

Arbeitsanleitung / Manual

CRP ELISA Kit

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

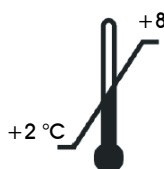
CRP ELISA Kit

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

Gültig ab / Valid from 06.04.2010



K 9720s



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	6
9. TESTDURCHFÜHRUNG	6
HINWEISE	6
PIPETTIERSHEMA	7
10. ERGEBNISSE	9
10. ERGEBNISSE	9
11. EINSCHRÄNKUNGEN	10
12. QUALITÄTSKONTROLLE	10
ERWARTETE ERGEBNISSE	10
13. TESTCHARAKTERISTIKA	11
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	11
SENSITIVITÄT	11
LINEARITÄT	12
KREUZREAKTIVITÄTEN	12
14. LITERATUR	13
15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	13

Table of content	Page
1. INTENDED USE	16
2. CLINICAL RELEVANCE	16
3. PRINCIPLE OF THE TEST	16
4. MATERIAL SUPPLIED	17
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	17
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	18
7. PRECAUTIONS	18
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	19
9. ASSAY PROCEDURE	20
PROCEDURAL NOTES	20
TEST PROCEDURE	20
10. RESULTS	22
11. LIMITATIONS	23
12. QUALITY CONTROL	23
EXPECTED VALUES	23
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	24
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	24
SENSITIVITY	24
LINEARITY	25
CROSS REACTIVITY	25
14. REFERENCES	26
15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	26

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 Entzündungs-geschehen beteiligten Zytokine. Die biologische Halbwertszeit wird auf 13-16 Stunden geschätzt. Die CRP-Konzentrationen im Serum Gesunder liegen unter 5 mg/l. Die CRP-Serumkonzentration spiegelt damit 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, chronische-persistierende Infekte) beschrieben. **CRP high-sensitive** als Entzündungs-marker dient zur Abschätzung eines Myokardinfarkts bzw. Schlaganfalls.

Die CRP-Bestimmung im Urin mittels hochsensitiver ELISA-Technik ermöglicht - zusammen mit α_2 -Makroglobulin - eine frühzeitige Screening-diagnose 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. Anhand eines mitgeführten Kalibrators und dessen Bezug zu einer chargenabhängigen Mustereichkurve lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 9720sMTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 9720sWP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	1 x 100 ml
K 9720sK	CONJ	POD Antikörper, (Kaninchen anti-human CRP, Peroxidase-markiert)	1 x 150 µl
K 9720sCAL	CAL	Kalibrator, gebrauchsfertig	1 x 1 ml
K 9720sKO1	CTRL	Kontrolle, gebrauchsfertig	1 x 1 ml
K 9720sKO2	CTRL	Kontrolle, gebrauchsfertig	1 x 1 ml
K 9720sPV	SAMPLEBUF	Probenpuffer, gebrauchsfertig	2 x 100 ml
K 9720sTMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 9720sAC	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

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler mit Inkubator für 37 °C
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

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.
- Das **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), 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.
- Als **BLANK** (Leerwert) werden **100 µl** des vorbereiteten und 1:10 verdünnten Waschpuffer pipettiert.
- 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 VORSICHTSMASSENNAHMEN

- 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 vorverdünnt 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** des Waschpuffers 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 Pipettier volumina 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.	Positionen für BLANK/CAL/CTRL/SAMPLE (Leewert / Kalibrator / Kontrollen / Probe) in Doppelbestimmung am 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 für BLANK/CAL/CTRL/SAMPLE (Leewert / Kalibrator / Kontrollen / Probe) in die jeweiligen Vertiefungen 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 bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gelesen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden

*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

Für die Auswertung der Messwerte verwenden Sie bitte ein 4-parametrisches Logit-Log Model unter Verwendung der Angaben zu dem Verlauf der Kalibrationskurve sowie der optischen Dichte des Kalibrators (CAL), welche auf dem QC-Datenblatt der jeweiligen Kitcharge zu finden sind.

Abhängig von der verwendeten Software kann der Kalibrationskurvenverlauf sowohl durch die Parameter A, B, C und D als auch durch die Wertepaare aus Konzentration und optischer Dichte der Standards beschrieben werden.

Achtung: Die Parameterwerte müssen genau eingegeben werden, da selbst geringe Abweichungen der Zahlenwerte zu massiven Störungen der Auswertung führen können.

Nach jeder Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte diese der Operator durchführen.

Stuhlproben

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

Einwaage: 80 mg (1ml Stuhl = 1g) = 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 Vorverdünnung 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 mit Waschpuffer 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

*(Person 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

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 akutphase Proteine 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 wurde, sind diese auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme 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

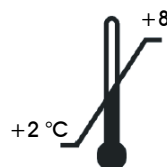
CRP ELISA Kit

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

Valid from 06.04.2010



K 9720s



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 is determined by the influence of cytokines involved in inflammatory processes. The biological half-life is estimated to be 13-16 hours.

A connection between inflammatory reactions and cardiovascular diseases such as arteriosclerosis and latent or chronically persisting infections has been described in recent studies. The **CRP** concentrations of healthy persons are under 5 µg/ml. As an acute phase protein, **CRP** is released within 24 hours after an inflammatory process has started (fever, pneumonia, myocardial infarction, etc.). **CRP** has been established as a marker for inflammation.

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. Samples are quantified by referring their optical density to a Lot-dependant master calibration curve and the use of a Calibrator that is run with each test.

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 9720sMTP	PLATE	Micro titre plate with precoated strips	12 x 8 wells
K 9720sWP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	1 x 100 ml
K 9720sK	CONJ	POD antibody, (rabbit-anti-CRP, Peroxidase-labeled)	1 x 150 µl
K 9720sCAL	CAL	Calibrator, ready-to-use	1 x 1 ml
K 9720sKO1	CTRL	Control, ready-to-use	1 x 1 ml
K 9720sKO2	CTRL	Control, ready-to-use	1 x 1 ml
K 9720sPV	SAMPLEBUF	Sample buffer, ready to use	2 x 100 ml
K 9720sTMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K 9720sAC	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

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Laboratory balance
- Precision pipettors calibrated and tips to deliver 10-1000 µl
- Covering foil for the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker with 37 °C incubator
- 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 (reference wave length 620 or 690 nm)

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 aqua bidest. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), 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**.
- Use **100 µl of diluted wash buffer as a BLANK**. Pipette into the respective well.
- 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 BLANK/CAL/CTRL/SAMPLE (Blank / Calibrator / Controls / Sample) in duplicate 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 BLANK/CAL/CTRL/SAMPLE (Blank / Calibrator / Controls / Sample) 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 against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference

*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

For result evaluation, please use a four parametric logit-log model based on the standard curve of the respective kit lot and the Calibrator value (CAL). All essential information on the standard curve is provided on the QC data sheet of the respective product lot.

The calibration curve can be expressed either by the concentration of each standard with its corresponding optical density or by the four parameters A, B, C and D. In both cases the optical density of the calibrator (CAL) is essential.

Depending on your evaluation software program, either the one or the other kind of data described above should be entered.

Caution: Please make sure that all parameters and values are transferred accurately into your software as minor deviations can cause severe errors during evaluation.

The plausibility of replicate values should always be examined after automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the replicate values should be done manually by the operator.

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

*(Person 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

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