

W.A.R.M.™

Warm Autoantibody Removal Medium

Meio de remoção de autoanticorpos quentes

• IVD

• 10°C

• Não há padrão de potências nos EUA



• Descartar se turvo

## Rx ONLY



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

# 347pt-10

EC REP

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

## Utilização:

Warm Autoantibody Removal Medium Meio de remoção de autoanticorpos quentes

O W.A.R.M. é usado para remover autoanticorpos reativos a quente, de glóbulos vermelhos, de modo a facilitar a resolução de complexidades serológicas.

## Sumário do Teste:

Os autoanticorpos reativos a quente dão origem a problemas serológicos complexos, que podem ser extremamente morosos de resolver, em particular nos doentes que requerem testes de compatibilidade pré-transfusionais. Estes autoanticorpos são produzidos por doentes com anemia hemolítica autoimune a quente (WAIHA), anemia hemolítica imune induzida por drogas (DIHA) e numa determinada população de indivíduos normais sem sintomas clínicos declarados.

Alguns dos autoanticorpos têm uma especificidade única (por exemplo, anti-c, -E, -e, -Jka). Contudo, a maioria dos autoanticorpos encontrados tem especificidades que não podem ser classificadas sem o uso de glóbulos vermelhos raros, tais como células com deleções de Rh ou Ko. Amostras de doentes com autoanticorpos e que necessitam de transfusão podem apresentar: 1) um teste de antiglobulina direto positivo (TAD), devido ao revestimento in vivo dos glóbulos vermelhos autólogos 2) um teste de antiglobulina indireto positivo (TAI) ou pesquisa de anticorpos positiva, devido a autoanticorpos livres no soro. Muitas vezes o autoanticorpo reage com praticamente todos os glóbulos vermelhos reagentes e de dadores. Consequentemente, é difícil verificar se existem aloanticorpos e potencial significado clínico por trás do autoanticorpo.

No passado, têm sido usadas variadas técnicas para auxiliar na deteção de aloanticorpos em amostras com autoanticorpo (s) reativo a quente. Por vezes, pode ser útil a utilização de procedimentos de titulação com glóbulos vermelhos indicadores de variados fenótipos. Contudo, os estudos de titulação assumem que o(s) aloanticorpo(s) é(são) de título mais elevado que o autoanticorpo. Além disso, os resultados das titulações são por vezes difíceis de interpretar.

Os procedimentos de adsorção têm demonstrado ser mais úteis no reconhecimento de aloanticorpo(s). A adsorção com amostras de glóbulos vermelhos indicadores de dador R<sub>1</sub>R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>R<sub>2</sub> e rr, tem sido empregue com sucesso, para determinar a presença de aloanticorpos em doentes com autoanticorpos livres no soro. No entanto, se bem que o processo seja útil, é moroso e difícil. Os glóbulos vermelhos com os fenótipos requeridos não existem em quantidade suficiente na maioria dos laboratórios. Adicionalmente, existe um risco inerente de um aloanticorpo não detetado ser simultaneamente adsorvido pelos glóbulos vermelhos do dador.

Um procedimento de autoadsorção para remover autoanticorpos reativos a quente é a técnica mais apropriada para ajudar na resolução destas complexidades serológicas, particularmente em pacientes que não receberam transfusões recentemente. Os glóbulos vermelhos necessários para a execução dos procedimentos encontram-se na amostra do doente. Visto que o procedimento é uma autoadsorção, existe algum risco de que antígenos estranhos possam remover um aloanticorpo oculto, a não ser que o doente tenha recebido uma transfusão recentemente.

## Legenda:

Sublinhado = Adição ou alteração significativa; ▲ = Eliminação de texto

# W.A.R.M.™

## IMMUCOR



ANTES DE UTILIZAR O PRODUTO, VERIFIQUE O NÚMERO DA INSTRUÇÃO DE USO E A VERSÃO CORRESPONDENTE NA EMBALAGEM DO PRODUTO

PARA OBTER AS INSTRUÇÕES DE USO EM FORMATO IMPRESSO, SEM CUSTO ADICIONAL, CONTATAR O SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR ATRAVÉS DO SAC 0800-707-3855 OU ATRAVÉS DO E-MAIL: fresenius.br@fresenius-kabi.com

Normalmente, um autoanticorpo livre no soro não está presente até que todos os determinantes antigénicos correspondentes nos próprios glóbulos vermelhos do doente estejam saturados com anticorpo. Portanto, os glóbulos vermelhos destes doentes geralmente têm um teste de antiglobulina direto positivo. Os determinantes antigénicos saturados não são muito eficazes na remoção de anticorpos adicionais numa amostra. Para maximizar a eficiência de autoadsorção, devem ser removidas todas ou algumas das proteínas (imunoglobulina IgG) ligadas aos glóbulos vermelhos.

Os autoanticorpos podem ser removidos dos glóbulos vermelhos através do tratamento destes com enzimas, sujeitando-os a altas temperaturas (p. ex., 45-56°C) ou tratando-os com determinados produtos químicos (como o difosfato de cloroquina).<sup>1-6</sup>

O W.A.R.M. é uma solução sulfídrica enzimática, destinada à preparação de glóbulos vermelhos sensibilizados com IgG, para um procedimento de autoadsorção a quente. O reagente é baseado no reagente ZZAP descrito por Branch e Petz<sup>9</sup>, que emprega ditiotreitól e papaina cisteínica ativada para eluição do anticorpo. A preparação de enzima sulfídrica dissocia alguma IgG e C3 dos glóbulos vermelhos sensibilizados. Venyaminov et al.<sup>7</sup> demonstraram que o composto sulfídrico reduz as pontes dissulfido entre as cadeias da molécula de imunoglobulina e como resultado, torna a molécula mais suscetível de ser digerida pela enzima. Estudos posteriores de Branch e Petz<sup>6</sup> confirmam esta hipótese.

Visto que o W.A.R.M. tem uma enzima proteolítica como componente, os glóbulos vermelhos tratados com este reagente também apresentam as características dos glóbulos vermelhos pré-tratados com enzima; ou seja, o aumento dos antígenos Rh e a destruição ou alteração de antígenos sensíveis a enzimas (Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, M, N, etc). Os antígenos no sistema de grupo sanguíneo Kell são desnaturados pelo componente ditiotreitól, com exceção de K<sub>x</sub>, que demonstrou ser potenciado, enquanto K<sub>m</sub> demonstrou não sofrer alteração.<sup>6, 8</sup> Os antígenos nos sistemas LW, Sc, Yt e In e os grupos Knops, Gregory e JMH são também desnaturados.<sup>9</sup>

Após a remoção dos autoanticorpos ligados aos glóbulos vermelhos, estes podem ser usados para autoadsorção. O soro adsorvido pode ser usado em procedimentos de deteção e identificação de anticorpos.

## Princípio do Teste:

Os glóbulos vermelhos de um doente com um TAD positivo e autoanticorpo livre no soro são tratados com W.A.R.M. Este tratamento remove os autoanticorpos, reduzindo deste modo a intensidade da positividade do TAD, libertando posições de antígenos para adsorção. Entretanto a enzima modifica simultaneamente os glóbulos vermelhos. Os glóbulos vermelhos assim preparados são adicionados ao soro autólogo e a mistura é incubada a 37°C. Os auto-anticorpos reativo a quente ligam-se aos antígenos presentes nos glóbulos vermelhos do doente. Esta interação antígeno-anticorpo é potenciada pelo tratamento com enzima dos glóbulos. Após a incubação, a mistura é centrifugada e o soro adsorvido é separado e testado. Comparando os resultados do soro adsorvido com W.A.R.M. com os obtidos com o soro não adsorvido, é normalmente possível confirmar a presença de um autoanticorpo reativo a quente, e detetar ou identificar qualquer aloanticorpo(s) adicional, que possa estar presente.

## Reagentes:

O W.A.R.M. é uma preparação especialmente formulada de ditiotretol e papaína ativada com cisteína num tampão fosfato. Esta preparação foi filtrada e liofilizada. Este produto deve ser reconstituído com água desionizada e agitado antes de ser usado. Ver no rótulo da embalagem o volume para reconstituição.

O W.A.R.M. é fabricado para a Immucor.

## Precauções:

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

Não existe padrão de potência nos EUA.

Armazenar o W.A.R.M. liofilizado e o W.A.R.M. reconstituído a 1-10°C. **Não congelar.** Não utilizar para além do prazo de validade. Não utilizar para além de cinco (5) dias após a reconstituição.

Discard if markedly turbid Rejeitar se visivelmente turvo

Podem notar-se algumas partículas em suspensão e uma leve turvação após a reconstituição. Uma forte turvação do reagente pode indicar a sua deterioração, que pode ser confirmada através de testes serológicos, como descrito na seção **Controlos.**

O formato para a data de validade é AAAA-MM-DD (ano-mês-dia).

## Colheita e Preparação da Amostra:

Colher uma amostra de sangue usando uma técnica de flebotomia correta, com ou sem anticoagulante. Se a amostra é colhida em EDTA, heparina ou sem anticoagulante, o teste deve ser executado no prazo de 48 horas. As amostras que não podem ser testadas imediatamente, devem ser colhidas num anticoagulante/conservante e armazenadas a 1-10°C. As amostras colhidas e armazenadas em condições, que preencham os pré-requisitos para a transfusão, são adequadas para este teste durante o período de validade do anticoagulante em que a amostra foi colhida, e durante o tempo permitido para 'retenção' de amostras.

## Procedimento:

### Material Fornecido

W.A.R.M. em frascos selados

### Outros Materiais Necessários

1. Soro ou plasma a ser adsorvido
2. Soro fisiológico isotônico
3. Tubos de teste e suportes de tubos
4. Pipetas
5. Centrífuga serológica com capacidade de desenvolver uma Força Relativa de Centrifugação (RCF) de 900-1000 x g
6. Estufa ou banho de água a 37±2°C
7. Água desionizada
8. Marcador
9. Cronómetro

### Método de Teste:

1. Rotular os tubos a utilizar no procedimento de adsorção.
2. Reconstituir um frasco de W.A.R.M. através da adição de 5 mL de água desionizada. Misturar bem.
3. Adicionar 1 volume de glóbulos vermelhos concentrados do doente ao tubo. Não é necessário lavar os glóbulos vermelhos antes do tratamento com W.A.R.M.
4. Adicionar 2 volumes de W.A.R.M. reconstituído ao tubo (por exemplo 1 mL de glóbulos vermelhos a 2 mL de W.A.R.M.).
5. Misturar bem e incubar a 37±2°C durante aproximadamente 30 minutos.
6. Lavar os glóbulos vermelhos tratados com W.A.R.M. com solução salina, no mínimo três (3) vezes. Remover o máximo de solução salina após cada lavagem.
7. Adicionar um volume igual de soro ou plasma do doente aos glóbulos vermelhos concentrados tratados com W.A.R.M.
8. Misturar bem e incubar durante 30-60 minutos a 37±2°C. A incubação durante 60 minutos pode proporcionar uma maior adsorção, do que por um período 30 minutos.

**Nota:** Devido à fragilidade de certos glóbulos vermelhos, pode ser observada hemólise após o tratamento. O tratamento de tais

glóbulos vermelhos com W.A.R.M. deve ser limitado a trinta (30) minutos.

9. Centrifugar durante aproximadamente dois (2) minutos ou até os glóbulos vermelhos estarem bem compactados.
10. Colher o soro (plasma) adsorvido usando uma pipeta.
11. Testar uma alíquota da amostra adsorvida a 37±2°C e na fase de antiglobulina para determinar se todo o autoanticorpo reativo a quente foi removido. (Ver **Interpretação dos Resultados.**) Se os resultados indicarem que a adsorção foi insuficiente, repetir os passos 1-10 usando uma nova alíquota de glóbulos vermelhos do doente. Se a adsorção for completa, a amostra adsorvida está pronta para ser utilizada na deteção e identificação de anticorpos.

### Controlo de Qualidade:

A atividade do W.A.R.M. pode ser verificada, após a reconstituição, para assegurar a eficácia da solução. O W.A.R.M. pode ser considerado suficientemente ativo se puder ser demonstrado que os glóbulos vermelhos tratados mostram um aumento do antigénio Rh e desnaturação de um antigénio do sistema Kell. É recomendável que um reagente de glóbulos vermelhos de fenótipo conhecido seja tratado com W.A.R.M., para demonstrar a potenciação e desnaturação dos antigénios com anticorpos apropriados.

### Interpretação dos Resultados:

#### ADSORÇÃO COMPLETA

É conseguida uma adsorção completa dos autoanticorpos reativos a quente quando o soro adsorvido deixa de reagir com:

- a. os glóbulos vermelhos do doente tratados com W.A.R.M.; e
- b. glóbulos vermelhos reagentes que não possuem os antigénios para os quais os aloanticorpos adicionais são dirigidos.

#### ADSORÇÃO INCOMPLETA

Se o autoanticorpo reativo a quente não foi completamente removido, ou se não for possível a sua adsorção pelos glóbulos vermelhos tratados com W.A.R.M., há aglutinação quando o soro é testado como referido anteriormente em a ou b.

**NOTA:** A adsorção completa de autoanticorpos reativos a quente pode nem sempre ser possível. De qualquer modo, em alguns casos, a adsorção apenas parcial do autoanticorpo pode ser suficiente para revelar aloanticorpo(s) que possam também estar presentes.

### Limitações:

Marsh e colaboradores<sup>10</sup> descreveram que aproximadamente um (1) em duzentos e cinquenta (250) indivíduos imunizados têm autoanticorpos dirigidos contra uma especificidade dentro do sistema de grupo sanguíneo Kell. Uma vez que o tratamento com W.A.R.M. destrói ou desnatura os antigénios do sistema Kell, os autoanticorpos dentro deste sistema não vão ser adsorvidos. A especificidade do autoanticorpo do sistema Kell pode ser confirmada por resultados negativos quando se testa um eluato preparado a partir de glóbulos vermelhos do doente, contra um painel de glóbulos vermelhos reagentes tratados com W.A.R.M.

Alguns autoanticorpos são dirigidos contra antigénios sensíveis a enzimas como o M ou Xg<sup>a</sup>.<sup>11</sup> Uma vez que o tratamento com W.A.R.M. destrói estes antigénios, a autoadsorção usando glóbulos vermelhos tratados com W.A.R.M. não irá remover o autoanticorpo correspondente.

O uso de glóbulos vermelhos tratados com W.A.R.M. para tipagem antigénica não é recomendado, uma vez que o anti-soro comercial pode ou não ser específico quando testado deste modo.

É possível que por vezes um autoanticorpo reativo a quente não seja completamente adsorvido pelos glóbulos vermelhos tratados com W.A.R.M. Como resultado, pode não ser possível determinar uma especificidade definitiva para as reações obtidas após a adsorção. Além disso, mesmo a adsorção completa de autoanticorpos reativos a quente não garante que os anticorpos que permanecem no soro adsorvido possam ser facilmente identificados.

Testes de compatibilidade realizados em soro autoadsorvido W.A.R.M. não podem ser considerados compatíveis, uma vez que os anticorpos removidos por procedimentos de autoadsorção W.A.R.M. são ativos a 37°C. Qualquer procedimento de autoadsorção a quente serve apenas como auxílio na deteção e identificação de aloanticorpos ocultos potencialmente mascarados por um autoanticorpo reativo a quente.

Os resultados dos procedimentos de autoadsorção executados em amostras de doentes que fizeram transfusões de sangue recentemente, devem ser interpretados com cuidado, pois existe o risco potencial de ser adsorvido um aloanticorpo clinicamente significativo, pelos glóbulos vermelhos transfundidos.

### Legenda:

Sublinhado = Adição ou alteração significativa; ▲ = Eliminação de texto

### Caraterísticas Específicas de Desempenho:

A capacidade do W.A.R.M. para remover anticorpos ligados a glóbulos vermelhos sensibilizados é confirmada testando cada lote de material através do método do folheto informativo. Além disso, cada lote é testado serologicamente para demonstrar a atividade do enzima e agentes redutores. O desempenho deste produto depende da aplicação dos métodos recomendados no folheto informativo.

### Bibliografia:

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: a new technique for typing red blood cells with a positive direct antiglobulin test. *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 ME. Autoagglutination dispersal utilizing sulphhydryl compounds. *Transfusion* 1978;18:353.
6. Branch DR, Petz LD. 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. Brecher ME, ed. Technical manual. 15<sup>th</sup> ed. Bethesda MD: 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<sup>th</sup> ed. Durham, NC: Montgomery Scientific Publications, 1998.



Código do Folheto Informativo **347pt-10**  
Rev 3/17

### APRESENTAÇÃO

W.A.R.M. - 10 x 5 mL

### IMPORTADO / DISTRIBUÍDO

**Fresenius HemoCare Brasil Ltda.**

Rua Roque Gonzáles, 128 - Jd. Branca Flor

Itapeceira da Serra - SP CEP.: 06855-690

CNPJ: 49.601.107/0001-84

Inscr. Est.: 370.023.234.119

Farm. Resp.: Mary M. Yamauchi CRF-SP - 13.956

SAC: 0800-707-3855

Legenda:

Sublinhado = Adição ou alteração significativa; ▲ = Eliminação de texto