

# PROTEÍNA C REACTIVA

## Uso Previsto:

Inmunoensayo para la determinación cuantitativa in vitro de la Proteína C Reactiva (PCR) en suero y plasma humano (ligado a enzimas).

## Resumen:<sup>1-8</sup>

La proteína C reactiva (PCR) es la proteína de fase aguda clásica en las reacciones inflamatorias. Es sintetizada por el hígado y consta de cinco cadenas polipeptídicas idénticas que forman un anillo de cinco miembros con un peso molecular de 105000 daltons. La PCR es el más sensible de los reactantes de fase aguda y su concentración aumenta rápidamente durante los procesos inflamatorios. La PCR complejada activa la vía clásica del complemento. La respuesta de la PCR precede con frecuencia a los síntomas clínicos, incluida la fiebre.

En individuos sanos normales, la PCR es una proteína traza con un rango de hasta 5 mg/L. Tras el inicio de una respuesta de fase aguda, la concentración sérica de PCR aumenta rápida y ampliamente. El aumento comienza en un plazo de 6 a 12 horas y el valor máximo se alcanza en un plazo de 24 a 48 horas. Los niveles superiores a 100 mg/L se asocian a estímulos graves como traumatismos importantes e infecciones graves (sepsis). La respuesta de la PCR puede ser menos pronunciada en pacientes que padecen una enfermedad hepática.

## Principio de la Prueba:

Duración total del ensayo: 40 minutos.

- Se combinan la muestra, los micropocillos recubiertos con Anti-PCR y el Anti-PCR marcado con enzimas.
- Durante la incubación, se permite que la PCR presente en la muestra reaccione simultáneamente con los dos anticuerpos, con lo que las moléculas de PCR quedan intercaladas entre la fase sólida y los anticuerpos ligados a enzimas.
- Tras el lavado, se genera un complejo entre la fase sólida, la PCR presente en la muestra y los anticuerpos ligados a la enzima mediante reacciones inmunológicas.
- A continuación, se añade una solución de sustrato que es catalizada por este complejo, dando lugar a una reacción cromogénica. La reacción cromogénica resultante se mide como absorbancia
- La absorbancia es proporcional a la cantidad de PCR en la muestra.

## Materiales Proporcionados:

- Microplaca recubierta, 8 x 12, 96 pocillos, recubierta previamente con anticuerpos anti-PCR.
- Conjugado enzimático, 1 vial, 11 ml de HRP. Listo para usar.
- Calibradores, 6 viales de 1 ml cada uno, listos para usar; con concentraciones A=0.0, B=5, C=20, D=50, E=150, F=300 mg/L.
- Diluyente de muestra concentrado, 1 vial de 11 ml, listo para usar.
- Sustrato, 1 vial de 11 ml, listos para usar.
- Solución de parada, 1 vial de 6 ml.
- Concentrado de solución de lavado, 1 vial de 25 ml (concentrado 40X), Contiene fosfato, NaCl y Tween-20.
- Inserto: 1 copia.
- Tapa Placa: 1 pieza.

## Materiales Requeridos (Pero no provistos):

- Lector de microplacas con capacidad de absorción de longitudes de onda de 450 nm y 630 nm.
- Lavador de microplacas.
- Incubadora.
- Sacudidor de platos.
- Micropipetas con una precisión menor a 1,5%.
- Papel absorbente.
- Agua desmineralizada.

## Precauciones y Advertencias:

- Mezclar bien la muestra en los pocillos mediante agitación y eliminar las burbujas.
- Realice las pruebas lejos de malas condiciones ambientales. P.ej. aire ambiente que contiene gas corrosivo de alta concentración, como ácido hipoclorito de sodio, alcalino, acetaldehído, etc., o que contenga polvo.
- Lave los pocillos 5 veces por completo. Cada pocillo debe llenarse completamente con solución de lavado. Sin embargo, evite que la fuerza en el llenado sea demasiado intensa para evitar desbordamiento. En cada ciclo de lavado, seque los líquidos de cada pocillo.
- Golpee la microplaca sobre papel absorbente para eliminar las gotas de residuos de agua.
- Se recomienda a lave la microplaca con un lavador automático de tiras de microplacas.
- No eliminar adecuadamente la solución adherida en la aspiración o decantación durante el lavado pueden dar resultados deficientes o falsos.
- No utilice reactivos más allá de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- No mezcle ni utilice componentes de kits con diferentes códigos de lote.
- Si se utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para lograr resultados reproducibles.
- Asegúrese de que la parte inferior del plato esté limpia y seca.

- Asegúrese de que no haya burbujas en la superficie del líquido antes de leer el plato.
- El sustrato y la solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.
- La humedad atmosférica en placas frías reduce significativamente su vida útil.
- Después de obtener el número requerido de tiras, la placa debe colocarse en la bolsa de plástico con cierre con desecantes para minimizar la exposición al aire húmedo.
- Usar el pozo en blanco para corregir el cero punto de lectura si se utiliza un lector de longitud de onda única. Si los lectores de doble longitud de onda con 450nm y 630nm son usados, no hay necesidad de corregir el punto cero.

## Almacenamiento:

- Almacenar a 2-8°C.
- Coloque los pocillos no utilizados en la bolsa de aluminio con cierre hermético y regréselo a 2-8°C, bajo cuyas condiciones los pozos permanecerán estables por 2 meses, o hasta que la fecha de caducidad.
- Selle y devuelva los calibradores no utilizados a 2-8°C, en cuyas condiciones la estabilidad se mantendrá durante 1 mes, para un uso prolongado, almacene los calibradores y congele a -20°C. Evite múltiples ciclos de congelación y descongelación.
- Selle y devuelva todos los demás reactivos no utilizados a 2-8°C, en cuyas condiciones la estabilidad se mantendrá durante 2 meses, o hasta la fecha de caducidad etiquetada.

## Recolección y Preparación de Muestras:

- Recoger muestras de suero de acuerdo con las prácticas de laboratorio correctas.
- Las muestras de suero y plasma humano pueden analizarse mediante este procedimiento, separe suero del coágulo tan pronto como sea posible para evitar la hemólisis.
- Plasma Li-heparina, K2-EDTA y K3-EDTA.
- Los tipos de muestras enumerados se probaron con una selección de tubos de recogida de muestras que estaban disponibles comercialmente en el momento de la prueba, es decir, no se probaron todos los tubos disponibles de todos los fabricantes. Los sistemas de recogida de muestras de distintos fabricantes de pueden contener materiales diferentes que podrían afectar a los resultados de la prueba en algunos casos. Al procesar muestras en tubos primarios (sistemas de recogida de muestras), siga las instrucciones del fabricante del tubo.
- Las muestras cubiertas se pueden almacenar hasta 48 horas a 2~8°C.
- Las muestras conservadas durante más tiempo se pueden congelar a -20 °C y evitar la congelación de fusión repetida.
- Centrifugar muestras que contengan precipitados antes de realizar el ensayo. No utilice muestras inactivadas por calor. No utilice muestras y controles estabilizados con azida.
- Asegúrese de que las muestras, los calibradores y los controles de los pacientes estén a temperatura ambiente. Temperatura (18-25°C) antes de la medición.
- Los sedimentos y los sólidos en suspensión en las muestras pueden interferir con el resultado de la prueba que debe ser eliminado por centrifugación. Asegúrese de que la formación completa del coágulo en las muestras de suero ha tenido lugar antes de la centrifugación.

## Control de Calidad:

Cada laboratorio debe tener muestras de controles en los niveles bajo, normal y rango elevado para monitorear el rendimiento de la prueba. Debe haber controles tratados como desconocidos y valores determinados en cada procedimiento de prueba realizado.

El requisito de controles recomendados para este ensayo es utilizar un control por separado y probarlos junto las muestras dentro de la misma corrida. El resultado es válido si los valores de control están dentro de la concentración rangos impresos en las etiquetas.

## Solución de Lavado (Dilución 40X):

Diluya 25 ml de Solución de Lavado Concentrada en 975 ml de agua desionizada, para un volumen final de 1000 ml. Estable por 2 meses a temperatura ambiente.

## Preparación de reactivos:

### Dilución de concentrado diluyente de muestra:

Diluya el contenido del concentrado diluyente de muestra hasta 100 ml con agua destilada o desionizada en un recipiente de almacenamiento adecuado. Almacene la solución diluida a 2-8 °C.

### Dilución de la muestra del paciente:

Pipetee 10 µL de muestra de paciente en tubos de dilución de vidrio o plástico separables, a continuación, añada 990 µL de concentrado diluyente de muestras y mezcle cuidadosamente.

Advertencia: no almacene las muestras diluidas durante más de 8 horas.

## Procedimiento de Prueba:

- Utilice sólo el número de pocillos necesarios e identifique los pocillos de las microplacas para cada calibrador y muestra a realizar. Todos los calibradores y los controles deben establecer duplicado.
- Agregue 100 µL de enzima conjugada a cada pocillo.
- Agregue 10 µL de calibradores o muestras a cada pocillo (no diluya los calibradores).

- Agite suavemente la microplaca durante 30 segundos para mezclar.
- Cubra la placa con la tapa placa e incube a 37°C durante 30 minutos.
- Desechar el contenido de la microplaca por decantación o aspiración. Si decanta, golpee y seque la placa con papel absorbente.
- Agregue 350 µL de solución de lavado, 10 segundos por cada lavado, decante (golpee y seque) o aspire. Repetir 4 veces adicionales para un total de 5 lavados. Un lavador automático de tiras de microplacas puede ser usado. Al final del lavado, invierta la placa y elimine cualquier residuo solución de lavado sobre papel absorbente.
- Dispense 100 µL de sustrato en cada pocillo.
- Agite suavemente la microplaca durante 30 segundos para mezclar.
- Cubra la placa con la tapa placa e incube a temperatura ambiente (18-25 °C) en la oscuridad durante 10 minutos.
- Agregue 50 µL de solución de parada a cada pocillo.
- Agite de 15 a 20 segundos para mezclar el líquido dentro de los pocillos. Importante: Asegúrese de que el color cambie a amarillo por completo.
- Lea la absorbancia de cada pozo dentro de los primeros 30 minutos a 450nm (usando 620 a 630nm como longitud de onda secundaria para minimizar las imperfecciones del pocillo) en un lector de microplacas.

#### Cálculo:

- Registre la absorbancia obtenida de la impresión del lector de microplacas.
- Calcule la absorbancia media de cualquier medición duplicada y utilice la media para el siguiente cálculo.
- Trace el logaritmo común de la absorbancia frente a la concentración en mg/L para cada calibrador.
- Dibuje la curva que mejor se ajuste a través de los puntos trazados en papel cuadrículado lineal.

#### Intervalos de Referencia:

Los datos que figuran a continuación son sólo para demostración, cada laboratorio debe realizar y utilizar sus intervalos de referencias.

Muestra	Valor (mg/L)	Absorbancia
Calibrador A	0	0.012
Calibrador B	5	0.154
Calibrador C	20	0.407
Calibrador D	50	0.985
Calibrador E	150	1.711
Calibrador F	300	2.693
Control 1	37.39	0.742
Control 2	118.6	1.483
Paciente	33.08	0.659

#### Limitaciones e Interferencias:

Los resultados de los estudios muestran que las siguientes sustancias no interfieren con este procedimiento de proteína C reactiva.

El criterio de no interferencia significativa es la recuperación dentro del 10% del valor inicial.

Sustancias	Concentraciones que no interfieren (mg/L)
Bilirrubina	< 600 µmol/L o < 35 mg/dL
Hemólisis	< 600 µmol/L o < 36 mg/dL
Lipemia	< 1200 mg/dL

Para fines de diagnóstico, los resultados siempre deben evaluarse junto con la historia clínica del paciente, el examen clínico y otros hallazgos.

#### Límites y Rangos.

Rango de medición:

0.1- 300 mg/L (definido por el límite inferior de detección y el máximo de la curva maestra). Los valores por debajo del límite inferior de detección se notifican como < 0,1 mg/L. Los valores por encima del rango de medición se notifican como > 300 mg/L.

Límite inferior de detección: 0,1 mg/L

El límite de detección representa el nivel más bajo de analito que puede distinguirse de cero. Se calcula como el valor que se encuentra dos desviaciones estándar por encima del del estándar más bajo (calibrador maestro, estándar 1 + 2 SD, estudio de repetibilidad, n = 21).

#### Valores Esperados:

< 5.0 mg/L.

Los valores esperados pueden variar con la edad, el sexo, la dieta y la ubicación geográfica. Cada laboratorio debe determinar sus propios valores esperados de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio.

#### Datos de Rendimiento Específicos:

A continuación, se ofrecen datos de rendimiento representativos. Los resultados obtenidos en laboratorios individuales pueden diferir.

#### Precisión:

La precisión se determinó utilizando reactivos RJL, sueros humanos agrupados y controles en un protocolo modificado (EP5-A) del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute): 2 veces al día durante 20 días (n = 40). Se obtuvieron los siguientes resultados:

Muestra	Media mg/L	Repetibilidad*		Precisión Intermedia	
		SD mg/L	CV %	SD mg/L	CV %
Suero Humano 1	3.24	0.28	8.65	0.288	8.89
Suero Humano 2	38.61	2.807	7.27	3.131	8.11
Suero Humano 3	136.93	7.723	5.64	8.777	6.41
Control Universal 1	35.48	2.416	6.81	2.586	7.29
Control Universal 2	117.47	6.296	5.36	8.047	6.85

Repetibilidad\* = Precisión dentro de una misma corrida.

#### Comparación de Métodos:

Una comparación del ensayo RJL PCR (y) con el ensayo Roche Tina-quant Gen.3 PCR (x) utilizando muestras de suero clínico dio las siguientes correlaciones (mg/L):

Número de muestras medidas: 106

Regresión lineal:

$y = 0,9744x + 0,296$

$r = 0,9733$

Las concentraciones de las muestras estaban comprendidas entre aprox. 0,7 y 292 pg/mL.

Sensibilidad funcional:

0,2 mg/L

La sensibilidad funcional es la concentración de analito más baja que puede medirse de forma reproducible con un CV de precisión intermedio del 20 %.

#### Referencias:

1. Greiling, H., Gressner, A.M., eds. (1995). Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie, 3rd ed. Stuttgart/New York: Schattauer Verlag, 234-236.
2. Thomas, L. (2008). Labor und Diagnose, 7. Auflage, TH Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main, 1010-1021.
3. Burtis, C.A., Ashwood, E.R., eds. (2001). Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, 5th ed. Pa: WB Saunders Co, 332-333.
4. Thomas, L., Messenger, M. (1993). Pathobiochemie und Labordiagnostik d'Entzündung. Labmed 17, 179-194.
5. Young, B., Gleeson, M., Cripps, A.W. (1991). C-reactive protein: A critical review. Pathology 23, 118-124.
6. Wasunna, A., Whitelaw, A., Gallimore, R., et al. (1990). C-reactive protein and bacteria infection in preterm infants. Eur J Pediatr 149(6):424-427.
7. Vergis, N. (2007). Should CRP be used as a marker of infection in patients with liver cirrhosis? Clin Lab Int 6, 12-13.
8. Mackenzie, I., Woodhouse, J. (2006). C-reactive protein concentrations during bacteraemia: a comparison between patients with and without liver dysfunction. Intensive Care Medicine 32, 1344-1351.

