

CRP ELISA Kit

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

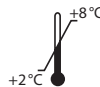
CRP ELISA Kit

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

Gültig ab / Valid from 2015-10-01



K9710SDBS



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

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. PROBENVORBEREITUNG	4
7. TESTDURCHFÜHRUNG	4
<i>Testprinzip</i>	4
<i>Pipettierschema</i>	4
8. ERGEBNISSE	6
9. EINSCHRÄNKUNGEN	7
10. QUALITÄTSKONTROLLE	7
<i>Referenzwerte</i>	7
11. TESTCHARAKTERISTIKA	7
<i>Analytische Sensitivität</i>	7
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	8
<i>Spike-Wiederfindung</i>	8
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	9
<i>Spezifität</i>	9
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	10
13. TECHNISCHE MERKMALE	10
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
15. LITERATUR	11

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. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 9710s	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 9710s	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat 10x	1 x 100 ml
K 9710s	CONJ	POD-Antikörper, (Kaninchen anti-human-CRP, Peroxidase-markiert)	1 x 150 µl
K 9710s	STD	Standards, gebrauchsfertig* (0; 1.9; 5.6; 16.7; 50; 150 ng/ml)	6 x 1 ml
K 9710s	CTRL	Kontrolle, gebrauchsfertig	1 x 1 ml
K 9710s	CTRL	Kontrolle, gebrauchsfertig	1 x 1 ml
K 9710s	SAMPLEBUF	Probenpuffer, gebrauchsfertig	2 x 100 ml

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 9710s	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 9710s	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

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

4. 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 (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 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** 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 bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Der **WASH-BUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt

werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünnter WASHBUF) ist bei **2–8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:101** in **Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das CONJ ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:101 verdünntes CONJ) **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. PROBENVORBEREITUNG

Wir empfehlen DrySpot-ID (Katalognummer DZ9020ID oder DZ9021ID) als Trockenblutträger. Die benetzten Karten sind für 3 Wochen bei Raumtemperatur stabil.

Das die getrocknete Probe enthaltende Filterpapier in ein 1,5-ml-Plastikröhrchen geben. Danach 1000 µl SAMPLEBUF dazugeben und gründlich mischen. 15 Minuten bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubieren. Nach Ende der Inkubationszeit wiederum gründlich mischen. Für eine Bestimmung in Doppelwerten werden 2x je 100 µl jeder vorbereiteten Probe im Test eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

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.

Pipettierschema

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

Markieren Sie die Positionen für STD/SAMPLE/CTRL (Standards/Proben/Kontrollen) im Protokollblatt.

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

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	100 µl STD (Standard), vorbereitete SAMPLE (Probe) und CTRL (Kontrollen) 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 Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	100 µl 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 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.	50 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen

11.

Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei **450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (595 nm, 630nm, 650 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 (595 nm, 630nm, 650 nm oder 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

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

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z.B. 0,001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

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

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte 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.

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

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben, deren OD höher ist als die des höchsten Standards, sollten stärker verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden. Bei der folgenden Auswertung ist der veränderte Verdünnungsfaktor zu beachten.

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 (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 Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Analytische 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	Standard-abweichung	Nachweisgrenze [ng/ml]
1	0,005	0,001	0,921

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 (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 (n = 15)

Probe	CRP-Mittelwert [ng/ml]	Intra-Assay 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).

Ungespikte 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

Ungespikte Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	CRP erwartet [ng/ml]	CRP gemessen [ng/ml]
9,3	18,8	28,1	26,3
9,3	9,4	18,7	18,0
9,3	4,7	14,0	13,7

Wiederfindung in der Verdünnung

Zwei Proben wurden verdünnt und im Test gemessen. 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

Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen. Die Kreuzreaktivität wird angegeben in Prozent, bezogen auf die CRP-Reaktivität

- 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 beigegeführten 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 Pipettiervolumina 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. 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.
2. 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.
3. 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.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



In-Vitro-Diagnostikum



Hersteller



Chargenbezeichnung



Bestellnummer



Zu verwenden mit



Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen



Verwendbar bis

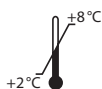
CRP ELISA Kit

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

Valid from 2015-10-01



K9710SDBS



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE 15

2. INTRODUCTION 15

3. MATERIAL SUPPLIED 15

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED 16

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS 16

6. PREPARATION OF SAMPLES 17

7. ASSAY PROCEDURE 17

Principle of the test 17

Test procedure 17

8. RESULTS 19

9. LIMITATIONS 19

10. QUALITY CONTROL 19

Reference range 20

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS 20

Specificity 20

Analytical Sensitivity 20

Spiking Recovery 21

Precision and reproducibility 21

Dilution recovery 22

12. PRECAUTIONS 22

13. TECHNICAL HINTS 23

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE 23

15. REFERENCES 24

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. 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 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 9710s	PLATE	Micro titre plate with precoated strips	12 x 8 wells
K 9710s	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	1 x 100 ml
K 9710s	CONJ	POD antibody, (rabbit-anti-CRP, Peroxidase-labeled)	1 x 150 µl
K 9710s	STD	Calibrators, ready to use* (0; 1.9; 5.6; 16.7; 50; 150 ng/ml)	6 x 1 ml
K 9710s	CTRL	Control, ready-to-use	1 x 1 ml
K 9710s	CTRL	Control, ready-to-use	1 x 1 ml
K 9710s	SAMPLEBUF	Sample buffer, ready to use	2 x 100 ml
K 9710s	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 9710s	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

*The CRP calibrators were standardized against WHO standard 470.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- 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 ($\geq 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$).

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.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C before dilution of the buffer solutions. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for one month**.
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:101** in wash buffer (100 µl CONJ + 10 ml wash

buffer). The CONJ is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Conjugate (1:101 diluted CONJ) 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. PREPARATION OF SAMPLES

We recommend DrySpot-ID (catalogue no DZ9020ID or DZ9021ID) as dried blood spot carrier. The moistened cards are stable for 3 weeks at room temperature.

Place the filter paper containing the dried sample in a 1.5 ml tube. Add 1000 µl SAMPLEBUF and mix well. After incubation for 15 minutes at room temperature (15–30 °C) mix again well. For testing in duplicates, pipette 2 x 100 µl of each prepared sample per well.

7. ASSAY PROCEDURE

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.

Test procedure

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

Mark the positions of STD /SAMPLE/CTRL (standards/sample/controls) 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.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper..
2.	Add 100 µl of STD (standard), prepared SAMPLE (sample), and CTRL (controls) into the respective wells.
3.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal mixer.
4.	Discard the contents of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper..
5.	Add 100 µl conjugate in each well
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 and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper..
8.	Add 100 µl SUB (TMB substrate) in each well.
9.	Incubate for 10–20 minutes* at room temperature (15–30 °C) in the dark*
10..	Add 50 µl STOP (ELISA stop solution) and mix well
11.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (595 nm, 630nm, 650 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 (595 nm, 630nm, 650 nm or 690 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

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the "4 parameter algorithm".

1. 4 parameter algorithm

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

2. Point-to-point calculation

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

3. Spline algorithm

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

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.

Dried blood samples

The obtained results have to be multiplied with the **dilution factor of 60** to get the actual concentrations.

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

9. LIMITATIONS

Samples with an OD higher than the OD of the highest standard should be further diluted and re-assayed. For the following analysis, the changed dilution factor has to be taken into consideration.

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 (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.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Specificity

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against a range of compounds with structural similarity to CRP. The specificity is calculated in percent, based on the cross-reactivity of these compounds.

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

No cross reactivity with CRP in mouse serum was observed.

Analytical 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

Spiking Recovery

Two samples with known CRP concentration were spiked with four different amounts of CRP and measured. (n = 4)

Unspiked 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

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 (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 (n = 14)

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

Dilution recovery

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

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

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 sent to Immunodiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. 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.

2. 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.

3. 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.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



To be used with



Manufacturer



Contains sufficient for <n> tests



Lot number



Use by