

Determinazione quantitativa della CRP (Proteina C Reattiva) nel siero e nel plasma. Metodo Immunoturbidimetrico.

REF TB1010 R1: 2x50 mL+ R2: 1x20 mL + R3: 1x1 mL (cal)

REF TB1012 R1: 3x20mL + R2: 1x12 mL + R3: 1x1 mL (cal)

PRINCIPIO DEL METODO

Test immunoturbidimetrico. Gli anticorpi anti-CRP reagiscono con l'antigene nel campione per formare un complesso antigene/anticorpo che produce una reazione turbidimetrica misurabile fotometricamente a 340 nm. L'assorbanza della soluzione è proporzionale alla quantità di CRP presente nel campione. L'aggiunta di PEG consente alla reazione di avanzare rapidamente al punto finale, aumentando la sensibilità e riducendo il rischio di campioni che, contenendo eccesso di antigene, producono falsi risultati negativi. Utilizzando un calibratore a concentrazione nota è possibile quantificare i campioni.

SIGNIFICATO CLINICO

La proteina C reattiva (CRP) è una proteina di fase acuta, prodotta dal fegato e rilasciata in circolo entro poche ore dal danno tissutale, dall'inizio dell'infezione o da altre cause di infiammazione. Un aumento importante si osserva, ad esempio, dopo un trauma o un infarto, a seguito di patologie autoimmuni attive o fuori controllo, e con un'infezione batterica grave come la sepsi. La concentrazione di CRP può aumentare anche di centinaia di volte in risposta ad una patologia infiammatoria. L'aumento della CRP nel sangue può precedere dolore, febbre o altri indicatori clinici. La misura quantitativa di CRP nel sangue può essere di supporto nella determinazione dell'infiammazione dovuta ad una condizione acuta oppure per il monitoraggio del decorso di una patologia cronica. La CRP attiva il sistema del complemento, inizia quindi l'opsonizzazione e la fagocitosi di cellule invasive, ma la sua funzione principale è quella di legare ed eliminare le sostanze tossiche endogene prodotte a seguito di danni ai tessuti. La CRP non è diagnostica per una specifica patologia ma informa il clinico circa la presenza o l'assenza dell'infiammazione. Questa informazione può essere usata insieme ad altri dati come segni e sintomi, valutazione dello stato fisico e altri esami che determinino se il paziente ha una patologia infiammatoria acuta o sta avendo una riacutizzazione di una malattia infiammatoria cronica.

Il dosaggio della CRP si usa per rilevare processi infiammatori sistemici (ad eccezione di alcuni tipi di infiammazione come SLE e colite ulcerosa), per valutare il trattamento delle infezioni batteriche con antibiotici, per rilevare infezioni intrauterine con amniotite precoce concomitante, per differenziare le forme attive e inattive della malattia con infezione concorrente, ad esempio nei pazienti affetti da SLE o Colite ulcerosa, per monitorare terapeutamente malattie reumatiche e valutare la terapia antinfiammatoria, per determinare la presenza di complicanze postoperatorie in una fase precoce, come le ferite infette, la trombosi e la polmonite, per distinguere tra infezione e rigetto del trapianto di midollo osseo.

COMPOSIZIONE DEI REAGENTI

R1 (Tampone):

Tampone TRIS/HCl pH 7.6	100 mmol/L
NaCl	300 mmol/L
Polyethyleneglycol (PEG)	4.5 %

R2 (Antisiero):

Antisiero Anti CRP umana (capra)	30% v/v
Tampone TRIS/HCl pH 7.6	50 mmol/L
NaCl	300 mmol/L

R3 (calibratore):

CRP	valore in etichetta
-----	---------------------

PREPARAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

Reagenti liquidi e pronti all'uso, stabili fino alla data di scadenza riportata, se conservati come riportato in etichetta e si evitano contaminazione, evaporazioni ed esposizione prolungata alla luce diretta. Non congelare i reagenti.

Scartare il reagente se appaiono segni di deterioramento come presenza di particelle e torbidità oppure mancato recupero dei valori di sieri di controllo certificati oppure Assorbanza (Abs) Bianco Reagente a 340 nm > 0,300 in cuvette da 1 cm.

Dopo l'apertura dei flaconi, si consiglia di prelevare il volume necessario, di richiudere immediatamente i flaconi e di riporli in frigo al fine di evitare contaminazione, degradazione da luce diretta ed evaporazione.

CAMPIONI:

Siero, Plasma da EDTA o da Litio Eparina.

Evitare campioni emolizzati o lipemici. Separare il siero dal coagulo rapidamente. Effettuare un solo scongelamento.

Stabilità: 8 giorni a 2-8° C, 3 giorni a 15-25° C, 3 mesi a -20° C.

PROCEDURA

Lunghezza d'onda:	340 nm
Temperatura:	+37° C
Azzeramento:	acqua distillata

Pipettare come segue:

Reagente (R1)	700 µL
Campione / Calibratore / H ₂ O	40 µL

Miscelare e dopo 120" leggere l'Assorbanza (Abs1). Poi aggiungere:

Reagente (R2)	140 µL
---------------	--------

Miscelare, dopo altri 300" leggere ancora l'Assorbanza (Abs2)

Calcolare il ΔAbs (Abs2 – Abs1) per campioni, controlli e calibratori.

CALIBRAZIONE

Il valore del calibratore CRP è riferito al:

IFCC/BCR/CAP Reference Material for 15 Plasma Protein CRM 470.

I risultati dipendono dalla accuratezza della calibrazione, dal corretto settaggio del test sullo strumento, dal giusto rapporto volumetrico reagente/campione e dalla corretta temperatura di analisi.

Diluire il calibratore in NaCl 9 g/L come segue:

Diluizione	1	2	3	4	5	6
CAL (µL)	--	10	25	50	75	100
NaCl 9 g/L (µL)	100	90	75	50	25	--
Fattore	0.0	0.1	0.25	0.5	0.75	1.0

Moltiplicare la concentrazione del Calibratore per il corrispondente fattore per ottenere la concentrazione dell'analita corrispondente ad ogni diluizione.

Per evitare le diluizioni manuali del calibratore, è possibile utilizzare

CRP CALIBRATION SET – REF: TUC1073 (5 x 1 mL)

un set di calibrazione composto da flaconi di calibratori pre diluiti, con esatto valore indicato in etichetta.

CALCOLO

La seduta analitica non può essere validata se il Δ Abs (Abs2 – Abs1) del Bianco Reagente è $> 0,300$ a 340 nm in cuvetta da 1 cm di cammino ottico. Calcolare per ogni campione in esame e per ogni calibratore il Δ Abs (Abs2 – Abs1). Costruire una curva di calibrazione (Δ Abs contro concentrazioni dei singoli calibratori) e su di essa riportare i valori del Δ Abs (Abs2 – Abs1) dei campioni in esame per ricavarne le concentrazioni. Per calcoli automatici (previsti dagli analizzatori automatici), il metodo di elaborazione dati consigliato è la Curva SPLINE ma altri metodi possono essere utilizzati (Punto-Punto, Logit-Log 4P, etc.).

Fattore Conversione: mg/L x 0,1 = mg/dL - mg/dL x 10 = mg/L

CONTROLLO QUALITA'

Sieri di controllo normali e patologici a concentrazione nota, devono essere analizzati regolarmente in ogni seduta analitica.

Utilizzare i seguenti prodotti MTD Diagnostics:

Plasma Protein Control Level 1 REF: TUC1040 (3 x 1 mL)

Plasma Protein Control Level 2 REF: TUC1050 (3 x 1 mL)

Il range dei valori dei controlli deve essere valutato come una linea guida potendo esso essere determinato dall'applicazione del metodo o dalla manualità dell'utente o da altri fattori. I valori ottenuti devono essere utilizzati ai fini della valutazione della Precisione del metodo (Ripetibilità). Per la valutazione della Accuratezza del metodo (Riproducibilità) è necessario aderire ad un programma di Valutazione Esterna Qualità' (VEQ) gestito da enti certificati.

VALORI DI RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICI

Adulti: $< 8,0$ mg/L (CRM 470)

$< 0,8$ mg/dL (IFCC)

Le concentrazioni inferiori a 10 mg/L (1 mg/dL) escludono numerose malattie infiammatorie acute, ma non possono comunque escludere tutti i processi infiammatori acuti in generale. Concentrazioni elevate fino a 50 mg/L (5 mg/dL) nelle malattie acute si verificano in presenza di processi infiammatori lievi o moderati. Valori superiori a 50 mg/L (5 mg/dL) indicano un'attività infiammatoria alta ed estesa. È importante monitorare la concentrazione CRP durante la fase acuta della malattia. I valori indicati possono essere interpretati solo insieme ad altri risultati o a valutazioni cliniche.

Ogni laboratorio dovrebbe stabilire un range di valori attesi in base alla propria popolazione di pazienti e, se necessario, determinare il proprio intervallo di riferimento. A fini diagnostici, i risultati devono sempre essere valutati insieme alla storia medica del paziente, all'esame clinico e ad altri risultati.

PRESTAZIONI

PRECISIONE:

Livello basso: Campioni= 20; Media = 18,65; D.S. = 0,47; CV = 2,55%

Livello alto: Campioni= 20; Media = 102,07; D.S. = 0,96; CV = 0,94%

ACCURATEZZA: Una comparazione tra questo metodo (x) ed un metodo certificato del commercio (y) ha dato la seguente correlazione:

$$y = 1.002 x - 0.71 \quad r = 0.999$$

SENSIBILITÀ: 1 mg/L

LINEARITÀ: da 1 a 500 mg/L.

PROZONA: Nessun effetto fino a valori di 1.000 mg/L di CRP

SPECIFICITA' / INTERFERENZE

Non interferiscono: la Bilirubina fino a 50 mg/dL, l'Emoglobina fino a 400 mg/dL, i Trigliceridi fino a 500 mg/dL, Fattoria Reumatoide fino a 1200 UI/mL. Altre sostanze possono interferire

PRECAUZIONI

R1 ed R2 contengono TRIS BUFFER 100 mmol/L – pH 7.5 - CAS 1185-53-1

H315: Provoca irritazione cutanea

H319: Provoca gravi irritazioni oculari

H335: Può irritare le vie respiratorie

I sieri umani presenti nel preparato sono stati testati con metodi marcati CE e approvati FDA e sono stati trovati negativi per presenza di HBsAg, HIV 1&2, HCV. Tuttavia, poiché non ci sono metodi capaci di assicurare la totale assenza di tali agenti infettanti o di altri microbi, questo prodotto deve essere maneggiato come se fosse rischioso e potenzialmente capace di trasmettere malattie infettive di ogni tipo, in accordo con le norme di Buona Pratica di Laboratorio.

L'anticorpo presente nel reagente è di origine animale e non è in grado di trasmettere malattie infettive all'uomo. Tuttavia, poiché non ci sono metodi per garantire la totale assenza di tali agenti infettivi, questo prodotto deve essere maneggiato come se fosse rischioso e potenzialmente in grado di trasmettere malattie infettive di qualsiasi tipo, in conformità con gli standard della Buona Pratica di Laboratorio.

Il prodotto non contiene altre sostanze o miscele pericolose secondo la regolamentazione CE n° 1272/2008 ovvero le loro concentrazioni sono tali da non essere considerate persistenti, bioaccumulanti o tossiche (PBT). Il prodotto non è soggetto ad etichettatura secondo le direttive CE o le corrispondenti normative nazionali. Sodio Azide inferiore a 0.1%.

Tuttavia, in osservanza alle normali norme di prudenza che ognuno deve osservare allorché maneggi qualunque sostanza chimica o reagente di laboratorio, in caso di contatto dei Reagenti con l'operatore, occorre applicare i seguenti interventi di primo soccorso:

S26 (P305 – P351 – P338): In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare il medico.

S28 (P302 – P352): In caso di contatto con la pelle, lavarsi immediatamente ed abbondantemente.

S36/37/39 (P280): Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

S46 (P301 – P310): In caso d'ingestione consultare immediatamente il medico e mostrargli il contenitore o l'etichetta. Se la vittima è cosciente, lavare la bocca con acqua.

S56 (P273): Smaltire questo materiale e relativi contenitori in un punto di raccolta autorizzato per rifiuti pericolosi o speciali.

S63 (P304 – P340): In caso di incidente per inalazione, allontanare l'infortunato dalla zona contaminata e mantenerlo a riposo.

Tutti i campioni in esame, calibratori e controlli devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo capace di trasmettere HIV ed epatiti.

PER OGNI ALTRA INDICAZIONE, RICHIEDERE LA SCHEDA DI SICUREZZA AL PRODUTTORE.

SIMBOLOGIA

	Marchio CE (prodotto conforme ai requisiti della Dir. 98/79 CE)		
	Dispositivo medico diagnostico in vitro		Limiti temperatura di conservazione
	Consultare istruzioni per l'uso		Dimensione / numero test
REF	Numero di catalogo		Scadenza
LOT	Numero di lotto		Fabbricante

BIBLIOGRAFIA

Passing H, Bablok W. A New Biometrical Procedure for Testing the Equality of Measurements from Two different Analytical Methods. J ClinChemClinBiochem 1983;21: 709-720

Thomas L (Hrsg.) Labor und Diagnose, 4thed Marburg: Die medi-zinische Verlagsgesellschaft 1992:781