

RESUMEN Y APLICACIÓN

La proteína C Reactiva es un alfa-globulina con masa molecular de aproximadamente 110,000 a 140,000 Daltons, y está compuesta por 5 subunidades idénticas, las cuales están ensambladas de forma no-covalente como un pentámero cíclico. La PCR se sintetiza en el hígado y normalmente está presente como trazos de suero o plasma en niveles menores a 0.3 mg/dl. La PCR es una proteína de fase exacta.

A pesar de la detección de niveles elevados de PCR en el cuerpo humano, esto no representa una enfermedad en particular. Es un indicador útil de procesos inflamatorios. Adicionalmente, la medición de PCR por ensayos altamente sensibles puede agregar valores predecibles de otros marcadores cardíacos como mioglobina, Creatin Kinasa, Troponina I y T, que son usados para evaluar el riesgo de problemas cardiovasculares y vasculares periféricos.

Una inflamación en las arterias puede jugar un papel importante en problemas de corazón y el riesgo de complicaciones para aquellos que ya han sufrido un evento cardíaco.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El Inmunoensayo PCR ELISA es una prueba ELISA de fase directa en sándwich. Las muestras y conjugados anti PCR son agregados a las paredes de los micropozos. El PCR presente del paciente se une a los anticuerpos anti PCR presentes en el micropozo. La proteína que no se haya impregnado se desecha con la solución de lavado buffer. Después de la adición del sustrato, la intensidad del color es proporcional a la concentración del color CRP en las muestras. Una curva estándar se genera entonces con la intensidad de color en las diferentes concentraciones de CRP.

MATERIALES PROVISTOS	96 Pruebas
1. Doce filas de ocho pozos impregnados con CRP MAb	12x8x1
2. 6 Viales Estándar CRP listos para usarse	0.25 ml
3. Solución Enzima Conjugada (1 vial)	12 ml
4. Solución Sustrato TMB (1 vial)	12 ml
5. Solución de frenado (1 vial)	12 ml
6. Diluyente de la muestra (2 vial)	25 ml
7. Solución de lavado concentrado 20X (1 vial)	25 ml

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector Microelisas con lente a 450 nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor.
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadriculado.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Almacene el equipo a 2° - 8°C. Mantenga las tiras de pocillos selladas en la bolsa de aluminio. Todos los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre y cuando las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

Recolecte sangre por venopunción. Separe el suero por centrifugación. **EVITE AGREGAR ANTI-COAGULANTES A LA MUESTRA.** En caso de no hacer el examen inmediatamente, refrigere la muestra 2°- 8°C o congele.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Almacene el Equipo a temperatura de 2° - 8°C excepto el concentrado de lavado y la solución de frenado. Permita que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (18°- 25 °C) antes de su uso.
2. Para el 1X Buffer de Lavado: Prepare el buffer agregando los componentes de la botella de 25 ml, 20X a 475 ml. de agua destilada o desionizada. Almacene a temperatura ambiente.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Traiga las muestras y reactivos del equipo a temperatura ambiente (16° - 26°C) y mezcle generosamente.
2. Diluya las muestras del paciente y controles 1:100 agregando 5 µl de muestras a los 495 µl de Diluyente de la Muestra (los estándares están listos para usarse).
3. Agregue 10 µl de Estándar, muestras diluidas y controles a los respectivos micropozos.
4. Agregue 100 µl de enzima conjugada a los micropozos. Tape, quite burbujas del líquido y mezcle.
5. Incube por 60 minutos a temperatura ambiente (18° - 26°C).
6. Remueva el líquido de los micropozos. Lave tres veces con 300 µl con 1X solución de lavado. Seque con papel absorbente.
7. Agregue 100 µl de sustrato TMB a los micropozos.
8. Incube por 15 minutos a temperatura ambiente.
9. Agregue 50 µl de solución de frenado en los micropozos. Agite la placa para mezclar generosamente la solución.
10. Lea la Absorbancia con un lector ELISA a 450 nm después de transcurridos 15 minutos de haber agregado la solución de frenado.

CÁLCULO DE RESULTADOS

La curva Estándar se construye como sigue:

1. Revise el valor CRP estándar para cada vial. Este valor puede variar entre lote y lote. Asegúrese revisar siempre este valor.
2. Para construir una curva Estándar, grafique la absorbancia de los Estándares CRP (eje vertical), contra las concentraciones Estándar, (eje horizontal) en un papel gráfico. Haga curva con los datos obtenidos.
3. Lea la absorbancia por controles y cada muestra desconocida de la curva. Tome nota del valor de cada control y muestra desconocida.
4. Los valores obtenidos en las muestras de pacientes y suero control deberán ser multiplicados por el factor de dilución de 100 para obtener los resultados de PCR en mg/l.
5. Las muestras de pacientes con concentraciones mayores a 10mg/l deberán ser diluidas. Una dilución 10 - posterior a la dilución 100 (dilución total 1:1,000) generará valores PCR finales que deberán ser multiplicados por 1,000 para obtener resultados finales en mg/l.

Ejemplo de curva estándar

	OD 450 NM	Conc. pg/ml
Std 1	0.02	0
Std 2	0.23	0.005
Std 3	0.49	0.01
Std 4	1.01	0.025
Std 5	1.66	0.05
Std 6	2.40	0.1

VALORES ESPERADOS

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales basados en la población de pacientes. Sin embargo, basándonos en literatura de individuos sanos, esperamos valores en los rangos de 0.2 a 10 mg/l, donde el 90% de individuos aparentemente sanos tienen niveles de PCR <3 mg/l y solo 1% tiene niveles de >10 mg/l.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. Los resultados obtenidos usando este equipo son un apoyo en diagnóstico y deberán ser interpretados en relación a la historia clínica del paciente, estado físico y otros diagnósticos.
2. No use azida de sodio como preservante, ya que inhibe la actividad enzimática.

PERFORMANCE

1. Correlación con un kit ELISA de referencia:

Un total de 84 muestras fueron evaluadas con nuestro equipo y con otra marca comercial de metodología ELISA y se encontró lo siguiente:

Correlación	0.93
Pendiente	0.72
Intercepción	0.911

2. Precisión:

Intra Ensayo

Suero	N° de Réplicas	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
1	16	0.04	0.0002	5.06
2	16	0.021	0.0011	5.28
3	16	0.008	0.0008	9.59

Inter Ensayo

Suero	N° de Réplicas	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
1	10	0.004	0.0003	8.51
2	10	0.009	0.0007	8.34
3	10	0.020	0.0016	7.95

RECUPERACIÓN

Las cantidades conocidas de PCR fueron agregadas a suero conteniendo bajas cantidades de PCR.

Valor esperado	Recuperación	% de Recuperación
0.005	0.0053	106
0.0125	0.0102	82
0.025	0.0236	94

LINEARIDAD

A dos diferentes muestras de pacientes se diluyó Calibrador "0" a 1:2, 1:4 y 1:8. Se corrieron valores de PCR y los resultados fueron corregidos con el factor de dilución. Estos son los resultados:

Suero	Valor original	% de Recuperación
		1:2 1:4 1:8
1	0.32	94 100 100
2	0.041	93 88 117
3	0.095	94 84 82

REFERENCIAS

1. Schultiz, D.R., and Arnold P.L. Properties of four acute phase proteins: C Reactive protein, serum amyloid A protein, glycoprotein and fibrinogen. *Aminers in Arthritis and Rheumatism* 20: 129-147, 1990
2. Kindmark, C.O.: The concentration of C reactive Protein in Sera from Healthy individuals. *Scand J Clin Lab Invest.* 29: 407-411 1972
3. Dowling, P., and Cook, S: Immune events in demyelinating disease in Wolfgang F., Ellison, G.W., Stevens J.G., and Andrew, J.M (eds) *Multiple sclerosis*. Academic Press Inc. New York, 269, 277, 1972.
4. Yudkin, J.S et al. C - reactive protein in Healthy Subjects: Association with obesity, Insulin Resistance, and Endothelial Dysfunction, A potential role for cytokines originating from Adipose tissue. *Arterioscler throm Vasc. Biol* 19:972-8
5. Kushner, I, Rzewnicki, D.L: The acute phase response: General aspects. *Bailliere's Clinical Rheumatology* 8: 513, 530, 1994
6. Macy, E.M., Hayes, T.E., and Tracy, R.P. Variability in measurement of C Reactive protein in healthy subjects: implications for reference interval and epidemiological applications. *Clin Chem* 43: 1:52-58, 1997
7. Hedlund, P. Clinical and experimental studies on C Reactive protein /acute phase protein). *Thesis Acta Med. Scand.*, 128 (suppl, 361) 1-71, 1961
8. Hedlund, P. The appearance of acute phase protein in various diseases. *Acta Med. Scand.*, 128 579-801 1947.
9. Morley, J.J., Kushner, L. Serum C Reactive Protein levels in Kushner, Volanakis, and J.E., and Gerwiutz, H ads. C Reactive Protein and the plasma Protein response to tissue Injury. *Annals of N.Y., Acad. Sci*, 389, 406-417, 1982.