

Arbeitsanleitung / Manual

CRP ELISA Kit

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

CRP ELISA Kit

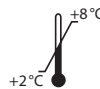
For the in vitro determination of C-reactive protein in serum, plasma, stool and urine

EU: IVD / CE

US: Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Gültig ab / Valid from 01.07.2014

REF K 9720S



IVD **CE**



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

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	2
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	3
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	4
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	8
9. EINSCHRÄNKUNGEN	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	9
<i>Referenzwerte</i>	9
11. TESTCHARAKTERISTIKA	10
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	10
<i>Spike-Wiederfindung</i>	10
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	11
<i>Analytische Sensitivität</i>	11
<i>Spezifität</i>	11
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	12
13. TECHNISCHE MERKMALE	12
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	13
15. LITERATUR	13

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, 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 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. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 9720s MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8
K 9720s WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	1 x 100 ml
K 9720s K	CONJ	POD Antikörper, (Kaninchen-anti-human-CRP, Peroxidase-markiert)	1 x 150 μ l
K 9720s CAL	CAL	Kalibrator, gebrauchsfertig	1 x 1 ml
K 9720s KO1	CTRL	Kontrolle, gebrauchsfertig	1 x 1 ml
K 9720s KO2	CTRL	Kontrolle, gebrauchsfertig	1 x 1 ml

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 9720s PV	SAMPLEBUF	Probenpuffer, gebrauchsfertig	2 x 100 ml
K 9720s TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 9720s AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

* Der bei dem Test verwendete Kalibrator wurde am WHO-Referenzpräparat CRM 470 kalibriert.

4. 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
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* 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 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits 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 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur

bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** (Waschpuffer) ist bei **2–8°C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

- Als **BLANK** (Leerwert) werden **100 µl Waschpuffer** (verdünnter WASHBUF) pipettiert.
- Das **Konjugatkonzentrat** (CONJ) wird unmittelbar vor Gebrauch **1:101 in Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das Konzentrat 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.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Serum- und Plasmaprobe

Probengewinnung und -lagerung

Serumgewinnung: Nehmen Sie mindestens 1 mL venöses Blut ab und fangen Sie es in einem Röhrchen oder einer Kunststoff-Spritze auf. Vermeiden Sie Hämolyse. Lassen Sie das Gefäß 15 min stehen und zentrifugieren Sie anschließend für 15 min bei 1000g und 4°C. Pipettieren Sie danach das Serum in ein separates Gefäß.

Plasmagewinnung: Nehmen Sie mindestens 1 mL venöses Blut ab und fangen Sie es in einem EDTA-Röhrchen auf. Vermeiden Sie Hämolyse. Lassen Sie das Röhrchen 15 min stehen und zentrifugieren Sie es anschließend für 15 min bei 1000g und 4°C. Pipettieren Sie danach das Plasma in ein separates Gefäß.

Lagerung: Serumproben können bei -80°C bis zu 11 Jahre gelagert werden.*

*A. P. Doumatey et al. 2014.

Probenverdünnung

Serum- und Plasmaprobe (Normalpatienten: Erwachsene und Kinder) werden **1:100** bzw. **1:500** verdünnt: **10 µl Serum in 990 µl SAMPLEBUF** (Probenpuffer) 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.

Urinproben

Urinproben werden **1:5** im **SAMPLEBUF (Probenpuffer)** verdünnt.

Stuhlproben

Lagerung

Die Proben sind gekühlt aufzubewahren und können bei **2-8°C 2 Tage** gelagert werden. Wird der Test nicht innerhalb dieser Zeit durchgeführt, sollten die Proben bei -20°C oder -80°C gelagert werden.

Extraktion

Der **verdünnte WASHBUF (Waschpuffer)** wird als Probenextraktionspuffer verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

Stuhlaufbereitungssystem (SAS) (Artikel-Nr. K 6998SAS)

Stuhlröhrchen - Anwendung

Bitte beachten Sie, dass der Verdünnungsfaktor der Stuhlsuspension von der aufgenommenen Stuhlmenge und dem Puffervolumen abhängig ist:

SAS mit 0,75 ml Puffer:

Aufgenommene Stuhlmenge:	15 mg
Puffervolumen:	0,75 ml
Verdünnungsfaktor:	1:50

Die Aufbereitung von Stuhlproben mit Hilfe des SAS wird wie folgt durchgeführt:

- Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o.Ä.
- Das **unbefüllte Stuhlröhrchen** vor der Verwendung mit **0,75 ml** gebrauchsfertigem Waschpuffer **befüllen**. Wichtig: Puffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- Röhrchen aufschrauben (orangefarbenes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstecken in die Stuhlprobe vollkommen mit Probe bedeckt werden müssen. Anschließend das Stäbchen durch den Abstreifring zurück ins Röhrchen stecken (leichter Widerstand) und fest verschrauben.
- Das Röhrchen solange mischen bis keine Stuhlreste mehr in den Einker-

bungen auszumachen sind. Für die Erhebung valider Messwerte ist darauf zu achten, dass die Stuhlsuspension nach dem Mischungsprozess eine möglichst homogene Konsistenz aufweist. Bei besonders festen Stühlen kann die Homogenität der Suspension durch längeres „Einweichen“ (ca. 10 min) des Stuhls in Extraktionspuffer bedeutend gesteigert werden.

- e) Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u. Ä. können hierbei vernachlässigt werden.
- f) Anschließend wird der gesamte Kopf des Stuhlröhrchens – blauer Ring zusammen mit dem Stäbchen – vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Beim Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

Verdünnung 1:50

Der erhaltene Überstand ist bei **-20°C** für ca. **einen Monat haltbar**.

Der Überstand wird vor jedem Testansatz in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und für 2 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. **100 µl** des Extrakts werden pro well im Test eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

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. Kalibrator) proportional. Anhand eines mitgeführten Kalibrators und dessen Bezug zu einer chargenabhängigen Musterkalibrierkurve lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

Vor Gebrauch alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (15–30°C) bringen, gut mischen.

Die Positionen für CAL/BLANK/SAMPLE/CTRL (Kalibrator,/Leerwert/Probe/Kontrolle) im Protokollblatt markieren

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen, nicht verwendete können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8°C gelagert werden.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen 5x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	100 µl CAL/BLANK/SAMPLE/CTRL (Kalibrator/Leerwert/Probe/Kontrolle) in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30°C) unter Schütteln inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	100 µl verdünntes CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30°C) unter Schütteln inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren.
9.	10 - 20 min.* bei Raumtemperatur (15-30°C) im Dunkeln inkubieren.
10.	100 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, mischen.
11.	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 gemessen. 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.

8. ERGEBNISSE

Für die Auswertung der Messwerte verwenden Sie bitte ein 4-parametrisches Logit-Log-Modell unter Verwendung der Angaben zum 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.

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.

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.

Stuhlproben

Die ermittelte Stuhlkonzentration wird mit **50** multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu ermitteln.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs müssen stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Kalibrationskurve × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

Analytische Sensitivität × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

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

Referenzwerte

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 Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 20)

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

Probe	CRP [ng/ml]	VK [%]
1	23,3	6
2	99,4	5,5

Inter-Assay (n = 15)

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.

Probe	CRP [ng/ml]	VK [%]
1	22,1	11,6
2	90,4	13,8

Spike-Wiederfindung

Zwei Proben mit bekannten CRP-Werten wurden mit vier verschiedenen CRP-Konzentrationen versetzt und gemessen. (n = 4).

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

Wiederfindung in der Verdünnung

Zwei Proben wurden seriell verdünnt und vermessen. Gegenübergestellt sind die erwartete (berechnete) und die gemessene Konzentration. (n = 2)

Probe	Verdünnung	CRP erwartet [ng/ml]	CRP gemessen [ng/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

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 18-mal der Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 0,921 ng/ml.

Spezifität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu anderen Serumproteinen gefunden.

- Alpha-1-Antitrypsin 0 %
- Lysozym 0 %
- Albumin 0 %
- Andere Akutphaseproteine 0 %
- Es wurde keine Kreuzreaktivität mit CRP im Mausserum gefunden.

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- 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.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG 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 AG, zurückzusenden.

15. LITERATUR

1. Doumatey, Ayo P, Jie Zhou, Adebowale Adeyemo, and Charles Rotimi. 2014. "High Sensitivity C-Reactive Protein (Hs-CRP) Remains Highly Stable in Long-Term Archived Human Serum." *Clinical Biochemistry* **47** (4-5) (March): 315–8. doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.12.014.
2. Koenig, Wolfgang, Hannelore Löwel, Jens Baumert, and Christa Meisinger. 2004. "C-Reactive Protein Modulates Risk Prediction Based on the Framingham Score: Implications for Future Risk Assessment: Results from a Large Cohort Study in Southern Germany." *Circulation* **109** (11) (March 23): 1349–53. doi:10.1161/01.CIR.0000120707.98922.E3.
3. Pearson, T. a. 2003. "American Heart Association Guide for Improving Cardiovascular Health at the Community Level: A Statement for Public Health Practitioners, Healthcare Providers, and Health Policy Makers From the American Heart Association Expert Panel on Population and Pre." *Circulation* **107** (4) (February 4): 645–651. doi:10.1161/01.CIR.0000054482.38437.13.
4. Ridker, P M, C H Hennekens, J E Buring, and N Rifai. 2000. "C-Reactive Protein and Other Markers of Inflammation in the Prediction of Cardiovascular Disease in Women." *The New England Journal of Medicine* **342** (12) (March 23): 836–43. doi:10.1056/NEJM200003233421202.
5. Salzer, Jonatan, Göran Hallmans, Maria Nyström, Hans Stenlund, Göran Wadell, and Peter Sundström. 2013. "Vitamin A and Systemic Inflammation as Protective

Factors in Multiple Sclerosis." *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*
19 (8) (July 18): 1046–51. doi:10.1177/1352458512472752.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

CRP ELISA Kit

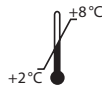
*For the in vitro determination of C-reactive protein in
serum, plasma, stool and urine*

EU: IVD / CE

US: Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Valid from 01.07.2014

REF **K 9720S**



IVD **CE**



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

Table of Contents

1. INTENDED USE	17
2. INTRODUCTION	17
3. MATERIAL SUPPLIED	17
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	18
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	19
7. ASSAY PROCEDURE	21
<i>Principle of the test</i>	21
<i>Test procedure</i>	21
8. RESULTS	22
9. LIMITATIONS	23
10. QUALITY CONTROL	24
<i>Reference range</i>	24
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	24
<i>Precision and reproducibility</i>	24
<i>Spiking Recovery</i>	25
<i>Dilution recovery</i>	25
<i>Analytical Sensitivity</i>	26
<i>Specificity</i>	26
12. PRECAUTIONS	26
13. TECHNICAL HINTS	27
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	27
15. REFERENCES	28

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. INTRODUCTION

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. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 9720s MTP	PLATE	Micro titer plate with precoated strips	12 x 8 wells
K 9720s WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	1 x 100 ml
K 9720s K	CONJ	Conjugate, (rabbit-anti-CRP-antibody, peroxidase-labeled)	1 x 150 μ l
K 9720s CAL	CAL	Calibrator*, ready to use, (0; 1.9; 5.6; 16.7; 50; 150 ng/ml)	1 x 1 ml
K 9720s KO1	CTRL	Control, ready to use	1 x 1 ml
K 9720s KO2	CTRL	Control, ready to use	1 x 1 ml
K 9720s PV	SAMPLEBUF	Sample buffer, ready to use	2 x 100 ml

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K9720s TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K9720s AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

*The CRP calibrators were standardized against WHO standard 470.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Laboratory balance
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 g
- Vortex
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* 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 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** 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 **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted **1:10 in ultra pure water** before use (100 ml concentrate + 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 room temperature or 37 °C before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted buffer solution** (wash buffer) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for one month**.

- Use **100 µl** of **diluted WASHBUF** (wash buffer) as **BLANK**. Pipet into the respective well.
- The **conjugate concentrate** (CONJ) must be diluted **1:101 in wash buffer** (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The concentrate is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted conjugate is not stable and cannot be stored.**
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Serum, plasma

Collection and storage

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

Collection of plasma: Collect sufficient blood (at least 1 ml) by venipuncture into an EDTA venipuncture tube or a plastic syringe, allow to stand for 15 min, centrifuge for 15 min at 1,000 x g and 4 °C and separate the plasma from the cells.

Storage: Serum samples can be stored at -80 °C for 11 years.*

*A. P. Doumatey et al. 2014.

Sample dilution

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 SAMPLEBUF** (sample 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.

Urine

Urine samples must be diluted **1:5 with SAMPLEBUF** (sample buffer).

Stool

Storage

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.

Extraktion

Diluted WASHBUF (washbuffer) is used as a sample extraction buffer. We recommend the following sample preparation:

Stool Sample Application System (SAS) (Cat. No.: K 6998SAS)

Stool sample tube – Instructions for use

Please note that the dilution factor of the final stool suspension depends on the amount of stool sample used and the volume of the buffer.

SAS with 0,75 ml extraction buffer:

Applied amount of stool:	15 mg
Buffer Volume:	0,75 ml
Dilution Factor:	1:50

Please follow the instructions for the preparation of stool samples using the SAS as follows:

- a) The raw stool sample has to be thawed. For particularly heterogeneous samples we recommend a mechanical homogenisation using an applicator, inoculation loop or similar device.
- b) Fill the **empty sample tube** with **0,75 ml** of ready to use **washbuffer** before using it with the sample. Important: Allow the extraction buffer to reach room temperature.
- c) Unscrew the tube (orange part of cap) to open. Insert the orange dipstick into the sample. The lower part of the dipstick has notches which need to be covered completely with stool after inserting it into the sample. Place dipstick back into the tube. When putting the stick back into the tube, excess material will be stripped off, leaving 15 mg of sample to be diluted. Screw tightly to close the tube.
- d) Shake the tube well until no stool sample remains in the notches. Important: Please make sure that you have a maximally homogenous suspension after shaking. Especially with more solid samples, soaking the sample in the tube with buffer for ~ 10 minutes improves the result.

- e) Allow sample to stand for ~10 minutes until sediment has settled. Floating material like shells of grains can be neglected.
- f) Carefully unscrew the complete cap of the tube including the blue ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure that the sediment will not be dispersed again.

Dilution: **1:50**

The extract can be stored **1 month at -20°C**. Before analyzing it in the test, the suspension should be centrifuged for **2 min at 13,000 rpm** in an 1.5 ml reaction tube.

100 µl per well of this supernatant is used in the assay.

7. ASSAY PROCEDURE

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 microtiter 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 antibody (polyclonal, rabbit-anti-CRP) is added. After another washing step, to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate, Tetramethylbenzidine. 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.

Test procedure

Bring all reagents and samples to room temperature (15–30°C) and mix well.

Mark the positions of CAL (Calibrator) SAMPLE (Sample) CTRL (Controls) and BLANK (Blank) on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips as needed from kit. Store unused strips covered at 2–8°C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Wash each well 5 x by dispensing 250 µl of diluted WASHBUF (wash-buffer) into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add 100 µl of CAL (Calibrator) SAMPLE (Sample) CTRL (Controls) and BLANK (Blank) into respective well.
3.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (15-30°C) on a horizontal shaker.
4.	Discard the contents of each well. Wash each well 5 x by dispensing 250 µl of diluted WASHBUF (washbuffer) into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add 100 µl diluted CONJ (conjugate) into each well.
6.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (15-30°C) on a horizontal shaker.
7.	Discard the contents of each well. Wash each well 5 x by dispensing 250 µl of diluted WASHBUF (washbuffer) into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
8.	Add 100 µl of SUB (substrate) into each well.
9.	Incubate for 10 - 20 min.* at room temperature (15-30°C) in the dark*.
10.	Add 100 µl of STOP (stop solution) into each well, mix.
11.	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 color change is temperature sensitive. We recommend observing the color change and stopping the reaction upon good differentiation.

8. 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 the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

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.

Stool

The measured CRP concentration must be multiplied by factor **50** to get the actual concentration of the samples.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result with the dilution factor used.

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range must be further diluted and re-assayed. Please consider this greater dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range cannot be clearly quantified.

The upper limit of the measurement range can be calculated as:

highest concentration of the standard curve × sample dilution factor to be used

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

detection limit × sample dilution factor to be used

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed 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.

Reference range

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.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 20)

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

Sample	CRP [ng/ml]	CV [%]
1	23.3	6
2	99.4	5.5

Inter-Assay (n = 15)

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.

Sample	CRP [ng/ml]	CV [%]
1	22,1	11,6
2	90,4	13,8

Spiking Recovery

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

Sample	Unspiked Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	CRP expected [ng/ml]	CRP measured [ng/ml]
1	9.8	37.5	47.3	44.5
		18.8	28.6	27.3
		9.4	19.2	18.2
		4.7	14.5	14.3
2	9.3	37.5	46.8	48.2
		18.8	28.1	26.3
		9.4	18.7	18.0
		4.7	14.0	13.7

Dilution recovery

Two patient samples were diluted and analyzed. The results are shown below (n = 2):

Sample	Dilution	CRP expected [ng/ml]	CRP measured [ng/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

Sample	Dilution	CRP expected [ng/ml]	CRP measured [ng/ml]	Recovery [%]
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

Analytical Sensitivity

The Zero-standard was measured 18 times. The detection limit was set as $B_0 + 2 \text{ SD}$ and estimated to be 0,921 ng/ml.

Specificity

No cross reactivity to other serum proteins was observed.

Alpha-1-Antitrypsin	0 %
Lysozym	0 %
Albumin	0 %
Other acute phase proteins	0 %

No cross reactivity with CRP in mouse serum was observed.

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- 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 ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any

spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analyzed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- 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 incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Doumatey, Ayo P, Jie Zhou, Adebowale Adeyemo, and Charles Rotimi. 2014. "High Sensitivity C-Reactive Protein (Hs-CRP) Remains Highly Stable in Long-Term Archived Human Serum." *Clinical Biochemistry* **47** (4-5) (March): 315–8. doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.12.014.
2. Koenig, Wolfgang, Hannelore Löwel, Jens Baumert, and Christa Meisinger. 2004. "C-Reactive Protein Modulates Risk Prediction Based on the Framingham Score: Implications for Future Risk Assessment: Results from a Large Cohort Study in Southern Germany." *Circulation* **109** (11) (March 23): 1349–53. doi:10.1161/01.CIR.0000120707.98922.E3.
3. Pearson, T. a. 2003. "American Heart Association Guide for Improving Cardiovascular Health at the Community Level: A Statement for Public Health Practitioners, Healthcare Providers, and Health Policy Makers From the American Heart Association Expert Panel on Population and Pre." *Circulation* **107** (4) (February 4): 645–651. doi:10.1161/01.CIR.0000054482.38437.13.
4. Ridker, P M, C H Hennekens, J E Buring, and N Rifai. 2000. "C-Reactive Protein and Other Markers of Inflammation in the Prediction of Cardiovascular Disease in Women." *The New England Journal of Medicine* **342** (12) (March 23): 836–43. doi:10.1056/NEJM200003233421202.
5. Salzer, Jonatan, Göran Hallmans, Maria Nyström, Hans Stenlund, Göran Wadell, and Peter Sundström. 2013. "Vitamin A and Systemic Inflammation as Protective Factors in Multiple Sclerosis." *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **19** (8) (July 18): 1046–51. doi:10.1177/1352458512472752.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number