

CRP ELISA

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

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

Gültig ab / Valid from 2021-07-20

REF K 9710s

Σ
96

+2°C
+8°C

IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

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
<i>Serum- und Plasmaproben</i>	4
<i>Trockenblutproben</i>	5
<i>Urinproben</i>	5
<i>Stuhlproben</i>	6
7. TESTDURCHFÜHRUNG	7
<i>Testprinzip</i>	7
<i>Pipettierschema</i>	8
8. ERGEBNISSE	9
9. EINSCHRÄNKUNGEN	10
10. QUALITÄTSKONTROLLE	10
<i>Referenzwerte</i>	11
11. TESTCHARAKTERISTIKA	11
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	11
<i>Linearität</i>	12
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	13
<i>Analytische Sensitivität</i>	13
<i>Analytische Spezifität</i>	14
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	14
13. TECHNISCHE MERKMALE	15
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	15
15. LITERATUR	16

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von CRP aus Serum, Plasma, Urin, Trockenblut 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 Studien wird der Zusammenhang von Entzündungsreaktionen und kardiovaskulären Erkrankungen (Arteriosklerose, latente, chronisch-persistierende Infekte) beschrieben. *CRP high-sensitive* als Entzündungsmarker dient zur Abschätzung eines Myokardinfarkts bzw. Schlaganfalls.

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

Indikationen

- Prognosefaktor bei Myokardinfarkt oder Schlaganfall
- Entzündungsprozesse

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 9710s	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml
K 9710s	CONJ	Antikörper, (Kaninchen-anti-human-CRP, peroxidasemarkiert)	1 x 150 μ l
K 9710s	STD	Standards*, gebrauchsfertig (0; 1.9; 5.6; 16.7; 50; 150 ng/ml)	6 x 1 ml
K 9710s	CTRL 1	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 ml

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 9710s	CTRL 2	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 ml
K 9710s	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	2 x 100 ml
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

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

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

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Trockenprobenträger wie z.B. DrySpot-ID Katalognummer DZ9020ID oder DZ9021ID
- Stuhlprobenaufbereitungssystem wie z.B. Artikel-Nr. K 6998SAS
- 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
- 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 auf dem Etikett angegeben 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 anzentrifugiert 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 des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 °C** 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. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Serum- und Plasmaproben

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 1000 g 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 1000 g und 4 °C. Pipettieren Sie danach das Plasma in ein separates Gefäß.

Lagerung der Serumproben

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

*A. P. Doumatey et al. 2014.

Probenverdünnung

Serum- und Plasmaproben (Normalpatienten: Erwachsene und Kinder) werden **1:100** bzw. **1:500** verdünnt.

Beispiel für eine 1:100-Verdünnung:

10 µl Serum/Plasma in **990 µl** Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) pipettieren und mischen.

Patientenproben mit einer erhöhten CRP-Konzentration müssen **1:4 000–1:8 000** verdünnt werden. Zur Berechnung der CRP-Konzentration muss der Verdünnungsfaktor miteinkalkuliert werden. Andere Patientenkollektive werden entsprechend der erwarteten CRP-Konzentration vorverdünnt.

Trockenblutproben

Probengewinnung und -lagerung

Als Probenmaterial eignen sich **50 µl Vollblut**, die auf einen von Immundiagnostik AG freigegebenen Trockenprobenträger aufgetropft und vollständig getrocknet sind. Wir empfehlen DrySpot-ID (Katalognummer DZ9020ID oder DZ9021ID) als Trockenblutträger. Die benetzten Karten sind für 3 Wochen bei Raumtemperatur stabil.

Vorbereitung der Trockenblutproben

1.	1,5-ml-Reaktionsgefäße aus Polypropylen beschriften.
2.	Filter aus Testbrief entnehmen..
3.	Filter in beschriftetes Gefäß geben.
4.	1000 µl Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) zu jeder Probe geben und 15 min bei Raumtemperatur (15–30 °C) stehen lassen.
5.	10 s vortexen. Der Filter entfärbt sich hierbei.

Für eine Bestimmung in Doppelwerten werden 2x je 100 µl jeder vorbereiteten Probe im Test eingesetzt.

Urinproben

Probenlagerung

Urin sollte bis zur Messung bei -20 °C gealagert werden. CRP ist im Urin für 4 Wochen bei -20 °C stabil.

Probenverdünnung

Urinproben werden **1:5** verdünnt,

z. B. **50 µl** Probe + **200 µl** Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF), gut mischen.

Pro Vertiefung werden **100 µl** der Verdünnung im Test eingesetzt.

Stuhlproben

Stuhlprobenlagerung

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

Stuhlprobenextraktion

Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) 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 Waschpuffer::

Aufgenommene Stuhlmenge: 15 mg

Puffervolumen: 0,75 ml

Verdünnungsfaktor: 1:50

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

- a) Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o. Ä.
- b) Das **unbefüllte Stuhlprobenröhrchen** vor der Verwendung mit **0,75 ml Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) **befüllen**. **Wichtig:** Waschpuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- c) Röhrchen aufschrauben (gelbes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstechen in die Stuhlprobe vollkommen mit Probe bedeckt werden müssen. Anschließend das Stäbchen durch

- den Abstreifring zurück ins Röhrchen stecken (leichter Widerstand) und fest verschrauben.
- d) Das Röhrchen so lange vortexen bis keine Stuhlreste mehr in den Einkerbungen 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 im Waschpuffer 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 Stuhlprobenröhrchens (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. **1 Monat haltbar**.
100 µl des Extrakts werden pro Vertiefung im Test eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung des CRP aus Serum, Plasma, Stuhl, Trockenblutproben und Urin. Das CRP aus den Proben wird an auf Mikrotiterplatten fixierte Antikörper gegen humanes CRP gebunden. Während eines Waschschrilles werden ungebundene Komponenten entfernt. Gebundenes CRP wird mit Hilfe eines Antikörper-Peroxidase/TMB-Systems detektiert. Nach Zugabe einer Stopplösung wechselt die Farbe von blau nach gelb. Die Farbentwicklung ist dabei zur nachgewiesenen Analytmenge (Probe bzw. Standard) proportional. Aus den mitgeführten Standards wird eine Standardkurve erstellt, mittels der die Konzentrationen von Proben und Kontrollen ermittelt werden.

Pipettierschema

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

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen Aluminiumverpackung 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 vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	100 µl Standards/Kontrollen/vorbereitete Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln* inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	100 µl Konjugat (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln* inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	10–20 min** bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
10.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut 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.
-----	--

* Wir empfehlen die Streifen bei 550 rpm (Umdrehungen pro Minute) mit einem Orbit von 2 mm zu schütteln.

** Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen, den Farbschlag 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.

Serum und Plasma

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 100 bzw. 500** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten. Bei einer Verdünnung von **1:4 000 bzw. 1:8 000** müssen die ermittelten Konzentrationen entsprechend mit **4 000 bzw. 8 000** multipliziert werden.

Trockenblut

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Faktor 60** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Urin

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 5** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Stuhl

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 50** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

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 können 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 Standardkurve × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

Analytische Sensitivität × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Analytische Sensitivität siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG 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 AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

CRP-Konzentration Serum/Plasma*/Trockenblut

- < 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-Serum-/Plasmakonzentration **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

Genauigkeit – Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 42

Die Wiederholbarkeit wurde mit 2 Stuhlproben unter gleichbleibenden Bedingungen (Bediener, Messgerät, Tag, Kitcharge identisch) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ng/ml]	VK [%]
1	232,5	6,7
2	994,5	6,8

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 25

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 2 Kontrollproben unter variablen Bedingungen (Bediener, Messgeräte, Tage, Kitchargen unterschiedlich) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ng/ml]	VK [%]
1	4,98	9,9
2	35,84	7,3

Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde gemäß CLSI-Richtlinie EP6-A mittels serieller Verdünnung je einer Serum-, Plasma- und Stuhlprobe nachgewiesen.

Für CRP in Serum, Plasma, Urin und Stuhl wurde in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung der Probenverdünnung ein lineares Verhalten im Bereich von 0,99 bis 178,75 ng/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als $\pm 20\%$.

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
Serum	1:800	178,75	178,75	-
	1:1600	89,38	95,63	106,99
	1:3200	44,69	40,63	90,91
	1:6400	22,34	18,59	83,22
	1:12800	11,17	8,91	79,72
Plasma	1:100	76,59	76,59	-
	1:200	38,30	41,70	108,90
	1:400	19,15	19,14	99,97
	1:500	15,32	17,16	112,01
	1:1000	7,66	7,51	98,07
	1:2000	3,83	3,29	85,99
Stuhl	1:100	36,64	36,64	-
	1:200	18,32	19,04	103,95
	1:400	9,16	8,97	97,89
	1:800	4,58	4,41	96,19
	1:1600	2,29	2,29	99,78
	1:3200	1,15	0,99	86,15

Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. 3 Serumproben wurden dafür mit bekannten CRP-Konzentrationen versetzt und gemessen. Folgende Werte wurden ohne Berücksichtigung der verwendeten Probenverdünnung ermittelt:

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
46,75	150,0	196,75	178,32	90,63
	75,0	121,75	136,42	112,05
	37,5	84,25	97,07	115,21
	18,8	65,50	72,92	111,31
	9,4	56,13	63,36	112,88
	4,7	51,44	60,98	118,53
	2,3	49,10	57,01	116,12
10,92	150,0	160,92	151,80	94,33
	75,0	85,92	95,20	110,80
	37,5	48,42	52,41	108,24
	18,8	29,67	30,42	102,52
	9,4	20,29	21,61	106,51
	4,7	15,60	15,45	99,03
	2,3	13,26	13,29	100,21
8,79	150,0	156,70	158,79	98,68
	75,0	96,20	83,79	114,80
	37,5	44,52	46,29	96,16
	18,8	27,34	27,54	99,25
	9,4	18,13	18,17	99,77
	4,7	14,28	13,48	105,89
	2,3	12,10	11,14	108,63

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 42-mal der Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 1,015 ng/ml.

Analytische Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität zu verwandten Substanzen. Es wurde keine Kreuzreaktivität zu Alpha-1-Antitrypsin, Lysozym oder Albumin gefunden. Zusätzlich 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.
- Das 10x Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können.



Achtung: Verursacht schwere Augenreizung

BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

- 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. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

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 auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der 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 dem Kit beigelegten 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

7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		

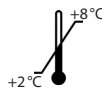
CRP ELISA

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

Valid from 2021-07-20



K 9710s



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	21
2. INTRODUCTION	21
3. MATERIAL SUPPLIED	21
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	22
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	22
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	23
<i>Serum and plasma samples</i>	23
<i>Dried blood spots</i>	24
<i>Urine samples</i>	24
<i>Stool samples</i>	25
7. ASSAY PROCEDURE	26
<i>Principle of the test</i>	26
<i>Test procedure</i>	26
8. RESULTS	28
9. LIMITATIONS	29
10. QUALITY CONTROL	29
<i>Reference range</i>	29
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	30
<i>Accuracy – Precision</i>	30
<i>Analytical sensitivity</i>	30
<i>Analytical specificity</i>	30
<i>Accuracy – Trueness</i>	31
<i>Linearity</i>	32
12. PRECAUTIONS	33
13. TECHNICAL HINTS	33
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	34
15. REFERENCES	34

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is a enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of C-reactive protein in plasma, serum, stool, dried blood spots, 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.

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. 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	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml
K 9710s	CONJ	Conjugate, (rabbit-anti-CRP-antibody, peroxidase-labelled)	1 x 150 μ l
K 9710s	STD	Standards*, ready-to-use, (0; 1.9; 5.6; 16.7; 50; 150 ng/ml)	6 x 1 ml
K 9710s	CTRL 1	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 1 ml
K 9710s	CTRL 2	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 1 ml

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 9710s	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	2 x 100 ml
K 0002.15	SUB	Substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

*The CRP calibrators were standardized against WHO standard 470.

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

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water*
- Dried blood spot carrier such as DrySpot-ID cat. no.: DZ9020ID or DZ9021ID
- Stool sample application system such as Cat. No.: K 6998SAS
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge
- Vortex
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure 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.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redis-

solved at room temperature or in a water bath at 37°C. 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 1 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) when stored at **2–8°C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Serum and plasma samples

Collection and storage of samples

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 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 of serum

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.

For a dilution of 1:100 e.g.:

Add **10 µl serum /plasma to 990 µl sample dilution buffer (SAMPLEBUF)** and mix well.

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 **1:4 000–1:8 000**. Samples of other patient collectives must be diluted according to the ex-

pected CRP concentration. The corresponding dilution factor must be used for calculation of the CRP concentration.

Dried blood spots

Collection and storage of dried blood spots

50 µl whole blood dripped on a dried sample carrier cleared by Immundiagnostik AG are suitable as sample material after complete drying. 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.

Preparation of the dried blood samples

1.	Label 1,5 ml polypropylene tubes.
2.	Remove filter from sampling device.
3.	Put filter in a labelled tube.
4.	Add 1000 µl sample dilution buffer (SAMPLEBUF) to each sample, allow sample to stand for 15 min at room temperature (15–30 °C).
5.	Vortex for 10 s . The filter will decolourise.
6.	Centrifuge the samples for 5 min at 3000 g to remove residual filter pieces.

For testing in duplicates, pipet 2 x 100 µl of each prepared sample per well.

Urine samples

Storage of urine samples

Urine should be stored at –20 °C until the measurement. CRP in urine is stable for 4 weeks at –20 °C.

Dilution of urine samples

Urine samples must be diluted **1:5** before performing the assay,

e.g. **50 µl** sample + **200 µl** sample dilution buffer (SAMPLEBUF), mix well.

For analysis, pipet 100 µl of this dilution per well.

Stool samples

Storage of stool samples

The samples should be refrigerated and can be stored at **2–8 °C for 2 days**. If the test cannot be performed within this period, the specimen should be stored at –20 °C or colder. At this temperature, they are stable for up to 2 months.

Extraction of the stool samples

Wash buffer (1:10 diluted WASHBUF) 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 wash 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 stool sample tube** with 0.75 ml **wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) before using it with the sample. **Important:** Allow the wash buffer to reach room temperature.
- c) Unscrew the tube (yellow part of cap) to open. Insert the yellow 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 sample extraction 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**.

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

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is a sandwich assay for the determination of CRP in serum, plasma, dried blood spots, urine, and stool samples. The wells of the microtiter plate are coated with antibodies directed against C-reactive protein. In a first incubation step, the CRP in the samples is bound to the coated capturing antibodies (in excess). To remove all unbound substances, a washing step is carried out.

In a second incubation step, a peroxidase-labelled detection antibody 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 standards/controls/samples on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips as needed from the kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging 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.	Before use , wash the wells 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add each 100 µl standards/controls/prepared samples into the respective wells.
3.	Cover the strips and incubate for 1 h at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker* .
4.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add 100 µl conjugate (diluted CONJ) into each well.
6.	Cover the strips and incubate for 1 h at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker* .
7.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
8.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
9.	Incubate for 10–20 min** at room temperature (15–30 °C) in the dark .
10.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.
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.

* We recommend shaking the strips at 550 rpm with an orbit of 2 mm.

** The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour 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.

Serum and plasma

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 100 or 500** to get the actual concentrations.

If samples were diluted **1:4 000** or **1:8 000**, the obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 4 000 or 8 000** respectively.

Dried blood spots

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

Urine

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 5** to get the actual concentrations.

Stool

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 50** 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 concentrations above the measurement range (see definition below) can be further diluted and re-assayed. Please consider this higher dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range (see definition below) 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:

analytical sensitivity × sample dilution factor to be used

Analytical sensitivity see chapter "Performance Characteristics".

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG 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*/dried blood spots

- < 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 serum/plasma 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 high again, and other reasons can be excluded (acute infection, chronic-inflammatory dis-

eases), 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

Accuracy – Precision

Repeatability (Intra-Assay); n = 42

The repeatability was assessed with 2 stool samples under constant parameters (same operator, instrument, day and kit lot).

Sample	Mean value [ng/ml]	CV [%]
1	232.5	6.7
2	994.5	6.8

Reproducibility (Inter-Assay); n = 25

The reproducibility was assessed with 2 serum samples under varying parameters (different operators, instruments, days and kit lots).

Sample	Mean value [ng/ml]	CV [%]
1	4.98	9.9
2	35.84	7.3

Analytical sensitivity

The zero-standard was measured 42 times. The detection limit was set as $B_0 + 2 \text{ SD}$ and estimated to be 1.015 ng/ml without considering possibly used sample dilution factors.

Analytical specificity

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against substances with structural similarity to CRP. There was no cross-reactivity observed with alpha-1-antitrypsin, lysozyme or albumin. Additionally, no cross reactivity with CRP in mouse serum was observed.

Accuracy – Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, CRP spikes with known concentrations were added to 3 different serum samples. The following values have been obtained without consideration of possibly used dilution factors:

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Expected [ng/ml]	Obtained [ng/ml]	Recovery [%]
46.75	150.0	196.75	178.32	90.63
	75.0	121.75	136.42	112.05
	37.5	84.25	97.07	115.21
	18.8	65.50	72.92	111.31
	9.4	56.13	63.36	112.88
	4.7	51.44	60.98	118.53
	2.3	49.10	57.01	116.12
10.92	150.0	160.92	151.80	94.33
	75.0	85.92	95.20	110.80
	37.5	48.42	52.41	108.24
	18.8	29.67	30.42	102.52
	9.4	20.29	21.61	106.51
	4.7	15.60	15.45	99.03
	2.3	13.26	13.29	100.21
8.79	150.0	156.70	158.79	98.68
	75.0	96.20	83.79	114.80
	37.5	44.52	46.29	96.16
	18.8	27.34	27.54	99.25
	9.4	18.13	18.17	99.77
	4.7	14.28	13.48	105.89
	2.3	12.10	11.14	108.63

Linearity

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range. This was assessed according to CLSI guideline EP6-A with a serial dilution of each one serum, plasma and stool sample.

For CRP in serum, plasma, urine and stool, the method has been demonstrated to be linear from 1.15 to 178.75 ng/ml based on the standard curve without considering possibly used sample dilution factors, showing a non-linear behaviour of less than $\pm 20\%$ in this interval.

Sample	Dilution	Expected [ng/ml]	Obtained [ng/ml]	Recovery [%]
Serum	1:800	178.75	178.75	-
	1:1600	89.38	95.63	106.99
	1:3200	44.69	40.63	90.91
	1:6400	22.34	18.59	83.22
	1:12800	11.17	8.91	79.72
Plasma	1:100	76.59	76.59	-
	1:200	38.30	41.70	108.90
	1:400	19.15	19.14	99.97
	1:500	15.32	17.16	112.01
	1:1000	7.66	7.51	98.07
	1:2000	3.83	3.29	85.99
Stuhl	1:100	36.64	36.64	-
	1:200	18.32	19.04	103.95
	1:400	9.16	8.97	97.89
	1:800	4.58	4.41	96.19
	1:1600	2.29	2.29	99.78
	1:3200	1.15	0.99	86.15

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 colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact



Warning: Causes serious eye irritation

IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: get medical Advice/attention.

- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still should 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 analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the 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 to 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 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		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		