

INTENCIÓN DE USO

La determinación cuantitativa de la concentración de Proteína C Reactiva en suero humano, plasma o sangre entera por un análisis de microplato inmunoenzimométrico.

RESUMEN Y APLICACIÓN

La Proteína C Reactiva ha sido tradicionalmente usada para diagnosticar y monitorear la inflamación aguda. Fue nombrada así por su habilidad de enlazar y precipitar los polisacáridos C del neumococo. Esto es una alfa globulina (MW 110-140 kD). La PCR está sintetizada en el hígado y es presentada normalmente como un componente del rastro en el suero o plasma a niveles menos de 0.3 mg/dl. Tiene numerosas funciones psicológicas similares a las inmunoglobulinas y actúa como un mecanismo de defensa huésped.

La PCR es una fase aguda de las proteínas, los niveles circulatorios de los cuales en una subida general, responde inespecíficamente a una amplia variedad de decesos. Estas incluyen infecciones por bacteria, fase aguda de artritis reumatoide, abscesos abdominales e inflamación en el conducto biliar. Los altos niveles de PCR puede también encontrarse en pacientes con alguna infección viral, tuberculosis infecciones hepáticas agudas y muchas otras necróticas e infecciones inflamatorias, víctimas de quemaduras y traumas quirúrgicos. A pesar de que los elevados niveles de PCR no son indicativos de alguna infección en particular, el crecimiento acelerado de PCR nos indica una inflamación en proceso. Los niveles de PCR crecen en la circulación dentro de las 24-48 horas siguientes y agudiza el daño al tejido fino, alcanzando un pico (arriba de 1000 veces el nivel constitutivo) y decrece con la resolución del trauma o inflamación. Los niveles elevados de PCR pueden durar por varios días antes de regresar a los niveles normales.

Entonces, los niveles elevados de PCR son asociados siempre con cambios patológicos, los ensayos de PCR proveen de información útil para el diagnóstico y monitoreo terapéutico de la inflamación en proceso e infecciones asociadas. La medición de PCR por ensayos de PCR de alta sensibilidad adherido a valores predecibles de otros marcadores cardiacos como Mioglobulina, CK-MB, cTnI y cTnT para determinar el riesgo de infecciones cardiovasculares e infección vascular periférica.

Rifai y Ridker –en un estudio para CDC- han propuesto que los puntos de decisión médica establecidos por un prospectivo estudio epidemiológico son usados para interpretar los resultados PCR individuales de los pacientes en riesgo grave por infección cardiovascular. Esto es similar al acercamiento usado por el Programa Nacional de Educación del Colesterol por lípidos de sangre que requiere este ensayo para que la PCR sea estandarizada para proveer resultados comparables. Con el advenimiento de metodologías sensitivas como la ELISA el uso de los ensayos de PCR de alta sensibilidad se han vuelto más rutinarios para ayudar en la determinación de inflamación debido a trauma cardiovascular. Desde que la PCR es inespecífica para algo en particular, los resultados de los ensayos hs-PCR de Monobind pueden ser usados en conjunto con otros fundamentos históricos, psicológicos y patológicos.

En esta metodología, el Calibrador PCR, la muestra del paciente o control es agregado al streptavidin cubierto al pozo. El monoclonal biotinilado y anticuerpos de enzimas etiquetados (directo contra distintos y diferentes epitopes de PCR) son agregados y mezclados los reactivos. La reacción entre los varios anticuerpos y PCR nativos forman un emparedado complejo que enlaza con el streptavidin cubierto en el pozo.

Después de la terminación del período requerido de la incubación, la conjugación encuadrada del anticuerpo PCR-enzima es separada de la conjugación desatada de PCR - enzima por la aspiración o la decantación. La actividad de la enzima presente en la superficie del pozo es cuantificada por la reacción con un sustrato conveniente para producir luz. El empleo de varias referencias del suero de la concentración conocida de los niveles de la PCR permite la construcción de un gráfico de la actividad y de la concentración. De la comparación a la curva de la reacción a cierta dosis, la actividad de un espécimen desconocido se puede correlacionar con la concentración PCR.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

Los reactivos que son esencialmente requeridos para un cierto ensayo inmunoenzimométrico incluyen alta afinidad y anticuerpos específicos (enzima e inmovilizado) con diferentes y reconocimiento distinto epitope, en exceso y antígeno nativo. En este procedimiento, la inmovilización toma lugar durante el ensayo en la superficie del micropozo a través de la interacción de streptavidin recubierto en el pozo y exógeno agregado monoclonal biotinilado anticuerpo anti-PCR.

Mezclando el anticuerpo monoclonal biotinilado, anticuerpo etiquetado y un suero que contienen el antígeno nativo, la reacción de la competición resulta entre el antígeno nativo y los anticuerpos, sin la competencia para formar un emparedado complejo soluble. Simultáneamente, el complejo es depositado en el pozo a través de la reacción de alta afinidad de streptavidin y anticuerpo biotinilado. Después de que se logre el equilibrio, anticuerpo-limite la fracción es separado del antígeno desatado por la decantación o la aspiración. La actividad enzimática en anticuerpo-limita la fracción es directamente proporcional a la concentración del antígeno nativo. Utilizando varias diversas referencias del suero de los valores del antígeno conocido, una curva de la reacción a cierta dosis puede ser generada de la cual la concentración del antígeno de un desconocido puede ser comprobada.

MATERIALES SUMINISTRADOS

A. CALIBRADORES PCR -- 1ml/vial - Frascos de A-F

Seis frascos de referencia de Antígeno CRP a niveles de 0 (A), 0.5 (B), 2.0 (C), 5.0 (D), 15(E) y 30(F) µg/ml. Almacén en 2-8°C. Se ha agregado un preservativo.

Nota: los calibradores, basados en suero humano, se calibraron usando una preparación de referencia, el cual fue ensayado contra el material de referencia internacional CRM 470.

B. REACTIVO TRAZADOR DE PCR- 13ml/vial.

Un frasco que contiene Biotin etiquetada monoclonal de ratón IgG y anti-CRP HRP almacenado, tinte y preservativo. Almacén entre 2-8°C

C. MICROPLATO RECUBIERTO DE STREPTAVIDIN – 96 pozos -icono ↓
Un microplato de 96 pozos cubierto con streptavidin y empaquetado en una bolsa de aluminio con un agente deshidratador. Almacén entre 2°C.

D. CONCENTRADO DILUYENTE DE SUERO – 20 ml

Un frasco de diluyente de suero que contiene solución salina y un tinte. Almacén entre 2-8°C.

E. SOLUCIÓN CONCENTRADA LAVADORA - 20ml - Icono

Un frasco que contiene un surfactante en solución salina. Preservativo agregado. Almacén entre 2-30 °C.

F. REACTIVO DE SEÑAL A -- 7ml/botella del icono S^A

Un bote que contiene Luminol y un hacer la solución. Almacenar entre 2-8°C.

G. REACTIVO DE SEÑAL B -- 7ml/botella del icono S^B

Un bote que contiene el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en solución. Almacén entre 2-8°C.

H. INSERTO DE LA PRUEBA.

Nota 1: No utilice los reactivos más allá de la fecha de vencimiento del kit.

Nota 2: Los reactivos abiertos son estables por sesenta días cuando están almacenados entre 2-8°C.

Nota 3: Los reactivos son para un solo micro plato de 96 micropozos.

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Mida con una pipeta capaz de entregar los volúmenes 25 µl y 100 µl con una precisión de mejor de 1.5%.
2. Dispensadores para las entregas repetidas de los volúmenes 0.100 ml y 0.300 ml con una precisión de mejor de 1.5%.
3. Lavador de microplacas o una botella de apretón (opcional).
4. Papel absorbente para retirar los excesos de los micropozos de la placa.
5. Plástico envolvente o tapa para la microplaca para los pasos de la incubación.
6. Aspirador de vacío (opcional) para los pasos de lavado.
7. Contador de tiempo.
8. Materiales del control de calidad.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para el Uso De Diagnóstico in Vitro. No Para Uso Interno o Externo en Seres Humanos o Animales.

Todos los productos que contienen el suero humano han sido encontrados para ser no-reactivos para el antígeno superficial de la hepatitis B, los anticuerpos del VIH 1&2 y de HCV por los reactivos con licencia del FDA. Puesto que ninguna prueba sabida puede ofrecer termine el aseguramiento que los agentes infecciosos están ausentes, todos los productos humanos del suero deben ser dirigidos como potencialmente peligrosos y capaces de transmitir enfermedad. Los buenos procedimientos del laboratorio para manejar productos de la sangre se pueden encontrar en el Centro para el Control de Enfermedad/el Instituto Nacional de la Salud, "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos," 2da Edición, 1988, publicación No. (CDC) 88-8395 de HHS.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Los especímenes serán sangre, suero en tipo y las precauciones generalmente en la colección de muestras de veni-puntura deben ser observados. Para la comparación exacta a los valores normales establecidos, una muestra de ayuno del suero de la mañana debe ser obtenida. La sangre se debe recoger en un tubo llano de veni-puntura de tapón rojo sin añadidos o anticoagulantes. Permita que la sangre coagule. Centrifugue el espécimen para separar el suero de las células. Las muestras se pueden refrigerar entre 2-8°C. Por un período máximo de cinco días. Si el espécimen no se puede probar dentro de este tiempo, la muestra se puede almacenar en las temperaturas de -20°C. Hasta por 30 días. Antes de hacer el ensayo traer los reactivos y muestras a temperatura ambiente de 20°-27°C. Evite congelar y descongelar.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

- DILUYENTE DE SUERO:** Diluir el diluyente de suero concentrado a 200ml en un contenedor adecuado con agua desionizada o destilada. Almacénese entre 2-8°C.
- SOLUCIÓN DE LAVADO:** Diluir contenidos del concentrado lavador con 1000 ml con agua desionizada o destilada en un contenedor adecuado para almacenar. Almacénese a temperatura ambiente 20-27°C hasta por 60 días.
- SOLUCIÓN DE TRABAJO REACTIVO DE SEÑAL:** Mezcle volúmenes iguales de Reactivo de Señal A y Reactivo de Señal B en un contenedor limpio. Úsese dentro de las 36 horas. Por ejemplo, agregue 1ml de A y 1ml de B por dos tiras de ocho pozos (si se excede en la solución, deseche la porción sobrante). Dilución de la muestra del paciente (1/200)
Dispense 0.010 ml (10 µl) del espécimen de cada paciente en 2 ml de diluyente de suero. Cubra y vierta a fondo por inversión. Guarde entre 2-8°C por no más 48 horas. Los calibradores están listos para usarse.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Antes de proceder con el ensayo, tenga todos los reactivos cerca, las referencias del suero y controles a temperatura ambiente (20-27°C.).

- Ajustar el formato de todos los pozos para cada referencia de suero, controles y espécimen del paciente a ser ensayados en duplicado. Empacar cualquier tira de micropozos dentro de la bolsa de aluminio, séllese y guárdese entre 2-8°C.
- Pipetear 0.025 ml (25 µl) de la referencia de suero apropiado, diluir el control o espécimen (ver Preparación sobre la Prueba del Paciente) en los micropozos designados.
- Añadir 0.100 ml (100 µl) del reactivo de la enzima CRP a cada pozo. Es muy importante dispensar todos los reactivos cerca del fondo del pozo cubierto. NOTA: Use una pipeta multicanal para dispensar rápidamente el reactivo de la enzima para evitar la deriva si el dispensar toma más de unos minutos.
- Remolinear el microplato gentilmente por 20-30 segundos para mezclar y después de debe cubrir perfectamente.
- Incubar durante 15 minutos a una temperatura ambiente.
- Descartar los contenidos del microplato por decantación o aspiración. Golpear ligeramente y colocar la placa seca con toalla absorbente.
- Agregar 350 µl de solución lavadora (ver la sección de preparación de reactivos) decante (golpee y borre) o aspire. Repetir cuatro veces adicionales para un total de cinco lavados. Un lavador automático o manual de platos puede ser usado. Siguiendo las instrucciones del fabricante para un uso apropiado. Si una botella de apretón es empleada, llene cada pozo presionando el envase (evite las burbujas) para dispensar el lavador. Decantar el lavador y repetir cuatro veces adicionales.
- Agregar 0.100 ml (100 µl) de solución de trabajo Reactivo de Señal a todos los micropozos (ver Sección de Preparación de Reactivos).
- Leer las unidades relativas de luz (RLU) en cada micropozo usando un Luminómetro de microplaca. Los resultados deben darse dentro de los 30 minutos que se agregó el Reactivo de Señal.

Nota: Siempre agregue los reactivos en el mismo orden para minimizar la diferencia de tiempo de reacción entre los pozos.

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe tener controles de ensayo en bajo, medio y alto rango de la curva de la reacción para monitorear el buen funcionamiento del ensayo. Estos controles deben ser tratados como desconocidos y determinar los valores en cada método de prueba realizada. Las tablas de control de calidad deben mantenerse para seguir el funcionamiento de los reactivos proveídos. Los métodos estadísticos pertinentes deben ser empleados para comprobar las tendencias. Desviaciones significativas del funcionamiento establecido pueden indicar un cambio experimental en las condiciones o degradación del kit de reactivos. Reactivos frescos deben usarse para determinar la razón de las variaciones.

CÁLCULO DE RESULTADOS

Una cierta dosis para una curva que modele una reacción es utilizada para comprobar la concentración de PCR en especímenes desconocidos.

- Registrar los RLU obtenidos de la impresora del lector del micro placas conforme al ejemplo 1.
- Trazar los RLU para cada referencia duplicada del suero contra la concentración correspondiente de PCR en ng/ml en el papel gráfico.
- Dibujar la mejor curva a través de los puntos trazados.
- Para determinar la concentración del PCR para un desconocido, se debe localizar el promedio de RLU de los duplicados para cada desconocido en el eje vertical del gráfico, encuentre el punto que se interseca en la curva, y leer la concentración (en µg/ml) del eje horizontal del gráfico (los duplicados del desconocido se pueden promediar según lo indicado).

PERFORMANCE

La precisión en y entre la precisión del análisis del procedimiento de hs PCR ELISA microplaca fue determinada por un análisis en tres diversos niveles de los sueros de control. El número, el valor medio, la desviación de estándar y el coeficiente de variación para cada uno de estos sueros de control se presentan en la tabla 3 y la tabla 4.

TABLA 2
Precisión Dentro Ensayos (Valores en µg/ml)

Muestra	N	X	σ	C.V.
Nivel 1	20	1.3	0.09	6.9%
Nivel 2	20	5.9	0.52	8.8%
Nivel 3	20	13.6	1.06	7.8%

TABLA 3
Precisión Entre Ensayos* (Valores en µg/ml)

Muestra	N	X	σ	C.V.
Nivel 1	10	1.6	0.13	8.2%
Nivel 2	10	6.4	0.43	6.7%
Nivel 3	10	12.1	1.09	9.0%

* Como Medido en diez experimentos en duplicado.

1. Sensibilidad:

El procedimiento de la prueba de hs PCR por Elisa tiene una sensibilidad de 0.2 µg/ml.

2. Especificidad:

La reactividad cruzada del procedimiento del microplato de hs PCR por Elisa para seleccionar sustancias fue evaluada por adición de sustancia interferida en una matriz reunida del suero en varias concentraciones. La reactividad cruzada fue calculada derivando un cociente entre la dosis de la sustancia que interfería a la dosis de la CRP necesitada para desplazar el mismo trazo de la cantidad.

3. Efectos de Gancho en Altas Dosis:

La prueba no tendrá efecto en concentraciones de PCR arriba de los 5000 µg/ml en suero o plasma. De cualquier forma, las muestras esperaban haber terminado en 30µg/ml se diluye más a fondo el diluyente de trabajo del suero.

4. Comparación de Método:

La prueba de hs PCR por CLIA fue comparada contra un método predicado automatizado de PCR. Fueron usados los especímenes biológicos (n=167) de la población (sintomática y asintomático). Los valores de rango desde 0 – 22 µg/ml.

REFERENCIAS

- Cole LA. New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin: *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2009; 7:8.
- Gregory JJ Jr, Finlay JL. Alpha-fetoprotein and beta human chorionic gonadotropin: their clinical significance as tumor markers. *Drugs.* 1999; 57 (4): 463:467.
- Steier JA, Sandvei R Myking OL. Human chorionic gonadotropin in early normal and pathologic pregnancy. Discordant levels in peripheral maternal blood and blood from the uterine and abdominal cavities. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1986; 154(5): 1091-1094.
- Swaminathan N, Bahl OP. La disociación y la recombinación de las subunidades de coriónica humana Gonadotrofina. *Biochem Biophys Res Commun* 1970; 40:4227.