

Arbeitsanleitung / Manual

CRP ELISA Kit

*Zur in-vitro-Bestimmung des C-reaktiven Proteins aus
Trockenblutproben*

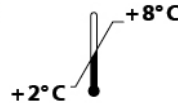
CRP ELISA Kit

*For the in vitro determination of C-reactive protein from
dried blood samples*

Gültig ab / Valid from 18.07.2013



K 9710SDBS



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	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
<i>Hinweise</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	6
10. ERGEBNISSE	7
11. EINSCHRÄNKUNGEN	8
12. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Erwartete Ergebnisse</i>	8
13. TESTCHARAKTERISTIKA	9
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	9
<i>Wiederfindung</i>	10
<i>Sensitivität</i>	10
<i>Linearität</i>	11
<i>Kreuzreaktivitäten</i>	11
14. LITERATUR	11
15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12

Table of Contents

1. INTENDED USE	15
2. CLINICAL RELEVANCE	15
3. PRINCIPLE OF THE TEST	15
4. MATERIAL SUPPLIED	16
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	17
7. PRECAUTIONS	17
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	18
9. ASSAY PROCEDURE	18
<i>Procedural notes</i>	18
<i>Test procedure</i>	18
10. RESULTS	19
11. LIMITATIONS	20
12. QUALITY CONTROL	20
<i>Expected values</i>	20
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	21
<i>Precision and reproducibility</i>	21
<i>Sensitivity</i>	21
<i>Recovery</i>	22
<i>Linearity</i>	22
<i>Cross reactivity</i>	23
14. REFERENCES	23
15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	23

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von **CRP** aus Trockenblutproben 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 Entzündungsmarker dient zur Abschätzung eines Myokardinfarkts bzw. Schlaganfalls.

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-Immunosorbent-Assay (ELISA) dient zur quantitativen Bestimmung des CRP aus Trockenblutproben. Nach der Lösung des CRPs aus der trockenen Blutprobe wird das CRP an polyklonale, auf Mikrotiterplatten fixierte Antikörper (Kaninchen anti humanes CRP) gebunden. Während eines Waschschruttes 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.	Abkürzung	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
K 9710dbs- ACTSOL	ACTSOL	Aktivierungslösung für Trockenproben	1 x 10 ml

Die für den Test verwendeten Standards wurden am WHO-Referenzpräparat CRM 470 kalibriert.

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

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

* 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).

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 befunden. 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

Das die getrocknete Probe enthaltende Filterpapier in ein 1,5-ml-Plastikröhrchen geben. 20 µl ACTSOL dazugeben und gründlich mischen. Danach 980 µl SAMPLEBUF dazugeben und erneut gründlich mischen. 15 Minuten bei Raumtemperatur (15 - 30 °C) inkubieren. Nach Ende der Inkubationszeit wiederum gründlich mischen und 100 µl der Lösung für den ELISA verwenden.

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

Die Bestimmungen sind in der PLATE (Mikrotiterplatte) in Doppelwerten durchzuführen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (15-30 °C) bringen, gut mischen:

1.	Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur (15 - 30 °C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen.
2.	Die Positionen für STD (Standard), SAMPLE (Probe) und 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), vorbereitete SAMPLE (Probe) und CTRL (Kontrollen) in Doppelbestimmung in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen 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 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 (15 - 30 °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 (15 - 30 °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, wir empfehlen 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 und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

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.

Trockenblutproben

Die ermittelte Konzentration aus Trockenblutproben wird **mit 60 multipliziert**, um die tatsächliche Konzentration zu erhalten.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

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

12. QUALITÄTSKONTROLLE

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 Probenwerte nicht gewährleisten.

Erwartete Ergebnisse

Normwerte

CRP-Konzentration Serum/Plasma (gemäß Pearson et al., 2003)

< 1 mg/l	niedriges KHK-Risiko
1-3 mg/l	mittleres KHK-Risiko
> 3 mg/l	hohes KHK-Risiko

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 wurde 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 wurde 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]	Intra-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 $B_0 + 2 \text{ SD}$. Der Standard Null wurde 18-mal von einer Person im CRP-ELISA gemessen.

Nachweisgrenze n=18

Probe	CRP-Mittelwert	Standardabweichung	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 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Gemessen [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	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

- Koenig, W. et al., 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), pp.1349–53.
- 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), pp.645–651.

- Ridker, P.M. et al., 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), pp.836–43.

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 befunden 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 Pipettierolumina 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 AG, zurückzusenden.

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



In-Vitro-Diagnostikum



Hersteller



Chargenbezeichnung



Bestellnummer

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Verwendbar bis

Manual

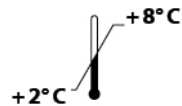
CRP ELISA Kit

For the in vitro determination of C-reactive protein from dried blood samples

Valid from 18.07.2013



K 9710SDBS



Immundiagnostik AG

1. INTENDED USE

The Immundiagnostik Assay is a sandwich enzyme immuno assay intended for the quantitative determination of C-reactive Protein in dried blood samples. 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 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 immunoassay is a sandwich assay for the determination of CRP in dried blood samples. The wells of the microtitre plate are coated with polyclonal antibodies directed against C-reactive protein. In a first incubation step, after dissolving CRP from the dried blood spot, 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 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 and 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	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
K 9710dbs- ACTSOL	ACTSOL	Activating solution for dried samples	1 x 10 ml

The CRP calibrators were standardized against WHO standard 470.

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- 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
- Vortex mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, tubes, 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 0,055 µS/cm at 25°C (≥18,2 MΩ 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 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 **WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted **1:10 in ultra pure water** 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

Place the filter paper containing the dried sample in a 1.5 ml tube. Add 20 µl of ACT-SOL and mix well. Add 980 µl SAMPLEBUF and mix well. After incubation for 15 minutes at room temperature (15 - 30 °C) mix again well and use 100 µl of the solution for the ELISA.

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 to the enclosed manual.

Test procedure

1.	Prior to use in the assay allow all reagents and samples to come to room temperature (15 - 30 °C) and mix well.
2.	Mark the positions of STD (standard), SAMPLE (sample), and 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), prepared SAMPLe (sample), and CTRL (controls) in duplicate into the respective wells.
6.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (15 - 30 °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 (15 - 30 °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 (15 - 30 °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.

*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 linear abscissa for concentration.

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.

Dried blood samples

Multiply the result by **60** to obtain the concentration of CRP in the dried blood 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 (according to Pearson et al., 2003):

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

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 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

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

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

- Koenig, W. et al., 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), pp.1349–53.
- 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), pp.645–651.
- Ridker, P.M. et al., 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), pp.836–43.

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 Im-mundiagnostik AG along with a written complaint.

Used symbols



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient material for
<n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number