

Arbeitsanleitung / Manual

CRP ELISA Kit

*Zur in vitro Bestimmung des C-reaktiven Protein in Serum,
Plasma, Stuhl und Urin*

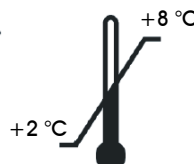
CRP ELISA Kit

*For the in vitro Determination of C-reactive Protein in serum,
plasma, stool and urine*

Gültig ab / Valid from 11.03.2011



K 9710s



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com

Inhaltsverzeichnis	Seite/Page
Table of content	2
1. VERWENDUNGSZWECK	3
2. EINLEITUNG	3
3. TESTPRINZIP	3
4. INHALT DER TESTPACKUNG	4
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	5
7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	5
8. PROBENVORBEREITUNG	7
9. TESTDURCHFÜHRUNG	7
HINWEISE	7
PIPETTIERSHEMA	8
10. ERGEBNISSE	10
10. ERGEBNISSE	10
11. EINSCHRÄNKUNGEN	11
12. QUALITÄTSKONTROLLE	11
ERWARTETE ERGEBNISSE	11
13. TESTCHARAKTERISTIKA	13
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	13
WIEDERFINDUNG	14
SENSITIVITÄT	14
LINEARITÄT	15
KREUZREAKTIVITÄTEN	15
14. LITERATUR	16
15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	16

Table of content	Page
1. INTENDED USE	19
2. CLINICAL RELEVANCE	19
3. PRINCIPLE OF THE TEST	19
4. MATERIAL SUPPLIED	20
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	20
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	21
7. PRECAUTIONS	21
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	22
9. ASSAY PROCEDURE	24
PROCEDURAL NOTES	24
TEST PROCEDURE	24
10. RESULTS	26
11. LIMITATIONS	28
12. QUALITY CONTROL	28
EXPECTED VALUES	28
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	30
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	30
RECOVERY	26
SENSITIVITY	31
LINEARITY	32
CROSS REACTIVITY	32
14. REFERENCES	33
15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	33

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von **CRP** aus Serum, Plasma, Urin und Stuhl geeignet. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Das **C-reaktive Protein (CRP)** wird vornehmlich in den Hepatozyten gebildet. Seine Syntheserate unterliegt dem Einfluss der am Entzündungsgeschehen beteiligten Zytokine. Die biologische Halbwertszeit wird auf 13-16 Stunden geschätzt. Die CRP-Serumkonzentration spiegelt besonders empfindlich entzündliche Aktivitäten z.B. bei akutem Fieber, Pneumonien und Myokardinfarkt wider.

In neueren Studien wird der Zusammenhang von Entzündungsreaktionen und kardiovaskulären Erkrankungen (Arteriosklerose, latente, chronischpersistierende Infekte) beschrieben. **CRP high-sensitive** als Entzündungsmarker dient zur Abschätzung eines Myokardinfarkts bzw. Schlaganfalls.

Die CRP-Bestimmung im Urin mittels hochsensitiver ELISA-Technik ermöglicht - zusammen mit α_2 -Makroglobulin - eine frühzeitige Screeningdiagnose in der Verlaufskontrolle von Nierentransplantationen. Die CRP-Messung gewährleistet ein einfach handhabbares Monitoring während Abstoßungstherapien. Die ELISA-Assays wurden über mehrere Jahre hinweg an mehreren hundert Patienten angewendet und durch den jeweiligen Goldstandard (Nierenbiopsie) in der diagnostischen Aussagefähigkeit überprüft.

Indikationen

- Prognosefaktor bei Myokardinfarkt oder Schlaganfall
- Entzündungsprozesse

3. TESTPRINZIP

Dieser Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) dient zur quantitativen Bestimmung des CRP aus Serum, Plasma, Stuhl und Urin. In diesem ELISA wird das CRP aus den Proben an polyklonale, auf Mikrotiterplatten fixierte Antikörper (Kaninchen anti human CRP) gebunden. Während eines Waschschrilles werden ungebundene Komponenten entfernt. Gebundenes CRP wird mit Hilfe eines Antikörper-Peroxidase/TMB-System detektiert. Nach Zugabe einer Stopplösung wechselt die Farbe von blau nach gelb. Die Farbentwicklung ist dabei zur nachgewiesenen Analytmenge (Probe bzw. Standard) proportional. Eine Standardkurve wird erstellt, aus der die Konzentrationen ermittelt werden.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 9710sMTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 9710sWP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	1 x 100 ml
K 9710sK	CONJ	POD Antikörper, (Kaninchen anti-human CRP, Peroxidase-markiert)	1 x 150 µl
K 9710sST	STD	Standards, gebrauchsfertig (0; 1.9; 5.6; 16.7; 50; 150 ng/ml)	6 x 1 ml
K 9710sKO1	CTRL	Kontrolle, gebrauchsfertig	1 x 1 ml
K 9710sKO2	CTRL	Kontrolle, gebrauchsfertig	1 x 1 ml
K 9710sPV	SAMPLEBUF	Probenpuffer, gebrauchsfertig	2 x 100 ml
K 9710sTMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 9710sAC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Die bei dem Test verwendeten Standards wurden am WHO-Referenzpräparat CRM 470 kalibriert.

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm

*Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055µS/cm bei 25°C (≤18,2MΩ cm).

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner als 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Der **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Das **CONJ** (Konjugat) wird **1:100** in Waschpuffer verdünnt (100 µl CONJ + 9900 µl Waschpuffer). Unverdünntes Konjugat ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

Serum- und Plasmaproben

Serum- und Plasmaproben (Normalpatienten: Erwachsene und Kinder) werden **1:100** bzw. **1:500** verdünnt: 10 µl Serum in 990 µl Verdünnungspuffer pipettieren (1:100) und mischen.

Patientenproben mit einer erhöhten CRP-Konzentration müssen 1:4000 – 1:8000 verdünnt werden. Zur Berechnung der CRP-Konzentration muss der Verdünnungsfaktor miteinkalkuliert werden. Andere Patientenkollektive werden entsprechend der erwarteten CRP Konzentration vorverdünnt.

Stuhlproben

Ca. **100 mg** Stuhl einwiegen und die genau eingewogene Stuhlmenge notieren und in **5 ml** Waschpuffer lösen (sehr gut mischen). Danach wird die Suspension für 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. 1 ml des Überstandes wird abgenommen, in ein Eppendorfröhrchen überführt und ein weiteres Mal in einer Eppendor fzentrifuge bei 13000 rpm für 5 min. zentrifugiert. Der erhaltene Überstand ist bei -20°C für ca. einen Monat haltbar.

Der Überstand wird vor jedem Testansatz für **2 Minuten** bei 13000 rpm in der Eppendor fzentrifuge zentrifugiert. Von dieser Endverdünnung werden dann **100 µl** in den Test eingesetzt.

Zur einfacheren Dosierung und Homogenisierung des Probenmaterials empfehlen wir das Probenvorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics/ Mannheim (Best. Nr. 745804).

Urinproben

Urinproben werden **1:5** im Verdünnungspuffer verdünnt.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Der Assay ist immer, nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung abzuarbeiten.

Pipettierschema

1.	Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen
2.	Die Positionen für STD (Standard) SAMPLE (Probe) CTRL (Kontrollen) im Protokollblatt markieren
3.	Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden
4.	Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
5.	100 µl STD (Standard) SAMPLE (Probe) CTRL (Kontrollen) in Doppelbestimmung in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
8.	100 µl CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren
9.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren

10. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
11. 100 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren
12. 10 - 20 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren*
13. 50 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen
14. Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer mit einer Messwellenlänge von 450 nm messen. Sofern die höchste Extinktion der Standards (STD) den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte die Messung sofort bei einer Messwellenlänge von 405 nm wiederholt und diese Ergebnisse für eine Auswertung herangezogen werden. Wenn möglich, sollten bei jeder Messung die Extinktionen der Messwellenlänge mit den Extinktionen einer Referenzwellenlänge verglichen werden. Zulässige Referenzwellenlängen sind z.B.: 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm und 690 nm

*Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

10. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.001).

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Stuhlproben

Die ermittelte CRP-Konzentration der Stuhlprobe wird wie im folgendem Beispiel berechnet:

Einwaage: 80 mg (1 ml Stuhl = 1 g) = 0,08 ml

Verdünnungsstufe 1: 5 ml / 0,08 ml = 62,5

Verdünnungsfaktor: 62,5

Die ermittelte Stuhlkonzentration wird mit **62,5** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu ermitteln. **Der Faktor ändert sich mit der Einwaage der Stuhlprobe.**

Serumproben und Plasmaproben

Die ermittelte Konzentration im Serum und Plasma wird mit **100 bzw. 500** multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu ermitteln. Bei einer Verdünnung von 1:4000 bzw. 1:8000 müssen die ermittelten Konzentrationen entsprechend mit 4000 bzw. 8000 multipliziert werden.

Urinproben

Die ermittelte Urinkonzentration wird mit **5** multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu ermitteln.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer CRP Konzentration größer dem größten Standard sollten verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden.

12. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen Kontrollen oder Serum/Urin Pools, bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Proben nicht gewährleisten.

Erwartete Ergebnisse

Normwerte

CRP-Konzentration **Serum/Plasma:**

< 1 mg/l niedriges KHK-Risiko

1-3 mg/l mittleres KHK-Risiko

> 3 mg/l hohes KHK-Risiko

*(Pearson et al., 2003)

CRP-Konzentration, **Stuhl:** < 56 ng/ml

CRP-Konzentration, **Urin:** < 6 ng/ml

Liegt die ermittelte CRP-Konzentration über 3 mg/l, sollte eine erneute Bestimmung nach 2 bis 3 Wochen erfolgen. Bei wiederholt erhöhtem Wert und nach Ausschluss einer anderen kausalen Ursache (akute Infektion, chronisch-entzündliche Erkrankungen anderer Genese), ist die ermittelte CRP-Konzentration für die Risikostratifizierung verwertbar. Besteht ein erhöhtes KHK (Koronare Herzkrankheit)-Risiko, sind zunächst umfangreiche Lebensstiländerungen zu empfehlen, evtl. zusätzlich medikamentöse Interventionen.

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

13. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Es wird die Reproduzierbarkeit von zwei Proben innerhalb einer Messserie geprüft. Zwei Normalproben wurden 20-mal in einem CRP ELISA von einer Person angesetzt.

Intra-Assay VK

n= 20

Probe	CRP Mittelwert [ng/ml]	Intra-Assay Vk [%]
1	23.3	6
2	99.4	5.5

Es wird die Reproduzierbarkeit von zwei Proben an unterschiedlichen Tagen geprüft. Zwei Normalproben wurden an verschiedenen Tagen und von verschiedenen Personen im CRP ELISA gemessen.

Inter-Assay VK

n= 15

Probe	CRP Mittelwert [ng/ml]	Inter-Assay Vk [%]
1	22.1	11.6
2	90.4	13.8

Wiederfindung

Zwei Proben mit bekannten CRP-Werten wurden mit vier verschiedenen CRP-Konzentrationen versetzt und gemessen.

Wiederfindung n=4

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	CRP erwartet [ng/ml]	CRP gemessen [ng/ml]
9,8	37,5	47,3	44,5
9,8	18,8	28,6	27,3
9,8	9,4	19,2	18,2
9,8	4,7	14,5	14,3
9,3	37,5	46,8	48,2
9,3	18,8	28,1	26,3
9,3	9,4	18,7	18,0
9,3	4,7	14,0	13,7

Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 18 mal der Standard Null von einer Person im CRP ELISA.

Nachweisgrenze n=18

Probe	CRP Mittelwert [OD]	Standard- abweichung	Nachweisgrenze [ng/ml]
1	0.005	0.001	0.921

Linearität

Zwei Proben wurden seriell verdünnt und vermessen. Gegenübergestellt sind die erwartete (berechnete) und die gemessene Konzentration.

n= 2

Probe	Verdünnung	Erwartet [µg/ml]	Gemessen [µg/ml]	Wiederfindung [%]
A	1:100	2.90	2.88	99.3
	1:200	1.45	1.55	106.8
	1:400	0.73	0.83	113.7
	1:800	0.36	0.39	108.3
	1:1600	0.18	0.18	100.0
B	1:200	10.80	10.80	100.0
	1:400	5.40	5.80	107.4
	1:800	2.70	2.90	107.4
	1:1600	1.35	1.61	119.3
	1:3200	0.68	0.83	122.1
	1:6400	0.33	0.35	106.1

Kreuzreaktivitäten

Alpha-1-Antitrypsin 0 %

Lysozym 0 %

Albumin 0 %

Andere Akutphaseproteine 0 %

Es wurde keine Kreuzreaktivität mit CRP im Mausserum gefunden.

14. LITERATUR

1. Koenig W et al. (2004) Circulation 109: 1349-1353
2. Pearson TA et al. (2003) Circulation 107 : 645-651
3. Ridker P et al. (2000) N Engl J Med 342: 836-843

15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Falls für die Herstellung der Testkomponenten Humanseren verwendet wurden, sind diese auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Testkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid/Thimerosal sind giftig. Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit der Haut oder der Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Alle im Test enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken oder, wenn vermerkt, zur *in vitro* Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Datums nicht mehr verwendet werden. Einzelkomponenten verschiedener Chargen dürfen nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller- der Immundiagnostik zurück zu senden.

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

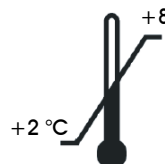
CRP ELISA Kit

*For the in vitro Determination of C-reactive Protein in serum,
plasma, stool and urine*

Valid from 11.03.2011



K 9710s



1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is a sandwich Enzyme Immuno Assay intended for the quantitative determination of **C-reactive Protein** in plasma, serum, stool and urine. It is for *in vitro* diagnostic use only.

2. CLINICAL RELEVANCE

C-reactive Protein (CRP) is mainly formed in hepatocytes. The synthesis rate of CRP is influenced by the cytokines involved in the inflammatory processes. The biological half-life time is estimated to be 13-16 hours. The serum CRP concentration reflects very sensitive acute fever, pneumonia and myocardial infarction.

Recent studies describe an association between inflammatory reactions and cardiovascular diseases like arteriosclerosis or latent and chronic persistent infections. As a marker for inflammation, **CRP high-sensitive** can be used to predict the risk of myocardial infarction and stroke.

The CRP determination in urine using the high sensitive ELISA method allows - together with α_2 -Macroglobulin - an early screening diagnose after kidney transplantations. The CRP kit provides an easy-to-use assay for monitoring anti-rejection therapies. The ELISA-assay was used for years to test hundreds of patients. Its predictive diagnostic value was compared with the gold standard (kidney biopsy).

Indications

- Prognosis factor for myocardial infarction or stroke
- Inflammatory processes

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This Enzyme Immuno Assay is a sandwich assay for the determination of CRP in serum, plasma, urine and stool samples. The wells of the microtitre plate are coated with polyclonal antibodies directed against C-reactive Protein. In a first incubation step, the CRP in the samples is bound to the coated polyclonal rabbit antibodies (in excess). To remove all unbound substances, a washing step is carried out.

In a second incubation step, a Peroxidase-labeled CRP (PO-Antibody, polyclonal, rabbit-anti-CRP) antibody is added. After another washing step, to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate, Tetramethylbenzidine (TMB). An acidic stopping solution is then added. The color converts to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of CRP in the sample. A dose response curve of the absorbance (at 450 nm) unit vs. concentration is generated. CRP, present in the patient samples, is determined directly from this calibration curve.

The combination of two specific antibodies in the CRP ELISA drastically reduces the possibility of wrong-negatives results and offers a secure diagnostic system to the user.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit Components	Quantity
K 9710sMTP	PLATE	Micro titre plate with precoated strips	12 x 8 wells
K 9710sWP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	1 x 100 ml
K 9710sK	CONJ	POD antibody, (rabbit-anti-CRP, Peroxidase-labeled)	1 x 150 µl
K 9710sST	STD	Calibrators, ready to use (0; 1.9; 5.6; 16.7; 50; 150 ng/ml)	6 x 1 ml
K 9710sKO1	CTRL	Control, ready-to-use	1 x 1 ml
K 9710sKO2	CTRL	Control, ready-to-use	1 x 1 ml
K 9710sPV	SAMPLEBUF	Sample buffer, ready to use	2 x 100 ml
K 9710sTMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K 9710sAC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

The CRP calibrators were standardized against WHO standard 470.

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Laboratory balance
- Precision pipettors calibrated and tips to deliver 10-1000 µl
- Covering foil for the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 nm

*Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0,2 µm) with an electrical conductivity of 0,055µS/cm at 25°C (≤18,2MΩ cm).

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at 37°C using a water bath before dilution. The **buffer concentrate** is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month**.
- The **CONJ** (conjugate) must be diluted **1: 100** in wash buffer (100 µl CONJ + 9900 µl wash buffer). The undiluted conjugate is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. **Diluted conjugate is not stable and can not be stored.**
- All other test reagents are ready to use. The test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8°C**.

7. PRECAUTIONS

- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum, plasma

Collection and storage of serum: Collect sufficient blood (at least 1 ml) by venipuncture into a tube or a plastic syringe, avoid hemolysis, centrifuge for 15 minutes at 1,000 x g and 4°C and collect the serum.

Collection and storage of plasma: Collect sufficient blood (at least 1 ml) by venipuncture into an EDTA venipuncture tube or a plastic syringe, centrifuge for 15 minutes at 1,000 x g and 4°C within 10 minutes after blood collection and separate the plasma from the cells.

Serum and plasma samples have to be diluted 1:100 or 1:500 before performing the assay.

Add **10 µl** serum /plasma to **990 µl** dilution buffer, mix well. (1:100)

Use the dilution factor (100 or 500) to calculate the CRP concentration read off the calibration curve.

Patient's samples with elevated CRP-concentrations must be diluted 1:4000 – 1:8000. Samples of other patient collectives must be diluted according to the expected CRP-concentration. The corresponding dilution factor must be used for calculation of the CRP-concentration.

Faeces

The test can be performed on either fresh or frozen stool samples. The samples should be refrigerated and can be stored at 2-8°C for 2 days. If the test cannot be performed within this period, the specimen should be stored at -20°C or colder.

Add a stool sample of about **100 mg** (size of a pea, please note the exact weight for the calculation) to **5 ml** of the ELISA wash buffer and homogenize very thoroughly for 15 seconds on a Vortex-mixer. Centrifuge the suspension for 10 min at 3000 rpm. Pipet 1 ml of the supernatant into an Eppendorf tube and centrifuge at 13,000 rpm for **2 min**. The supernatant can be stored at -20°C for about 1 month. **100 µl** of this supernatant is used in the assay.

Immundiagnostik recommends for sample preparation the use of Roche Diagnostics / Mannheim sample preparation tubes, article No. 745804.

Urine

Urine samples must be diluted **1:5** with dilution buffer.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Test procedure

1.	Prior to use in the assay allow all reagents and samples to come to room temperature (18-26 °C) and mix well
2.	Mark the positions of STD (Standard) SAMPLE (Sample) CTRL (Controls) on a protocol sheet
3.	Take microtiter strips out of the kit. Store unused strips covered at 2-8° C. Strips are stable until the expiry date stated on the label
4.	Wash each well 5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper
5.	Add 100 µl of STD (Standard) SAMPLE (Sample) CTRL (Controls) in duplicate into respective well
6.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer

7.	Discard the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper
8.	Add 100 µl CONJ (conjugate) into each well
9.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer
10.	Discard the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper
11.	Add 100 µl of SUB (substrate) into each well
12.	Incubate for 10 - 20 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark*
13.	Add 50 µl of STOP (stop solution) into each well, mix thoroughly
14.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm . If the highest extinction of the standards (STD) is above the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm and the obtained results used for evaluation. If possible, the extinctions from each measurement should be compared with extinctions obtained at a reference wavelength, e. g. 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm and 690 nm can be used

*The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend to observe the colour change and to stop the reaction upon good differentiation.

10. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend to use the "4-Parameter-algorithm".

1. 4-parameter-algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.001).

2. Point-to-point-calculation

We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for concentration.

3. Spline-algorithm

We recommend a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.001).

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

Faecal specimen

Example for calculation of the CRP concentration in faecal specimen

Weight: 80 mg (1ml stool = 1g) = 0.08 ml

Dilution step 1: 5 ml / 0,08 ml = 62.5

Dilution factor: 62.5

Multiply the results with the calculated dilution factor (in this case 62.5) to get the CRP concentration of the stool samples. **Please note:** the dilution factor depends on the weight of the used faecal specimen.

Serum, plasma

The value read from the calibration curve must be multiplied by **100** or **500** respectively to get the CRP concentration in serum/plasma samples.

If samples were diluted 1:4000 or 1:8000, the estimated values must be multiplied by 4000 or 8000 respectively.

Urine

The measured CRP concentration must be multiplied by factor **5** to get the actual concentration of the samples.

11. LIMITATIONS

Samples with CRP levels greater than the highest calibrator value should be diluted and re-assayed.

12. QUALITY CONTROL

Control samples should be analyzed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid, if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

Expected values

Normal ranges

CRP-Concentration, **Serum/plasma:**

- < 1 mg/l low CHD-Risk
- 1-3 mg/l medium CHD-Risk
- > 3 mg/l high CHD-Risk

*(Pearson et al., 2003)

CRP-Concentration, **Stool:** < 56 ng/ml

CRP-Concentration, **Urine:** < 6 ng/ml

If the CRP-concentration is found to be higher than 3 mg/l, a second determination should be made within 2 to 3 weeks. If the CRP-concentration is again high, and other reasons are excluded (acute infection, chronic-inflammatory diseases), the obtained CRP-concentration can be used for risk stratification in coronary heart disease (CHD) patients. If the CHD risk is high, the lifestyle should be changed together with medical treatment. These normal ranges should be used as a guideline only.

It is recommended that each laboratory establishes an own expected range for its patient population.

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

The precision (intra-assay variation) of the Immundiagnostik CRP ELISA test was calculated from 20 replicate determinations on each one of two samples.

Intra-Assay CV

n= 20

Sample	CRP Mean value [ng/ml]	Intra-Assay CV [%]
1	23.3	6
2	99.4	5.5

The total precision (inter-assay variation) of the Immundiagnostik CRP ELISA test was calculated from data on 2 samples obtained in 15 different assays by three technicians on two different lots of reagents over a period of three months.

Inter-Assay

CV n= 15

Sample	CRP Mean value [ng/ml]	Inter-Assay CV [%]
1	22.1	11.6
2	90.4	13.8

Recovery

Two samples with known CRP concentration were spiked with four different amounts of CRP and measured.

Recovery n=4

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	CRP expected [ng/ml]	CRP measured [ng/ml]
9.8	37.5	47.3	44.5
9.8	18.8	28.6	27.3
9.8	9.4	19.2	18.2
9.8	4.7	14.5	14.3
9.3	37.5	46.8	48.2
9.3	18.8	28.1	26.3
9.3	9.4	18.7	18.0
9.3	4.7	14.0	13.7

Sensitivity

The sensitivity was set as $B_0 + 2 \text{ SD}$. The zero-standard was measured 18 times.

n=18

Sample	CRP Mean value [OD]	Standard variation	Detection limit [ng/ml]
1	0.005	0.001	0.921

Linearity

Two patient samples were diluted and analyzed. The results are shown below:

n= 2

Sample	Dilution	Expected [µg/ml]	Measured [µg/ml]	Recovery [%]
A	1:100	2.90	2.88	99.3
	1:200	1.45	1.55	106.8
	1:400	0.73	0.83	113.7
	1:800	0.36	0.39	108.3
	1:1600	0.18	0.18	100.0
B	1:200	10.80	10.80	100.0
	1:400	5.40	5.80	107.4
	1:800	2.70	2.90	107.4
	1:1600	1.35	1.61	119.3
	1:3200	0.68	0.83	122.1
	1:6400	0.33	0.35	106.1

Cross reactivity

Alpha-1-Antitrypsin 0 %

Lysozym 0 %

Albumin 0 %

Other acute phase proteins 0 %

No cross reactivity with CRP in mouse serum was observed.

14. REFERENCES

1. Koenig W et al. (2004) Circulation 109: 1349-1353
2. Pearson TA et al. (2003) Circulation 107 : 645-651
3. Ridker P et al. (2000) N Engl J Med 342: 836-843

15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number