



TURB - PCR Proteína C Reativa

Finalidade:

Reagente utilizado na determinação quantitativa da Proteína C Reativa (PCR) no soro humano por imunoturbidimetria. Somente para uso diagnóstico "in vitro".

Princípio:

A turbidimetria baseia-se na detecção ótica de partículas muito pequenas suspensas em líquido. Quando o anticorpo anti-proteínas C-reativa humana que reveste as partículas de látex reage com a PCR presente na amostra, formam-se os imunocomplexos insolúveis que provocam a aglutinação e induzem uma turbidez, medida por espectrofotometria a 540nm. Essa turbidez é diretamente proporcional à concentração da Proteína C Reativa da amostra.

Metodologia:

Imunoturbidimetria Látex

Significado Clínico:

A PCR liga-se não apenas aos poliosídeos presentes em muitas bactérias, fungos e protozoários parasitas, mas também à fosforilcolina, fosfatidilcolinas. O seu papel principal é reconhecer substâncias autógenas potencialmente tóxicas, liberadas por tecidos danificados, ligar-se a elas e desintoxicá-las ou removê-las do sangue. A PCR é também o que exhibe os aumentos mais intensos de concentração após o infarto do miocárdio, trauma, infecções, cirurgias ou proliferação neoplásica. O aumento ocorre dentro de 24 a 48 horas, e o nível pode ser de 2.000 vezes o normal. A determinação do aumento inespecífico de PCR é clinicamente útil para a triagem da doença orgânica; avaliação da atividade de uma doença inflamatória, tal como artrite reumatóide; detecção de infecções intercorrentes no lúpus eritematoso sistêmico, na leucemia ou após cirurgia; detecção da rejeição em receptores e meningite, quando a colheita de amostras para a investigação bacteriológica pode ser difícil.

Reagentes:

- R1= Diluente. Conservar entre 2 e 8°C. Contém: tampão de cloreto de amônio 0,1 mmol/L, azida sódica 0,95 g/L, pH 8,6.
- R2= Látex. Conservar entre 2 e 8°C. Contém: suspensão de partículas de látex sensibilizadas com e anticorpos anti-PCR humana, azida sódica 0,95 g/L.
- Padrão= Soro humano liofilizado. Conservar entre 2 e 8°C. A concentração de proteína C-reativa vem indicada no rótulo do frasco. O valor de concentração é traçável ao material de Referência Certificado CRM470.

O soro humano utilizado na preparação do padrão é negativo para o antígeno HBs e para anticorpos anti-HCV e anti-HIV. No entanto, o padrão deve ser tratado com precaução como potencialmente infeccioso. Sugerimos seguir as normas estabelecidas de Biossegurança.

Os reagentes não abertos são estáveis até a data de vencimento impressa no rótulo do produto. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos a contaminação de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

* Preparo dos Reagentes

Para alguns analisadores utilizamos um reagente de trabalho (verificar a programação do equipamento que será utilizado):
Esvaziar o conteúdo de um frasco do Reagente 2 no frasco do Reagente 1. Homogeneizar. Estável 20 dias a 2 - 8°C.
Se desejar preparar volumes menores, misturar na proporção: 1 mL do reagente 2 + 4 mL do reagente 1. Agitar o reagente 2 antes de pipetar.
Padrão: Reconstituir o liofilizado com 1,0mL de água destilada. Estável por 30 dias de 2 - 8°C.

(Nota 1): Homogeneizar o Reagente 2 com suavidade antes de vertê-lo no frasco de Reagente 1. É conveniente lavar o frasco do Reagente 2 com uma pequena quantidade da mistura preparada, com o propósito de arrastar os restos que ficaram nas paredes do frasco.

Precauções e Cuidados Requeridos:

- Este reagente deve ser usado somente para uso diagnóstico "in vitro".
- Os produtos de origem humana foram testados e estão livres de HBsAg e anticorpos para HCV e HIV, porém este material deve ser tratado cuidadosamente como potencialmente infeccioso.
- Não pipetar com a boca. Evitar contato com a pele e roupa. No caso de contato com os olhos, lavar com grande quantidade de água e procurar auxílio médico.
- O reagente contém azida sódica como conservante. Este componente pode reagir com cobre e chumbo podendo tornar-se um metal explosivo. Ao descartá-lo, adicionar grande quantidade de água.
- Deve-se monitorar a temperatura do ambiente de trabalho bem como o tempo de reação para obtenção de resultados corretos.
- A presença de umidade pode deteriorar o padrão.

-Não usar se a absorvância do branco estiver superior que 0.900 (convertido para 1,0 cm de espaço ótico) quando medido em 540 nm ou se houver dificuldade em conseguir os valores estabelecidos para o soro controle fresco.

Material Necessário não Fornecido:

1. Banho-maria ou analisador capaz de manter uma temperatura de 37°C.
2. Espectrofotômetro ou fotômetro capaz de medir absorvância em 540 nm (520 - 560nm).
3. Pipetas de vidro e/ou automáticas.e.
4. Água destilada/deionizada.
5. Consumíveis do analisador quando usado.
6. Soros controle.
7. Medidor de tempo.
8. Tubo de ensaio

Amostra:

É recomendado soro livre de hemólise. A Proteína C Reativa é estável no soro por 7 dias se for refrigerado entre 2 - 8°C. Para períodos mais prolongados congelar a amostra (-20°C) por no máximo 3 meses (congelar somente uma vez). Todas as amostras e controles são considerados potencialmente infectantes, portanto sugerimos manuseá-las seguindo as normas estabelecidas de Biossegurança.

Preparo do Paciente:

É recomendado um jejum de 8 horas. Todavia, poderá ser modificado segundo orientação médica.

Interferências:

A lipemia (Triglicérides 10 g/L), a bilirrubina até 20 mg/dL, a hemólise (hemoglobina 10 g/L) e o fator reumatóide (200 UI/mL) não interferem significativamente no resultado. Algumas drogas e substâncias afetam a concentração da proteína C reativa, sugerimos consultar Young et al.

Parâmetros do Sistema:

Temperatura: 37°C
 Comprimento de Onda: 540 nm (520 - 560nm).
 Tipo de Reação: Ponto final
 Direção: Crescente
 Vol. Amostra: 10µL
 Volume Reagente: 1.0mL
 Tempo de Incubação: 5 minutos

Calibração:

Utilizar padrão específico para Proteína C Reativa que acompanha o Kit, a concentração de PCR no padrão é rastreável ao calibrador de referência internacional CRM470.

Procedimento Automatizado:

Aplicação no sistema automatizado: vide manual para utilização do equipamento (dependendo do analisador utiliza-se técnica monoreagente ou bireagente) e instruções de uso do reagente
Aplicação no sistema semi-automático: proceder como demonstrado a seguir no procedimento manual até o item 3 (incubação), em seguida utilizar o equipamento para leitura, seguindo protocolo analítico específico baseado no item Parâmetros do Sistema.

Procedimento Manual:

1. Preparar o reagente de trabalho na forma monoreagente: 4mL do reagente1 + 1mL do reagente2
2. Separar 3 tubos de ensaio e realizar os procedimentos conforme abaixo:

	Branco	Padrão	Amostra/S.C.
Água Destilada	10µL	-	-
Padrão	-	10µL	-
Amostra/S.C.	-	-	10µL
Reagente	1,0mL	1,0mL	1,0mL
3. Homogeneizar os tubos e deixar em Banho-Maria (BM) 37°C por 5 minutos. O nível de água no BM deve ser superior ao nível de reagente nos tubos de ensaio.
4. Zerar o aparelho com o branco do reagente a 540 (520 - 560nm), proceder as leituras registrando as absorvâncias do padrão, amostra e soro controle (S.C.).

* Soros fortemente lipêmicos exigem um branco de amostra. Adicione 0.01 mL(10µL) de amostra a 1.0mL de solução salina, homogeneizar e ler a absorvância contra o branco do reagente. Subtraia este valor da absorvância do paciente para obter a leitura corrigida.

Obs.: Procedimento sugerido para espectrofotômetros que requerem volume mínimo de 1,0 mL e podem ser ajustados proporcionalmente sem influência no desempenho do teste. Salientamos que volumes de amostra menores do que 10 µL aumentam a imprecisão da medição em aplicações manuais.

Cálculos:

(Abs.=Absorbância)

(Conc. = Concentração)

$$\text{PCR da Amostra (mg/L)} = \frac{\text{Abs. Amostra}}{\text{Abs. Padrão}} \times \text{Conc. do Padrão (mg/L)}$$

Exemplo:

Abs. amostra = 0.400
 Abs. padrão = 0.821
 Conc. padrão = 69 mg/L
 0.400
 PCR Amostra = ----- X 69
 0.821

PCR Amostra = 33,6 mg/L

Linearidade:

Quando executado de acordo com o recomendado o teste é linear até 150 mg/L. Valores superiores, diluir a amostra com água destilada, repetir a medição e multiplicar o resultado pela fator de diluição. A linearidade pode variar consideravelmente dependendo do instrumento utilizado. O limite da linearidade depende da relação de amostra/reagente. Aumenta reduzindo o volume da amostra, enquanto que a sensibilidade do ensaio diminuirá proporcionalmente. O reagente não apresenta efeito prozona em concentrações menores que 250 mg/L.

Controle de Qualidade:

Cada laboratório deve manter um programa interno de qualidade que defina objetivos, procedimentos, normas, limites de tolerância e ações corretivas. Deve-se manter também um sistema definido para se monitorar a variação analítica do sistema de medição. Aconselhamos o uso dos Soros Controle de Proteína Nível I e Nível II Ebram cód. 1019 e 1020.

Valores Esperados:

Até 5 mg/L

Estes valores são dados unicamente como título orientativo. É recomendado que cada laboratório estabeleça seu próprio intervalo de referência.

Estudos Comparativos:

Estudos executados entre este procedimento e uma metodologia de turbidimetria similar nos proporcionou os seguintes resultados estatísticos: y = 0.9981x + 0,014254; r = 0.9917.

Precisão:

* Intra Ensaio – Precisão analisada - Repetibilidade

A concentração da PCR (mg/L) de uma amostra de soro desconhecida foi medida 20 vezes e o coeficiente da variação determinada.

Analisador	n	Média	S.D.	C.V.
Cobas Mira	20	1,2 3	0,5	4,06
Cobas Mira	20	3,49	0,9	2,57
Cobas Mira	20	10,15	3,5	3,4

* Inter Ensaio - Precisão de exame - Reprodutibilidade

Analisador	n	Média	S.D.	C.V.
Hitachi	26	1,53	0,07	4,4
Cobas Mira	6	8,4	0,3	3,5

Exatidão:

Os controles são analisados em duplicidade no Cobas Mira. Controle Valores analisados Valores das Medidas (mg/L)

Ebram	9,0 (6,0 - 12,0)	9,3
Biorad	3,50 (2,98 - 4,03)	3,34

Sensibilidade Metodológica:

1,0 mg/L

Especificidade:

Nos estudos comparativos realizados apresentamos dados determinados em um analisador. A comparação com soros controles já validados mostrou uma especificidade analítica adequada.

Observações:

1. A limpeza e a secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
2. A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, deve ter resistividade ≥ 1 mega ohm ou condutividade ≤ 1 microsiemens e concentração de silicatos < 0,1 mg/L (água tipo II). Para o enxágue da vidraria a água pode ser do tipo III, com resistividade ≥ 0,1 megaohms ou condutividade ≤ 10 microsiemens. No enxágue final utilizar água tipo II.

Apresentação:

Turbidimetria Geral: R1=1x40mL + R2=1x10mL + Pad=1x1,0mL
Hitachi 917: R1=1x40mL + R2=1x10mL + Pad= 1x1,0mL

Para mais informações sobre sistemas automáticos, entrar em contato com o SAC EBRAM - tel. (011) 2291-2811, sac@ebram.com ou www.ebram.com.

Referência Bibliográfica:

1. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd edition. Burtis CA, Ashwood ER, WB Saunders Co., 1999.
2. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press, 1997.
3. Arquivos Ebram



APLICAÇÃO PARA COBAS MIRA

GENERAL	
Measurement Mode:	ABSORB
Reaction Mode:	R-S
Calibration Mode:	Calibrator (Slope AVG)
Reagent Blank:	REAG/DIL
Cleaner:	NO
Wavelength:	550 nm
Decimal Position:	0
Unit:	mg/L
ANALYSIS	
Dilution Name:	STD:
Factor:	Main STD:
Time:	Sample Dil Name:
Post Dil Factor: 2	Conc. Factor: NO
Sample:	Cycle: 1
Volume: 3 uL	Dil: 10 uL
Reagent:	Cycle: 1
Volume: 240 uL	
Start Reagent 1:	Cycle:
Volume:	Dil:
Start Reagent 2:	Cycle:
Volume:	Dil:
CALCULATION	
Sample Limit:	NO
Point:	
Reaction Direction:	INCREASE
Check:	ON
Conversion Factor:	1.0000
Offset:	0.0000
Test Range Low:	0
High:	150
Norm Range Low:	0
High:	5
Number of Stans:	1
Calculation Stan A:	ENDPOINT
Readings First:	1
Last:	8
Reaction Limit:	NO
Point:	
Calib. Interval:	
CALIBRATION	
Reagent Blank:	ON REQUEST
Reagent Range:	
Reagent Range Low: NO	Blank Range Low: NO
High: NO	High: NO
Factor:	
Calibrator Pos:	(*)
STD1:	STD2:
STD3:	STD4:
STD5:	STD6:
STD7:	STD8:
Calc. Model:	
Correction STD:	
Replicate:	DUPL
Deviation:	10%
CONTROL	
CS1 -	
CS2 -	
CS3 -	

(*) Colocar a posição do padrão

(**) Inserir a concentração do padrão

(***) Utilizar o reagente de trabalho (misturar na proporção: 1 mL do reagente 2 + 4 mL do reagente 1. Agitar o reagente 2 antes de pipetar)

APLICAÇÃO PARA EXPRESS 550

Test Name: PCR	Test: PCR		
Test Bar Code:	Curve Type: Blanked Linear		
Test Type: Endpoint	N° of Decimal Places: 1		
Units: mg/L	Primary Wavelength: 540		
Secondary Wavelength:	Read Time Interval: 20		
Sample Blank: No	Factor:		
Calibration Interval:	Normalization Interval:		
N° of Calibrations: 2	N° of Replicates: 2		
Low Blank A Limit: -0.100	High Blank A Limit: 2.500		
Low A Limit: -0.100	High A Limit: 2.000		
Low Normal: 0.0	High Normal: 5.0		
Linearity Limit: 150	Curve S.D Limit: 15.0		
Test Name: PCR	Test: PCR		
Test Bar Code:			
Sample Volume: 3 uL	Sample Diluent:		
Reagent Dilution Ratio: 1	Dilution Ratio: 1		
Reagent Dilution:			
Reagent Volume	Bar Code	Diluent Volume	Lag Time
Reagent 1	300 uL	PCR1A	120
Reagent 2			
Reagent 3			
Reagent 4			
Control:			

Utilizar o reagente de trabalho (misturar na proporção: 1 mL do reagente 2 + 4 mL do reagente 1. Agitar o reagente 2 antes de pipetar)

APLICAÇÃO PARA COBAS MIRA PLUS

GENERAL	
Measurement Mode:	ABSORB
Reaction Mode:	R-S
Calibration Mode:	Calibrator (Slope AVG)
Reagent Blank:	REAG/DIL
Cleaner:	NO
Wavelength:	550 nm
Decimal Position:	0
Unit:	mg/L
ANALYSIS	
Dilution Name:	STD:
Factor:	Main STD:
Time:	Sample Dil Name:
Post Dil Factor: 2	Conc. Factor: NO
Sample:	Cycle: 1
Volume: 3 uL	Dil: 10 uL
Reagent:	Cycle: 1
Volume: 240 uL	
Start Reagent 1:	Cycle:
Volume:	Dil:
Start Reagent 2:	Cycle:
Volume:	Dil:
CALCULATION	
Sample Limit:	NO
Point:	
Reaction Direction:	INCREASE
Check:	ON
Conversion Factor:	1.0000
Offset:	0.0000
Test Range Low:	0
High:	150
Norm Range Low:	0
High:	5
Number of Stans:	1
Calculation Stan A:	ENDPOINT
Readings First:	1
Last:	8
Reaction Limit:	NO
Point:	
Calib. Interval:	
CALIBRATION	
Reagent Blank:	ON REQUEST
Reagent Range:	
Reagent Range Low: NO	Blank Range Low: NO
High: NO	High: NO
Factor:	
Calibrator Pos:	(*)
STD1:	STD2:
STD3:	STD4:
STD5:	STD6:
STD7:	STD8:
Calc. Model:	
Correction STD:	
Replicate:	
Deviation:	
CS1 -	
CS2 -	
CONTROL	
CS3 -	

(*) Colocar a posição do padrão

(**) Inserir a concentração do padrão

(***) Utilizar o reagente de trabalho (misturar na proporção: 1 mL do reagente 2 + 4 mL do reagente 1. Agitar o reagente 2 antes de pipetar)

APLICAÇÃO PARA SELECTRA

Name:	PCR
Abbr Name:	
Mode:	TwoPoint
Wavelength:	546
Units:	mg/L
Decimals:	1
Low Conc:	0
High Conc:	150
Calibrator Name:	(*)
Repeat:	2
Number:	1
Concentration:	(**)
Interval:	(*)
Cut off:	No
Prozone Check:	No
Ref Male Low:	0
Ref Male High:	5
Ref Female Low:	0
Ref Female High:	5
Ref Ped Low:	0
Ref Ped High:	5
Control 1:	
Control 2:	
Control 3:	
Correlat Factor:	1.000
Correlat Offset:	0.000
DUAL MODE	
Name:	
Sample Blank:	
R1 Bottle:	
Normal Volume:	
Reagent Volume:	
SAMPLE	
Normal Volume:	
Reagent Volume:	
R2 Bottle:	
Normal Volume:	
Reagent Volume:	
Predilution:	
Slope Blank:	
Delay Min Time:	
Linearity Limit:	
Point One Two:	
Incubation Time:	
Low Absorbance:	
High Absorbance:	
R ABS L Limit:	
R ABS H Limit:	
R ABS Deviation:	
Reagent Blank:	
Cal Low Limit:	
Cal High Limit:	
Factor:	
MONO MODE	
Name:	PCR
Sample Blank:	No
R1 Bottle:	25ml
Normal Volume:	300ul
Reagent Volume:	300ul
SAMPLE	
Normal Volume:	2ul
Reagent Volume:	1ul
Delay Min Time:	
Linearity Limit:	
Predilution:	No
Point One Two:	12.110
Incubation Time:	
Low Absorbance:	-0.100
High Absorbance:	3.000
R ABS L Limit:	-0.100
R ABS H Limit:	1.000
R ABS Deviation:	2.000
Reagent Blank:	YES (***)
Cal Low Limit:	(*)
Cal High Limit:	(*)
Factor:	(***)

(*) informação inserida pelo operador

(**) inserir a concentração do padrão

(***) Calculado pelo equipamento

(#)

Utilizar o reagente de trabalho (misturar na proporção: 1 mL do reagente 2 + 4 mL do reagente 1. Agitar o reagente 2 antes de pipetar)

Disponos de programações para outros analisadores, entre em contato com SAC EBRAM.

Ebram Prods. Laboratoriais Ltda@.
 Rua Júlio de Castilhos, nº 500
 Belenzinho - São Paulo - SP
 Cep: 03059-001
 Tel.: (11) 2291-2811
 Indústria Brasileira
 CNPJ.: 50.657.402/0001-31
 www.ebram.com
 sac@ebram.com
 SAC.: (11) 2291-2811
 Resp.Téc.: Nadara Novaes CRF- 37.451
 Nº do Reg. MS: 10159820056
 Edição: Nov/2014