

# KIT PROTEINA C – REACTIVA HUMANA MININEPH™

Spanish

**Para Uso en Diagnóstico 'In Vitro'**

**Código Producto: ZK044.L.R**

MININEPH™ es una marca registrada de The Binding Site Ltd., Birmingham, UK.

Producto fabricado por:

The Binding Site Ltd, PO Box 11712, Birmingham, B14 4ZB, U.K.  
www.bindingsite.co.uk

Teléfono : +44 (0)121 436 1000

Fax : +44 (0)121 430 7061

e-mail: info@bindingsite.co.uk



## 1 PRINCIPIO

Este kit está diseñado para realizar determinaciones *In Vitro* de Proteína C Reactiva (PCR) humana en suero usando el MININEPH™ como una ayuda en el diagnóstico y tratamiento de condiciones inflamatorias e infecciones bacterianas.

## 2 RESUMEN Y EXPLICACION

La proteína C reactiva (PCR), de peso molecular 105kD, forma parte de un grupo de proteínas llamadas pentaxinas. Se pueden unir rápidamente a membranas dañadas y a los polisacáridos bacterianos y están involucradas en la aglutinación y precipitación de bacterias invasivas. También pueden activar complemento dando lugar a inflamación, opsonización y fagocitosis de las bacterias y restos celulares.

PCR se sintetiza en el hígado y las concentraciones en el suero normal son bajas (menos de 10mg/L). Las concentraciones se elevan rápidamente después de una inflamación y los niveles más elevados se alcanzan a las seis horas. Es el indicador más usado y fiable de la fase aguda de la respuesta, por delante del índice de sedimentación eritrocitaria (ESR). Niveles moderadamente elevados en suero (10-40mg/L) están asociados con inflamación ligera e infecciones víricas. Concentraciones elevadas (40 a 200mg/L) aparecen en la fase aguda de la respuesta y en infecciones bacterianas (refs. 1,2,3).

## 3 PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación de la concentración de antígenos solubles mediante métodos nefelométricos implica una reacción con un antisuero específico que forma un complejo insoluble. Cuando la luz pasa a través de la suspensión formada, hay una proporción de luz que se dispersa y es detectada por un fotodiodo. La cantidad de luz dispersada es directamente proporcional a la concentración de proteína específica en la muestra. Las concentraciones se calculan de forma automática en referencia a una curva de calibración standard que está guardada en el equipo.

## 4 REACTIVOS

### 4.1 REACTIVO PCR HUMANA para MININEPH

Es un antisuero mono específico tapizando micropartículas de poliestireno. Se suministra liofilizado. Contiene un 0.099% de azida sódica como conservante. Cada vial se debe reconstituir con 600µL de agua destilada y dejarlo disolver durante 30 minutos.

### 4.2 TARJETA MAGNETICA PCR

En esta están codificados los detalles de la curva de reacción específica al correspondiente lote de antisuero. Esta tarjeta es específica de lote y debe ser usada sólo con ese lote de antisuero. La curva presente en la tarjeta se ha obtenido usando material de calibración CRM470.

### 4.3 TAMPON PCR MININEPH

Para ser usado sólo con este lote de reactivo de PCR. Contiene un 0.099% de azida sódica como conservante.

### 4.4 CONTROLES PCR HUMANOS ALTO Y BAJO PARA MININEPH

Consiste en una mezcla de sueros humanos y se suministra de forma liofilizada. Se debe reconstituir en 0.5ml de agua destilada y dejar disolver durante 15 minutos. Contiene un 0.099% azida sódica, 0.1% EACA y 0.01% benzamida como conservante. Los rangos aceptables de concentración de PCR están detallados en el Certificado de Control de Calidad incluido en el kit. El número de lote detallado en el certificado debe ser idéntico al número de lote del kit.

## 5 CAUTION

El material de partida para la elaboración de los calibradores y controles proviene de sangre humana. Cada una de las muestras han sido examinadas y libres de anticuerpos del virus del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (HIV 1 & 2), Hepatitis C así como antígenos superficiales de Hepatitis B (HBsAg). No obstante, hasta la fecha no existen métodos seguros para la exclusión de estos agentes infecciosos ni de otros. Por lo tanto, deben tratarse los reactivos como potencialmente infecciosos. Tanto la manipulación como los métodos de eliminación de desechos deberán realizarse conforme a la normativa de

materiales infecciosos y solo personal adecuadamente instruido deberá efectuar el test.

El kit contiene azida sódica 0,099% y debe tratarse según las medidas de seguridad correspondientes. Debe evitarse tanto la ingesta como el contacto con la piel y las mucosas. En caso de contacto, aclarar con abundante agua y consultar a un médico. La azida sódica puede formar ácidos metálicos explosivos en contacto prolongado con tubos de plomo o cobre. Tras la eliminación aclarar con gran cantidad de agua con el fin de evitar depósitos de azida.

Se recomienda seguir el procedimiento descrito en estas instrucciones de empleo. De no seguir estas instrucciones, no se pueden garantizar los resultados.

NO SE PUEDEN mezclar reactivos con diferentes números de lote ni utilizar conjuntamente. En caso de realizar gran cantidad de pruebas, deberá tenerse en cuenta que todos los reactivos sean del MISMO LOTE.

## 6 STORAGE AND STABILITY

Los kits no abiertos se deben guardar entre 2-8°C y pueden ser usados hasta la fecha de caducidad descrita en la caja del kit. NO CONGELAR. El tampón se debe dejar atemperar a temperatura ambiente antes de ser utilizado. Una vez abierto, los antisueros y los controles se deben guardar a 2-8°C y el tampón a temperatura ambiente. Una vez reconstituido el reactivo es estable durante 1 semana y los controles durante 4 semanas cuando se almacenan a 2-8°C. El tampón es estable durante 3 meses a temperatura ambiente.

## 7 RECOLECCION Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Se deben usar muestras de suero. Las muestras de sangre se deben obtener por venopunción, permitir que el coágulo se forme de manera natural y separar el suero tan pronto como sea posible para prevenir la hemólisis. El suero se debe almacenar entre 2-8°C durante dos días, si no va a ser usado en este tiempo, se debe alicuotar y congelar a -20°C o a temperatura inferior. No congelar y descongelar el suero más de una vez. Las diluciones de la muestra se deben realizar el mismo día que se realice el ensayo. Algunos tipos de suero no pueden ser analizados por MININEPH – ver sección 10.1.

## 8 METODOLOGIA

### 8.1 MATERIAL SUMINISTRADO

- 8.1.1 4 x 0.6 mL MININEPH Human CRP Reagent (Reactivo PCR Humana MININEPH)
- 8.1.2 1 x 25 mL MININEPH CRP Buffer (Tampón PCR MININEPH)
- 8.1.3 1 x 0.5 mL MININEPH Human CRP High Control (Control alto PCR Humana MININEPH)
- 8.1.4 1 x 0.5 mL MININEPH Human CRP Low Control (Control bajo PCR Humana MININEPH)
- 8.1.5 Tarjeta magnética conteniendo la información de calibración específica de lote.
- 8.1.6 Certificado Control Calidad
- 8.1.7 Manual Instrucciones

### 8.2 MATERIAL NECESARIO NO SUMINISTRADO

- 8.2.1 Instrumento MININEPH (AD200)
- 8.2.2 impresora MININEPH (AD210) (opcional)
- 8.2.3 Kit reactivos accesorios MININEPH (ZK500.R)
- 8.2.4 Pipeta electrónica (e.g. AD205)
- 8.2.5 Pipeta (5 – 1000µL)
- 8.2.6 Equipo para la recolección y preparación de muestras
- 8.2.7 Agua destilada

### 8.3 PROCEDIMIENTO DEL TEST

- 8.3.1 Resumen de los volúmenes de reactivo que se añaden a la cubeta:

Reactivo	Volumen añadido
Muestra (1/40 dilución)	20µL
MININEPH Tampón PCR	400µL
MININEPH Reactivo PCR Hu	40µL

- 8.3.2 Poner en marcha el analizador y la impresora (si se dispone de ella).
- 8.3.3 *Ingrese número químico.* Introducir el número de parámetro (PCR = 44) y pulsar **enter**.
- 8.3.4 *Pasar tarjeta.* Este mensaje sólo aparecerá si es un parámetro que no se había usado nunca o si se quiere cambiar el número de lote. Pasar la tarjeta magnética a través del lector de tarjetas, pasándola de delante hacia atrás. La banda magnética debe estar hacia abajo y en el lado izquierdo.
- 8.3.5 *Verifique número lote de reactivo.* Pulsar **enter**.
- 8.3.6 *CRP lote xxxx. OK? 1=Y 2=N.* Comparar la información que se muestra en la pantalla con la de la etiqueta del antisuero. Si el número de lote es igual al del vial, seleccionar **SI (press 1)** y continuar con el paso 8.3.7. Si el número de lote del vial es distinto al mostrado en la pantalla, seleccionar **NO (press 2)** y volver al paso 8.3.4 para introducir los detalles del lote correcto.
- 8.3.7 Preparar las diluciones de los controles y de las muestras usando el MININEPH Reactivo diluyente de muestras del material accesorio (ZK500.R). La dilución de muestra recomendada para PCR es 1/40 (ej. Usando la pipeta electrónica, dispensar 780µL de diluyente de muestra y 20µL de muestra en un tubo de dilución de muestras).
- 8.3.8 Preparar una cubeta MININEPH para cada muestra a testar. Utilizando las pinzas suministradas con MININEPH depositar una

barrita agitadora en cada cubeta y utilizando la pipeta, depositar 20µL de la muestra diluida en el fondo de la cubeta.

- 8.3.9 **Ingreso ID muestra.** Introducir un código de identificación (e.j. 1) para la primera muestra a testar y después pulsar **enter** para continuar (seguir el manual de usuario para elegir los códigos a utilizar).
- 8.3.10 **Dilución muestra 1/40. Aceptar la dilución recomendada pulsando enter,** o bien introducir un nuevo factor de dilución si es necesario utilizar una dilución alternativa.
- 8.3.11 **Coloque cubeta en cámara.** Disponer una cubeta que contenga la barrita agitadora y los 20µL de muestra diluida en la cámara de cubetas. Presionar la cubeta suavemente hasta que toque el fondo de la cámara. La cubeta será detectada automáticamente.
- 8.3.12 **Agruege reactivo. Con una pipeta electrónica coger 400µL de** Tampón MININEPH PCR y 40µL de antisuero PCR humana MININEPH y dispensar este contenido en la cubeta. El MININEPH detectará la adición de reactivo, se realizará una agitación con la barrita agitadora y comenzará el ensayo.- No es necesario pulsar 'enter'. Después de los 30 segundos de blanco, necesitará 60 segundos para terminar, el resultado se visualizará en la pantalla y se imprimirá (si hay una impresora conectada).
- 8.3.13 Si el instrumento indica que el resultado está por encima del rango de detección, se deberá repetir el ensayo usando una factor de dilución de 1/440 (400µL Diluyente de muestra MININEPH + 40µL muestra diluida 1/40). La dilución de la muestra se deberá introducir como 1/440 (ver sección 8.3.10).
- 8.3.14 Si el instrumento indica que los resultados están por debajo del rango de detección, volver a testar la muestra con una dilución inferior como 1/5 (160µL Diluyente de muestra MININEPH + 40µL muestra). La dilución de la muestra se deberá introducir como 1/5 (ver sección 8.3.10).
- 8.3.15 Una vez terminado el ensayo, sacar la cubeta y pulsar **enter** para realizar el ensayo siguiente.
- 8.3.16 Cuando se hayan terminado los ensayos para un parámetro determinado pulsar (**esc**) y seleccionar el nuevo número de parámetro para los ensayos siguientes.

#### 8.4 CONTROL CALIDAD

Siguiendo las buenas prácticas de laboratorio, los usuarios deben introducir controles a testar en cada ciclo de muestras analizadas.

### 9 INTERPRETACION DE RESULTADOS

- 9.1 Los resultados son calculados por el instrumento y se muestran como mg/L. Si hay una impresora conectada, los resultados se imprimen automáticamente con el código de identificación del paciente y la dilución de la muestra. No son necesarios más cálculos.
- 9.2 El rango aproximado de detección está entre: 3.5 – 112 mg/L a una dilución de muestra de 1/40. El límite de sensibilidad es de 0.44mg/L usando una dilución de muestra de 1/5. Muestras con concentraciones superiores al rango detallado, pueden tener un exceso de antígeno y dar lugar a resultados erróneos. Si se sospecha esto, las muestras se pueden volver a testar a una dilución 1/440 (400µL Diluyente muestra MININEPH + 40µL muestra diluida 1/40).

### 10 LIMITACIONES

#### 10.1 LIMITACIONES ESPECIFICAS DEL TEST

- 10.1.1 Muestras muy lipémicas, contaminadas microbiológicamente, turbias o hemolisadas no son susceptibles de ser analizadas nefelométricamente y no se deben usar si no han sido previamente centrifugadas o preparadas de forma apropiada. Un método de ensayo alternativo puede ser la inmunodifusión radial, que se recomienda si la turbidez no puede ser eliminada.
- 10.1.2 Este kit no puede ser usado para la determinación de muestras que contengan factor reumatoide, paraproteínas o inmunocomplejos circulantes (ICC) debido al grado de dispersión inespecífico impredecible que pueden tener las muestras de este tipo.
- 10.1.3 El diagnóstico y tratamiento no puede realizarse basándose únicamente en la determinación de PCR. La historia clínica y otras pruebas de laboratorio deben ser tenidas en cuenta.

#### 10.2 RESOLUCION DE PROBLEMAS

Problema	Posible Causa	Acción Sugerida
Mensaje de error "Blanco demasiado elevado- retestar" aparece en la pantalla.	Concentración de analito demasiado elevada Muestra lipémica, turbia o hemolisada	Volver a testar la muestra con una dilución superior Buscar un método de ensayo alternativo
Control fuera de rango.	Deterioro del producto Error del técnico.	Comprobar fecha de caducidad. Repetir el ensayo con la dilución de muestra correcta.
Muestra con resultados inexplicablemente bajos.	Exceso de antígeno.	Repetir el ensayo con una dilución superior. Comprobar que los dos resultados sean concordantes.

### 11 RESULTADOS ESPERADOS

Los siguientes resultados de PCR se obtuvieron en suero de donantes sanos y en pacientes hospitalizados usando el MININEPH. Las concentraciones están en mg/L. Se recomienda generar rangos de referencia locales.

Tipo de muestra	Número de muestras	Rango
Suero normal	72	Todas las muestras < 3.8
Suero clínico	19	4.26 – 72.8

### 12 CARACTERISTICAS DE FUNCIONAMINETO

#### 12.1 PRECISION

12.1.1 PRECISION INTRA-LOTE: Estos datos representan el promedio del coeficiente de variación (CV) de tres determinaciones intra-lote a dos concentraciones de antígeno distintas. En cada experimento se han realizado diez ensayos repetidos a cada concentración.

Dilución de muestra	PCR (mg/L)	CV(%)
1/40	43.0	3.4
	12.9	3.4
1/5	11.6	3.9
	0.79	7.6

12.1.2 PRECISION DIA A DIA: Se realizaron diez determinaciones intra lote de tres ocasiones distintas y se calculó el promedio de CV de los treinta resultados a las dos concentraciones estudiadas.

Dilución de muestra	PCR (mg/L)	CV(%)
1/40	43.0	5.4
	12.9	3.7

Los ensayos se realizaron en dos concentraciones distintas en diez ocasiones distintas. El CV de los diez resultados a cada concentración se calculó:

Dilución de muestra	PCR (mg/L)	CV(%)
1/5	11.6	10.9
	0.79	12.7

12.1.3 PRECISION INTER-INSTRUMENTO: Los ensayos se realizaron cinco veces a dos concentraciones distintas en cada uno de los tres equipos. El CV global de los quince resultados a cada concentración fue calculado:

Dilución de muestra	PCR (mg/L)	CV(%)
1/40	43.0	6.0
	12.9	6.3

Los ensayos se realizaron tres veces a dos concentraciones de analito distintas en cada uno de los cinco instrumentos. El CV global se calculó para los quince resultados a cada concentración.

Dilución de muestra	PCR (mg/L)	CV(%)
1/5	13.3	5.4
	0.87	8.6

#### 12.2 ESTUDIO DE COMPARACION

Se realizó un estudio de correlación en 85 muestras normales y en muestras clínicas utilizando este kit en un MININEPH y con un método de referencia comercial disponible. El estudio demuestra una buena correlación:

$$y = 0.932x - 0.908 \text{ mg/L} \quad (y = \text{PCR MININEPH})$$

$$(x = \text{Método referencia})$$

Coefficiente correlación  $r = 0.995$

### 13 REFERENCIAS

- Protein Reference Unit Handbook of Clinical Immunochemistry (1999) 6<sup>th</sup> Edn. Ed A Milford Ward Publ. PRU Publications, Sheffield pp109-111.
- Rosen, M.A. (1990). C-Reactive Protein: a marker of infection, inflammation, tissue damage and malignancy. Diagnostic & Clin. Testing 28, 18-22.
- Okamura, J.M. et al (1990). Potential clinical applications of C-reactive protein. J.Clin Lab-Analysis 4, 231-235.