



# TURB - PCR ULTRA-SENSÍVEL

## Finalidade:

Reagente utilizado na determinação quantitativa da Proteína C Reativa (PCR) no soro humano por imunoturbidimetria em níveis de ultrassensibilidade. 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 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

## Significado Clínico:

A proteína C-reativa (PCR) é um marcador de fase aguda que se eleva especialmente em processos inflamatórios e infecciosos. Dentre os novos marcadores cardíacos, é considerado um dos mais importantes. Trata-se da proteína que indica a inflamação dos vasos sanguíneos, causada pelo acúmulo de gordura nas artérias. Estudos recentes mostraram que mesmo um discreto aumento da PCR é um fator de risco cardiovascular independente de outros já conhecidos, como os níveis de colesterol total e frações, apolipoproteína B-100 e homocisteína. Na avaliação de risco de doença cardiovascular, valores de PCR inferiores a 3 mg/L são considerados satisfatórios, enquanto que níveis elevados se associam a maior risco cardiovascular. Esse fato está de acordo com as evidências recentes de que, ao menos parcialmente, a aterosclerose é uma doença inflamatória. A dosagem da PCR por método ultra-sensível pode contribuir tanto para a identificação de indivíduos assintomáticos com risco de doença cardiovascular por aterosclerose, como para o acompanhamento de pacientes que já tenham doença cardiovascular.

## Reagentes:

R1: Diluente - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: tampão glicina 0,1 mol/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.

Calibrador: Soro humano liofilizado - Conservar entre 2 e 8°C. A concentração de proteína C-reativa vem indicada no rótulo do frasco. Após reconstituir com 5,0mL de água destilada o calibrador é estável por 30 dias armazenado entre 2 - 8°C. O valor de concentração é rastreável ao material de Referência Certificado ERM-DA472/IFCC (Institute for Reference Materials and Measurements, IRMM)

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 calibrador 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 num frasco do Reagente 1. Homogeneizar. Estável 20 dias a 2 - 8°C.  
Se desejar preparar volumes menores, misturar na proporção: 1mL do reagente2 + 4mL do reagente1.  
Padrão: Reconstituir o liofilizado com 5,0 mL de água destilada. Estável 1 mês a 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. Tubo de ensaio e pipetas de vidro e/ou automáticas.
4. Água destilada/deionizada.
5. Soros controle.
6. Medidor de tempo.

## 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 até 1000 mg/dL), a bilirrubina até 10 mg/dL, a hemólise (hemoglobina até 10 g/L) e o fator reumatóide até 75 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: 5µL  
Volume Reagente: 1.0mL  
Tempo de Incubação: 5 minutos

## Calibração:

Utilizar calibrador específico para Proteína C Reativa Ultra-sensível que acompanha o Kit

## 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	5µL	-	-
Padrão	-	5µL	-
Amostra/S.C.	-	-	5µL
Reagente de Trabalho	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.

## Cálculos:

(Abs. = Absorvância)  
(Conc. = Concentração)

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

## Exemplo:

Abs. amostra = 0.1254  
Abs. padrão = 0.3822  
Conc. padrão = 12.9 mg/L

0.1254  
PCR-US Amostra =  $\frac{0.1254}{0.3822} \times 12.9$   
0.3822  
PCR-US Amostra = 4.23 mg/L

## Linearidade:

Quando executado de acordo com o recomendado o teste é linear até 15 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.

## 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 PCR-ULTRA Nivel I e Nivel II Ebram cód. 1045 e 1046.

## Valores Esperados:

Homens	Mulheres
5 - 13 anos = < 1,45 mg/L	5 - 18 anos = < 1,90 mg/L
14 - 18 anos = < 2,13 mg/L	19 - 49 anos = < 3,33 mg/L
19 - 39 anos = < 2,68 mg/L	50 - 64 anos = < 8,50 mg/L
40 - 49 anos = < 4,80 mg/L	65 - 99 anos = < 6,60 mg/L
50 - 64 anos = < 7,90 mg/L	
65 - 99 anos = < 6,80 mg/L	

Na avaliação de risco de eventos coronarianos, os valores desejáveis substituem os valores de referência e foram determinados a partir de dados epidemiológicos com o objetivo de estabelecer a concentração de PCR como um fator de risco (independente) para eventos coronarianos.

RISCO
Baixo → PCR inferior a 1,0mg/L
Moderado → PCR de 1,0 a 3,0 mg/L
Alto → PCR superior a 3,0mg/L

## Estudos Comparativos:

Estudos executados entre este procedimento e uma metodologia de turbidimetria similar nos proporcionou os seguintes resultados estatísticos:  $y = 0.9973x + 0.015169$ ;  $r^2 = 0.9945$ .

## Precisão:

\* Intra Ensaio - 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	C.V.
Cobas Mira	20	1,4	1,8%
Cobas Mira	20	7,2	1,5%

## Exatidão:

\* Inter Ensaio - Reprodutibilidade

Analisador	n	Média	C.V.
Hitachi	25	1,4	3,6
Cobas Mira	25	7,2	3,0

## Sensibilidade Metodológica:

0,06 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  $\geq 1$  mega ohm ou condutividade  $\leq 1$  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  $\geq 0,1$  megaohms ou condutividade  $\leq 10$  microsiemens. No enxágue final utilizar água tipo II.

## Apresentação:

R1= 1 x 40mL + R2= 1 x 10mL + Calibrador= 1 x 5,0mL

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. Herbeth B, Siest G, Henny J. High-sensitivity C- reactive protein (CRP) reference intervals in the elderly. Clin Chem Lab Med 2011; 39: 1169-70
2. Price CP, Trull AK, Berry D, Gorman EG. Development and validation of a particle-enhanced turbidimetric immunoassay for C-reactive protein. J Immunol Methods 1987; 99: 205-211
3. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests. 3th ed. AACCPress, 1997.
4. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al. Circulation, 2003, 107:499-511.
4. Arquivos Ebram



### APLICAÇÃO PARA COBAS MIRA

<b>GENERAL</b>	
Measurement Mode:	ABSORB
Reaction Mode:	R-S
Calibration Mode:	SLOPE/AVG ou CALIBRATOR
Reagent Blank:	REAG/DIL
Cleaner:	NO
Wavelength:	550 nm
Decimal Position:	2
Unit:	mg/L
<b>ANALYSIS</b>	
Dilution Name:	STD:
Factor:	Main STD:
Time:	Sample Dil Name: H2O
Post Dil Factor: 2.00	Conc. Factor: NO
Sample:	Cycle: 1
Volume:	Dil: 10 uL
Reagent:	Cycle: 1
Volume:	
Start Reagent 1:	Cycle:
Volume:	Dil:
Start Reagent 2:	Cycle:
Volume:	Dil:
<b>CALCULATION</b>	
Sample Limit:	NO
Point:	
Reaction Direction:	INCREASE
Check:	ON
Conversion Factor:	1.000
Offset:	0.000
Test Range Low:	0
High:	15
Norm Range Low:	NO
High:	NO
Number of Stans:	1
Calculation Step A:	ENDPOINT
Readline First:	T1
Last:	15
Reaction Limit:	NO
Point:	
Calib. Interval:	
<b>CALIBRATION</b>	
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:	NO
Replicate:	DUPL
Deviation:	10%
<b>CONTROL</b>	
CS1 - NO	
CS2 - NO	
CS3 - NO	

- (\*) Inserir a concentração do Calibrador do PCR Ultra-sensível
- (\*\*) Inserir a posição do calibrador
- (\*\*\*) 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-US	Test: PCR-US		
Test Bar Code:			
Test Type: Endpoint	Curve Type: Blanket Linear		
Units: mg/L	N° of Decimal Places: 2		
Primary Wavelength: 540	Secondary Wavelength: No		
Read Time Interval: 20	Sample Blank: No		
Factor:			
Calibration Interval: 999 horas			
Normalization Interval: 999 horas			
N° of Calibrators: 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: 0.00	High Normal: 8.50		
Linearity Limit: 15.00	Curve S.D Limit: 15.00		
Test Name: PCR-US	Test: PCR-US		
Test Bar Code:			
Sample Volume: 5 uL	Sample Diluent:		
Reagent Dilution Ratio: 1	Dilution Ratio: 1		
Reagent Dilution:			
Reagent Volume	Bar Code	Diluent Volume	Lag Time
Reagent 1	300 uL	PCRU	300
Reagent 2			
Reagent 3			
Reagent 4			
Control:			

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.: Nadjara Novaes Longen  
 CRF-SP - 37.451  
 Nº do Reg. MS: 10159820056  
 Edição: maio/15

### APLICAÇÃO PARA COBAS MIRA PLUS

<b>GENERAL</b>	
Measurement Mode:	ABSORB
Reaction Mode:	R-S
Calibration Mode:	SLOPE/AVG
Reagent Blank:	REAG/DIL
Cleaner:	NO
Wavelength:	550 nm
Decimal Position:	2
Unit:	mg/L
<b>ANALYSIS</b>	
Dilution Name:	STD:
Factor:	Main STD:
Time:	Sample Dil Name: H2O
Post Dil Factor: 2.00	Conc. Factor: NO
Pos:	
STD1:	STD2:
STD3:	STD4:
STD5:	STD6:
STD7:	STD8:
Sample:	Cycle: 1
Volume:	Dil: 10 uL
Reagent:	Cycle: 1
Volume:	
Start Reagent 1:	Cycle:
Volume:	Dil:
Start Reagent 2:	Cycle:
Volume:	Dil:
<b>CALCULATION</b>	
Sample Limit:	NO
Point:	
Reaction Direction:	INCREASE
Check:	ON
Conversion Factor:	1.000
Offset:	0.000
Test Range Low:	0
High:	15
Norm Range Low:	NO
High:	NO
Number of Stans:	1
Calculation Step A:	ENDPOINT
Readline First:	T1
Last:	15
Reaction Limit:	NO
Point:	
Calib. Interval:	
<b>CALIBRATION</b>	
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:	NO
Replicate:	DUPL
Deviation:	10%
<b>CONTROL</b>	
CS1 - NO	
CS2 - NO	
CS3 - NO	

- (\*) Inserir a concentração do Calibrador do PCR Ultra-sensível
- (\*\*) Inserir a posição do calibrador
- (\*\*\*) 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-US
Abbr Name:	
Mode:	TwoPoint
Wavelength:	546 nm
Units:	mg/L
Decimals:	2
Low Conc:	0
High Conc:	15
Calibrator Name:	PCR Ultra
Repeat:	2
Number:	1
Concentration:	(*)
Interval:	
Cut off:	NO
Prozone Check:	NO
Ref Male Low:	(*)
Ref Male High:	(*)
Ref Female Low:	(*)
Ref Female High:	(*)
Ref Ped Low:	(*)
Ref Ped High:	(*)
Control 1:	
Control 2:	
Control 3:	
Correlat Factor:	1.000
Correlat Offset:	0.000
<b>DUAL MODE</b>	
Name:	
Sample Blank:	
R1 Bottle:	
Normal Volume:	
Reagent Volume:	
<b>SAMPLE</b>	
Normal Volume:	
Reagent Volume:	
R2 Bottle:	
Normal Volume:	
Reagent Volume:	
<b>Predilution</b>	
Sample 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:	
<b>MONO MODE</b>	
Name:	PCR-US
Sample Blank:	No
R1 Bottle:	25mL
Normal Volume:	225uL
Reagent Volume:	225uL
<b>SAMPLE</b>	
Normal Volume:	3uL
Reagent Volume:	2uL
Delay Min Time:	
Linearity Limit:	
Predilution:	
Point One, Two:	12.304 sec
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:	(**)

- (\*) Inserido pelo operador
- (\*\*) Calculado pelo analisador
- (\*\*\*) 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.)

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