos en caliente no asegura que dichos anticuerpos remanentes en el suero adsorbido puedan ser identificarse fácilmente.

Las pruebas de reactividad cruzada realizadas en un suero autoadsorbido con W.A.R.M. no se pueden considerar "compatibles", ya que los anticuerpos extraídos mediante los procedimientos de autoadsorción de W.A.R.M. se activan a 37 °C. El procedimiento de autoadsorción en caliente solo sirve como ayuda en la detección e identificación de los aloanticuerpos subyacentes que pueden estar enmascarados por un autoanticuerpo reactivo en caliente.

Como existe la posibilidad de que se adsorba una cantidad significativa de aloanticuerpos en hematíes transfundidos, los resultados de los procedimientos de autoadsorción realizados en muestras de pacientes recientemente transfundidos deben interpretarse con precaución.

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

HEMOMEDICA S.R.L.
PAULA ZUCCHINI
Directora Técnica
• I.N. 12 855

Características específicas de rendimiento:

La capacidad de W.A.R.M. para extraer anticuerpos fijados de los hematíes sensibilizados se confirma probando cada lote de material conforme al procedimiento del prospecto. Además, cada lote se somete a un ensayo serológico para demostrar la actividad del enzima y de los agentes reductores. El rendimiento de este producto depende del seguimiento correcto de la metodología recomendada en el prospecto. Para obtener más información o para ponerse en contacto con el servicio técnico, llame a Immucor al número 855-IMMUCOR (466-8267).

Bibliografía:

1. Morel PA, Bergren MO, Frank BA. A simple method for the detection of alloantibody in the presence of warm autoantibody. *Transfusion* 1978;18:388 (Abstract).
2. Mantel W, Holtz G. Characterization of autoantibodies to erythrocytes in autoimmune hemolytic anemia by chloroquine. *Vox Sang* 1976;30:453.
3. Edwards JM, Moulds JJ, Judd WJ. Chloroquine dissociation of antigen-antibody complexes: una nueva técnica para la tipificación de los hematíes con una prueba de antiglobulina directa positiva. *Transfusion* 1982;22:59.
4. Nisonoff A, Wissler FC, Woernley DL. Mechanism of formation of univalent fragments of rabbit antibody. *Biochem Biophys Res Comm* 1959;1:318.
5. Reid, M. E. Autoagglutination dispersal utilizing sulphhydryl compounds. *Transfusion* 1978;18:353.
6. Branch, D. R.; Petz, L. D. A new reagent (ZZAP) having multiple applications in immunohematology. *Am J Clin Pathol* 1982;78:161.
7. Venyaminov SY, Rajnavolgyi E, Medgyesi GA et al. The role of interchain disulphide bridges in the conformational stability of human immunoglobulin G1 subclass. Hydrogen-deuterium exchange studies. *Eur J Biochem* 1976;67:81.
8. Polich S, Motschman T, Taswell H. Differential enhancement of Kx antigen by ZZAP. *Transfusion* 1982;22:419 (Abstract).
9. Edición de Brecher, M. E. Technical manual. 15.ª ed. Bethesda, M. D.: AABB, 2005.
10. Marsh WL, Yen R, Alicea E et al. Autoimmune hemolytic anemia and the Kell blood groups. *Am J Hemat* 1979;7:155.
11. Issitt PD, Anstee DJ. Applied blood group serology. 4.ª ed. Durham, N. C.: Montgomery Scientific Publications, 1998.



Código del prospecto 347es-10
Rev. 3/17


HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente


HEMOMEDICA S.R.L.
PAULA ZUCCHINI
Directora Técnica
•I.N. 12 855

Clave:

Subrayado = Adición o cambio significativo; ▲ = Eliminación de texto

Gamma ELU-KIT® II

For Rapid Acid Elution of Antibodies from Intact Red Blood Cells

IVD Rx ONLY

No U. S. Standard of Potency

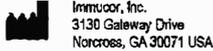
15°C 30°C



Do not use if markedly turbid

Harmful, Preservative: 0.1% Sodium Azide

Eluting Solution Concentrated Wash and Buffering Solution



3021es-4

Immucor Medizinische Diagnostik GmbH
Robert-Bosch-Strasse 32
63303 Dreieich, GERMANY

EC REP

For Rapid Acid Elution of Antibodies from Intact Red Blood Cells

Para una elución ácida rápida de anticuerpos a partir de hemáties intactos

USO PREVISTO: El juego Gamma ELU-KIT II está diseñado para una elución ácida rápida de anticuerpos a partir de hemáties intactos.

RESUMEN DEL ENSAYO: La elución es el procedimiento de la recuperación de anticuerpos unidos a hemáties. Los eluidos preparados a partir de hemáties revestidos in vivo o in vitro se emplean para cualquiera de las siguientes finalidades:

1. Identificar anticuerpos revistiendo hemáties de pacientes que presentan una prueba de antiglobulina directa positiva.
2. Aislar anticuerpos específicos a partir de sueros que contengan múltiples especificidades mediante la adsorción in vitro en hemáties seleccionados.
3. Determinar la presencia de antígenos débilmente expresados en hemáties tras una incubación anterior con antisueros seleccionados.
4. Preparar antisueros específicos libres de anticuerpos no deseados. Asimismo, se pueden realizar pruebas a los eluidos en busca de presencia de proteínas específicas mediante una gran variedad de técnicas inmunoquímicas y bioquímicas.

Los anticuerpos se pueden someter a un proceso de elución a partir de hemáties intactos o de estroma restante tras la lisis de los hemáties. La elución de los anticuerpos a partir de los hemáties se ha conseguido mediante calentamiento[1], mediante el tratamiento de las células sensibilizadas con disolventes orgánicos[2, 3] o mediante exposición a un pH alto o bajo[4, 5, 6, 7].

PRINCIPIO DEL ENSAYO: En primer lugar, se lavan bien los hemáties revestidos de anticuerpos para eliminar todos los restos de proteína no unida, con una solución de lavado especial para mantener la asociación con el antígeno unido. Los hemáties lavados se suspenden posteriormente en una solución de glicina con un pH bajo para disociar el anticuerpo unido. Tras la centrifugación, el sobrenadante que contiene todos los anticuerpos disociados se separa de los hemáties y se neutraliza añadiendo una solución tampón. Entonces, el eluido se encuentra preparado para la prueba de detección o identificación de anticuerpos.

REACTIVO: Gamma ELU-KIT II consta de tres soluciones, en volúmenes suficientes para al menos diez eluidos con usando el procedimiento detallado en este prospecto de instrucciones.

- **Solución de lavado concentrada:** Solución tamponada concentrada que debe diluirse en una proporción 1 a 10 con agua de calidad de reactivo de laboratorio para preparar la solución de lavado de trabajo. Contiene azida sódica al 0,1 % como conservante. La solución de lavado de trabajo ofrece un tampón isotónico con una fuerza iónica adecuada para lavar los hemáties y liberarlos de anticuerpos no unidos.
- **Solución de elución:** Un tampón de glicina de pH bajo, diseñado para disociar el anticuerpo unido de los hemáties lavados. Este producto no contiene agentes conservantes.
- **Solución tampón:** Una solución de TRIS (hidroximetil)-aminometano que contiene albúmina bovina, que se utiliza para neutralizar la acidez de la solución

Clave:

Subrayado = Adición o cambio significativo ▲ = Eliminación de texto

Gamma ELU-KIT® II

For Rapid Acid Elution of Antibodies from Intact Red Blood Cells

IMMUCOR

de elución tras la disociación del anticuerpo unido. Toda la albúmina bovina usada en la fabricación de este producto proviene de animales donantes de EE. UU. que han sido inspeccionados y certificados por los inspectores del Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria de EE. UU. y no presentan enfermedades. Se considera que el producto de origen rumiante tiene un riesgo bajo de transmitir EEB (Encefalopatía espongiiforme bovina). Contiene azida sódica al 0,1 % como conservante. Se añade un indicador de color azul para ayudar a ajustar el eluido al pH correcto para la prueba.

Los productos de los componentes se pueden intercambiar entre lotes, siempre y cuando no estén caducados.

PRECAUCIONES:

Para la solución de lavado concentrada Gamma ELU-KIT II y la solución tampón Gamma ELU-KIT II:



Este reactivo contiene azida sódica al 0,1 %. Advertencia: H302 Nocivo en caso de ingestión.

Para la solución de eluidos Gamma ELU-KIT II:



Este reactivo es una solución con un pH bajo. Advertencia: H314 Provoca daños oculares y quemaduras cutáneas graves. H318 Provoca daños oculares graves.

Para uso diagnóstico in vitro. Guárdelo a temperatura ambiente (de 15 a 30 °C) cuando no la emplee. La solución de lavado de trabajo debe guardarse a una temperatura de 1 a 10 °C cuando no se emplee. Debe hacerse todo lo posible para minimizar la contaminación durante el uso del producto.

Do not use if markedly turbid. No debe utilizarse si presenta turbidez evidente.

No lo congele. No la utilice después de la fecha de caducidad. No use la solución tampón si no está de color azul antes de tamponar el eluido.

Advertencia: La azida sódica puede reaccionar con el cobre y el plomo de las tuberías para formar azidas metálicas muy explosivas. Si se desecha por el desagüe, debe añadirse un gran volumen de agua para evitar la acumulación de azidas.

El reactivo debe manipularse y eliminarse como potencialmente infeccioso.

El formato de la fecha de caducidad se expresa como AAAA-MM-DD (año-mes-día).

EXTRACCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS: No se requiere una preparación especial del paciente con anterioridad a la recogida de muestras. La sangre se debe extraer mediante una técnica aséptica y debe realizarse la prueba mientras todavía está fresca. En caso de que se produzca un retraso en la prueba, la muestra debe guardarse a una temperatura de 1 a 10 °C, preferiblemente un tiempo no superior a 72 horas. *NOTA: El uso de muestras sanguíneas con un tiempo superior a 72 horas puede asociarse a eluidos coloreados por la hemoglobina y con la dificultad añadida de ajustar el pH final del eluido para la prueba.*

Paula Zucchini
Farmacéutica
M.N. 12.855

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Rocio Gestión

Es preferible una muestra anticoagulada de personas cuyos hematíes estén revestidos in vivo debido al volumen de hematíes requeridos para el procedimiento de elución. EDTA es el anticoagulante de elección. Asimismo, es adecuada una muestra desfibrinada.

PROCEDIMIENTO:

Materiales suministrados: Gamma ELU-KIT II

Otros materiales necesarios: Tubos de ensayo (12 x 75 mm para la elución, 10 x 75 mm o 12 x 75 mm para la prueba de eluidos), pipetas, agua de laboratorio de calidad de reactivo, baño María a 37 °C o incubadora, solución salina isotónica o solución salina isotónica tamponada con fosfato (aproximadamente 15 mM) con un pH de 6,5-7,5, temporizador y centrífuga. Antiglobulina humana con anti-IgG, hematíes sensibilizados a IgG y una ayuda óptica como lentes de mano o espejos cóncavos para la prueba de eluidos. El uso de Gamma PeG™ es opcional.

MÉTODOS DE LA PRUEBA:

Preparación de eluidos

Se aplica a todos los hematíes que se hayan revestido de anticuerpos in vivo o a aquellos hematíes seleccionados que se han revestido in vitro mediante una incubación previa con un antisuero.

NOTA: La finalidad recomendada de la solución de lavado de trabajo especial es reducir al mínimo la cantidad de anticuerpos que se disocia de los hematíes durante la fase de lavado. Se ha informado, no obstante, de que el uso de esta solución con fuerza iónica baja puede producir una captación no específica de anticuerpos para las células negativas para el antígeno durante la fase de lavado, en especial cuando los anticuerpos son particularmente fuertes[8]. Como opción, se puede emplear una solución salina para lavar los hematíes antes de preparar el eluido. Esto debe evitar la captación no específica de los anticuerpos para las células negativas para el antígeno, pero puede provocar la disociación de anticuerpos de baja afinidad durante el proceso de lavado, lo que causaría que el eluido no tuviera actividad o que la tuviera a menos anticuerpos de los esperados. En caso de que se tome la decisión de no lavarlos con la solución de lavado de trabajo, no será necesario el paso 1 del siguiente procedimiento.

1. Prepare la solución de lavado de trabajo añadiendo un volumen de solución de lavado concentrada a nueve volúmenes de agua de laboratorio de calidad de reactivo. Mézclela bien antes de usarla. *NOTA: La dilución de la solución de lavado concentrada reduce la concentración de azida sódica a un nivel en el que ya no es eficaz como agente conservante. En caso de guardarla a una temperatura de 1 a 10 °C, la solución de lavado de trabajo se podrá usar siempre que no muestre una turbidez evidente y no provoque hemólisis de los hematíes.*
2. Centrifugue la muestra y elimine tanto suero o plasma como sea posible.
3. Lave la alícuota de los hematíes revestidos una vez con una solución salina. El volumen de la alícuota deberá ser suficiente para producir 1 ml (aproximadamente 20 gotas grandes) de hematíes empaquetados una vez completado el lavado.
4. Use la solución de lavado de trabajo para lavar los hematíes cuatro veces más con el fin de eliminar todos los anticuerpos no unidos. De forma alternativa, se pueden sustituir cuatro lavados más con solución salina en caso de que sospeche la unión no específica de anticuerpos a los hematíes negativos para el antígeno. Si se siguen estas instrucciones, se puede conseguir el lavado adecuado de hasta 1 ml de hematíes empaquetados en un tubo de ensayo de 12 x 75 mm. Reserve una alícuota pequeña del sobrenadante del lavado final como control.
5. Coloque 1 ml (20 gotas grandes) de hematíes lavados en un tubo de ensayo limpio de 12 x 75 mm; añada 20 gotas (aproximadamente 1 ml) de solución de elución y mézclelo CON CUIDADO invirtiendo el tubo cuatro veces. Si el tamaño de la muestra de prueba no es suficiente para producir 1 ml de hematíes empaquetados, el eluido puede prepararse a partir de un volumen menor de hematíes, aunque producirá un volumen inferior de eluido para la prueba. En tal caso, el volumen de solución de elución añadido no sería de 20 gotas, sino de un volumen IGUAL al volumen de hematíes empaquetados en el tubo.
6. Centrifugue de forma inmediata durante de 45 a 60 segundos a 3400 rpm (rcf de 900 a 1000). La inmersión prolongada de los hematíes en la solución de elución provoca hemólisis. La consiguiente liberación de hemoglobina en el eluido altera el pH y puede afectar al volumen requerido de la solución tampón para ajustar el pH del eluido a niveles neutros.

7. Transfiera el eluido sobrenadante a un tubo de ensayo limpio. Los hematíes depositados deben desecharse, ya que ya no son adecuados para los procedimientos de tipificación de antígenos.

8. Con respecto al eluido del ácido separado, añada una solución tampón suficiente para restaurar el pH del eluido dentro del intervalo necesario para la prueba (de 6,4 a 7,6). La presencia de un indicador azul en la solución tampón ofrece un medio para determinar que el eluido se ha ajustado de forma adecuada. No use la solución tampón si no está de color azul antes de tamponar el eluido. Esto se puede observar cuando se aspira la solución tampón con una pipeta. Cuando se añada en primer lugar la solución tampón a un eluido recién preparado, se apreciará que se vuelve de color amarillo al contacto con la solución de ácido. No obstante, a medida que el volumen de la solución tampón se aproxima al volumen original del eluido, el color cambia a azul claro. Esto persiste al mezclarlo si el pH del eluido se ha ajustado a dentro del intervalo deseado. El volumen de la solución tampón que se requiere para esta finalidad puede variar con los diferentes eluidos, en función de cierto número de factores, de entre los cuales el más importante es el grado de hemólisis durante el paso de elución. Además de la prolongación indebida del paso de elución ya mencionada, el grado de hemólisis puede estar influenciado por la edad y la fragilidad osmótica de los hematíes a partir de los cuales se prepara el eluido. Debe tenerse en cuenta que los volúmenes podrían no ser exactos cuando las soluciones se preparan gota a gota. La presencia de un indicador en la solución tampón facilita el ajuste del eluido al intervalo de pH requerido para la prueba. Si el color del eluido sigue siendo amarillo tras añadir 20 gotas (aproximadamente 1 ml) de solución tampón, siga añadiendo esta, una gota cada vez, hasta que aparezca el color azul claro al mezclarlo.

9. Mézclelo bien y centrifúguelo para eliminar cualquier sedimento o residuo celular, y posteriormente transfiera el eluido a un tubo de ensayo limpio, correctamente etiquetado.

El eluido estará en este momento preparado para la prueba o para detectar o identificar anticuerpos. En caso de que se produzca un retraso en la prueba, se debe conservar el eluido a una temperatura de entre 1 y 10 °C, y la prueba puede realizarse hasta siete días después de su preparación, siempre y cuando no se desarrolle turbidez. La turbidez puede indicar contaminación bacteriana y puede provocar resultados falsos. No se descarta una conservación mayor si el eluido se esteriliza mediante una membrana de filtración y se conserva a una temperatura de entre 1 y 10 °C, y si la prueba posterior se controla con hematíes establecidos como reactivos positivos y negativos con el eluido recién preparado. Se debe tener en cuenta que el color azul del indicador se desvanece durante la conservación.

Pruebas de eluidos

Se pueden realizar pruebas de eluidos mediante métodos de detección de anticuerpos tradicionales y el usuario puede validarlas obteniendo datos para demostrar resultados fiables de forma continuada mediante un procedimiento alternativo, o mediante el siguiente procedimiento usando la técnica de antiglobulina indirecta modificada. Los potenciadores como la albúmina bovina o un aditivo con baja fuerza iónica normalmente no son necesarios, ya que el eluido se encuentra ya en un sustrato de baja fuerza iónica. Si se emplea un reactivo aditivo de polietilenglicol (por ejemplo, Gamma PeG™) para mejorar la sensibilidad de la prueba, no se debe emplear la prueba de la antiglobulina modificada. En este caso, los hematíes deben lavarse al menos tres veces con una solución salina tras la incubación con el eluido, ya que es necesario eliminar el aditivo antes de añadir antiglobulina humana.

NOTA: La técnica de antiglobulina modificada omite el lavado repetido de la prueba de hematíes tras la incubación con el eluido, aunque depende de la eliminación adecuada de la proteína humana de las suspensiones de hematíes antes de la incubación. Los reactivos de glóbulos rojos comerciales pueden lavarse suficientemente durante su fabricación para usarse directamente sobre el vial, aunque los glóbulos rojos procedentes de pacientes o muestras de donantes deben lavarse perfectamente con al menos dos cambios de solución salina, teniendo cuidado en decantar la solución salina completamente entre lavados y de volver a suspender bien los glóbulos rojos cuando se añade la solución salina en el siguiente lavado. Tras el segundo lavado, se decanta la solución salina completamente y se añade suficiente solución salina para realizar una suspensión del 3-4% de glóbulos rojos.

1. Coloque 1 gota de suspensión de hematíes lavados en un tubo de ensayo convenientemente etiquetado. Añada un pequeño volumen de solución salina (5-10 gotas). Centrifugue durante 30 segundos a 3400 rpm (rcf de 900 a 1000); decante la solución salina y seque los tubos.
2. Añada 2 gotas de eluido al botón seco de hematíes de cada tubo.

Clave:

Subrayado = Adición o cambio significativo ▲ = Eliminación de texto

Paula Zucchini
Farmacéutica
M.N. 12.855

HERNÁNDEZ MEDICAL S.A.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

- Mezcle bien los contenidos de todos los tubos e incúbelos durante 10 minutos a una temperatura de 37 ± 1 °C. La incubación puede ampliarse hasta 30 minutos. La incubación durante un tiempo cercano al límite superior puede fomentar la reactividad.
- Tras una incubación adecuada, añada 5-10 gotas de solución de lavado de trabajo al tubo y mézclelo. La adición de 10 gotas de solución de lavado de trabajo puede mejorar la eficacia del proceso de lavado.
- Centrifugue durante 30 segundos a 3400 rpm (rcf de 900 a 1000).
- Decante completamente la solución de lavado de trabajo y seque los tubos.
- Añada 1 o 2 gotas de antiglobulina humana Gamma-clone® a cada botón seco de hematíes o consulte las instrucciones de uso del fabricante de la antiglobulina humana. La adición de 2 gotas de antiglobulina humana puede mejorar la reactividad.
- Mézclelo bien y centrifugue los tubos durante:
 - 1 minuto a 1000 rpm (rcf 100 a 125), o
 - 15 segundos a 3400 rpm (rcf 900 a 1000), o
 - un tiempo adecuado a la calibración de la centrifuga.
- Resuspenda los hematíes agitándolos suavemente y examinando la presencia de aglutinación. Las reacciones negativas pueden examinarse mediante un instrumento de ampliación óptica. Registre los resultados.

Estabilidad de la reacción: Las fases de lavado de la prueba de antiglobulina deben realizarse sin interrupción y el resultado final debe interpretarse inmediatamente una vez finalizado el test.

CONTROL DE CALIDAD:

- Todas las pruebas negativas de antiglobulina deben confirmarse añadiendo hematíes sensibilizados a IgG, como por ejemplo, Checkcell® y repitiendo posteriormente la centrifugación y la lectura. Un resultado de prueba positivo en este punto confirma que se añadió antiglobulina (anti-IgG) activa al sistema de pruebas y que estaba presente cuando la prueba de antiglobulina original se interpretó como negativa.
- Se debe realizar la prueba a una muestra del lavado final en busca de actividad de anticuerpos en paralelo con el eluido. La finalidad de este control es asegurarse de que el anticuerpo presente en el eluido se ha derivado de un estado de unión con los hematíes originales y no está simplemente presente como resultado de un lavado inadecuado. Si hay actividad de anticuerpos presente en el último lavado, el procedimiento de elución deberá repetirse después de un lavado más completo de los hematíes. No obstante, se debe considerar la posibilidad de que la presencia de actividad de anticuerpos en la solución de lavado se deba a la disociación de los anticuerpos de los hematíes durante el lavado. Siempre que exista una razón para sospechar esta posibilidad, se puede minimizar la disociación de anticuerpos usando la solución de lavado de trabajo a una temperatura de 1 a 10 °C para lavar los hematíes antes del procedimiento de elución.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO: Una reacción de aglutinación, que suceda cuando se está realizando la prueba al eluido con respecto a hematíes de los fenotipos adecuados, indica que se ha recuperado el anticuerpo de los hematíes originales, sujeta a pruebas testigo satisfactorias. En pruebas de antiglobulina directa positivas que se sospeche están relacionadas con medicamentos, se debe realizar pruebas al eluido con respecto a hematíes revestidos con el medicamento adecuado (por ejemplo, penicilina) antes de llegar a la conclusión que no se ha producido la elución de ningún anticuerpo a partir de los hematíes.

La ausencia de aglutinación cuando se realiza la prueba al eluido con respecto a hematíes adecuados indica que no se ha recuperado ningún anticuerpo a partir de los hematíes.

LIMITACIONES: La recogida de anticuerpos obtenidos de la elución a partir de hematíes revestidos depende de los siguientes factores variables:

- La cantidad de anticuerpos unidos a los hematíes. Cuando se intenta la elución a partir de hematíes que se han incubado con una muestra de suero o plasma in vitro, esta está relacionada con la muestra con respecto al coeficiente celular en la mezcla de incubación, la constante de unión media del anticuerpo en particular, el número, tipo y accesibilidad de los sitios receptores de antígenos, y a si se ha permitido o no que la reacción alcance un equilibrio.
- El grado de disociación del anticuerpo que se produce durante los procesos de lavado. Esto se puede minimizar con un lavado en solución de lavado de trabajo a entre 1 y 10 °C. En la mayoría de los casos, se pueden realizar eluidos

satisfactorios tras lavar los hematíes con solución de lavado a temperatura ambiente.

- El grado de recombinación de anticuerpos que se produce antes de que el eluido se separe de los hematíes. Este es mínimo con el procedimiento de elución ácida, ya que la separación del eluido de los hematíes se produce con un pH que no es favorable para la asociación de anticuerpos.
- El grado con el que se desnaturaliza la inmunoglobulina por un pH bajo durante la disociación. Este es mínimo si el procedimiento se lleva a cabo tal y como se recomienda.

Otros factores que considerar son los siguientes:

- Los hematíes que presenten una prueba de antiglobulina directa positiva atribuible al complemento de unión solo normalmente producirán un eluido que no muestra reactividad a los anticuerpos.
- La restauración incorrecta del pH del eluido puede provocar hemólisis de los hematíes o puede inhibir la actividad de los anticuerpos en pruebas posteriores.
- Los hematíes conservados a partir de muestras de sangre durante más de 72 horas pueden producir eluidos menos potentes que aquellos extraídos a partir de muestras recientes. Un procedimiento de elución alternativa puede ser preferible para la preparación de eluidos a partir de hematíes conservados.
- Se puede producir una prueba negativa falsa si se emplea el procedimiento de prueba de antiglobulina modificado y la suspensión de hematíes de la prueba no se lava suficientemente para liberarlos de proteína humana antes de su incubación con el eluido, o si el sistema de pruebas se contamina con proteína humana distinta de cualquier anticuerpo disociado durante la fase de elución. Una prueba negativa tras añadir hematíes sensibilizados a IgG (paso 1 del control de calidad) debe alertar al investigador de esta fuente de errores.
- Se ha informado de que el uso de la solución de lavado de baja fuerza iónica suministrada[8] da lugar a la posibilidad de una captación no específica de anticuerpos particularmente fuertes en hematíes negativos para el antígeno, lo que provoca un eluido, que es, en efecto, un positivo falso.
- Cualquier fallo al desarrollar el color azul claro cuando se añade la solución tampón a un eluido recién preparado puede indicar la degradación de la solución tampón y que el eluido debe eliminarse posteriormente. En este caso, confirme que la solución tamponada presenta un color azulado antes de su uso y el eluido deberá repetirse posteriormente.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE RENDIMIENTO: Las soluciones que componen Gamma ELU-KIT II se han probado y se ha demostrado que ofrecen resultados satisfactorios cuando se emplean según el procedimiento detallado en este prospecto de instrucciones para preparar eluidos a partir de hematíes revestidos con una amplia gama de anticuerpos IgG. El rendimiento de este producto va ligado al cumplimiento de los métodos recomendados en este prospecto.

Para obtener más información o para ponerse en contacto con el servicio técnico, llame a Immucor al número 855-IMMUCOR (466-8267).

BIBLIOGRAFÍA:

- Landsteiner K, Miller CP. Serological studies on the blood of primates. II. The blood groups of anthropoid apes. J Exp med 1925; 42:853-862.
- Rubin H. Antibody elution from red cells. J Clin Path 1963; 16:70-73.
- Chan-Shu SA, Blair O. A new method of antibody elution from red blood cells. Transfusión 1979; 19:182-185.
- Kidd P. Elution of an incomplete type of antibody from the erythrocytes in acquired haemolytic anaemia. J Clin Path 1949; 2:103.
- Rekvig DP, Hannestad K. Acid elution of blood group antibodies from erythrocytes. Vox Sang 1977; 33:280-285.
- Melvin JR, Sanfillipo JS, Dobra KW, Cronholm LS, Maldonado. An improved method of acid elution and its application in obstetric and immunohematology. Am J Obstet Gynecol 1981; 141:25.
- van Oss CJ, Beckers D, Engelfriet CP, Absolom DR, Neumann AW. Elution of blood group antibodies from red cells. Vox Sang 1981; 40:367-371.
- Leger RM, Amdt PA, Ciesielski DJ, Garratty G. False-positive eluate reactivity due to the low-ionic wash solution used with commercial acid-elution kits. Transfusión 1998; 38:565-572.

CE

Código del prospecto: IC3021es-4
Revisado: 10/2021

Clave:

Subrayado = Adición o cambio significativo ▲ = Eliminación de texto

Paula Zucchini
Farmacéutica
M.N. 12.855

HERMEDIKA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente