



## Instructions for Use

# CRP ELISA

IVD



REF EIA-1952

$\Sigma$  96



**DRG** 

DRG Instruments GmbH, Germany  
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg  
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50  
Website: [www.drg-diagnostics.de](http://www.drg-diagnostics.de)  
E-mail: [drg@drg-diagnostics.de](mailto:drg@drg-diagnostics.de)

Distributed by:

**DRG** 

DRG International, Inc., USA  
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081  
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556  
Website: [www.drg-international.com](http://www.drg-international.com)  
E-mail: [corp@drg-international.com](mailto:corp@drg-international.com)

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.  
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.  
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.  
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

**Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos**

1	INTENDED USE.....	2
2	PRINCIPLE OF THE CRP ELISA.....	2
3	REAGENTS .....	3
4	MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED.....	3
5	WARNINGS AND PRECAUTIONS FOR USERS .....	3
6	STORAGE CONDITIONS .....	3
7	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	4
8	ASSAY PROCEDURE .....	4
9	RESULTS.....	5
10	EXPECTED VALUES.....	5
11	TEST CHARACTERISTICS .....	6
12	TEST VALIDITY .....	6
13	TROUBLE SHOOTING .....	6
14	REFERENCES / LITERATURE.....	6
1	VERWENDUNGSZWECK.....	7
2	PRINZIP DES CRP ELISA .....	7
3	REAGENZIEEN .....	8
4	ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL .....	8
5	WARNUNG UND VORSICHTSMASSNAHMEN .....	8
6	LAGERUNG .....	9
7	PROBENENTNAHME UND HANDHABUNG.....	9
8	TESTVERFAHREN .....	9
9	TESTERGEBNISSE.....	10
10	ERWARTETE WERTE.....	10
11	TESTCHARAKTERISTIKA.....	11
12	TEST-VALIDIERUNG.....	11
13	FEHLERSUCHE.....	11
14	LITERATUR .....	11
	SYMBOLS USED.....	12

## 1 INTENDED USE

**C-Reactive Protein (CRP)** is an acute-phase protein, produced exclusively in the liver. Interleukin-6 is the mediator for the synthesis by the hepatocytes of CRP, a pentamer of approximately 120.000 Daltons. CRP is present in the serum of normal persons at concentrations ranging up to 5 mg/L. The protein is produced by the foetus and the neonate and it does not pass the placental barrier, as such it can be used for the early detection of neonatal sepsis.

Because febrile phenoena, leukocyte count and erythrocyte sedimentation rate (ESR) are often misleading, investigators and clinicians now prefer a quantitative CRP determination as a marker for acute inflammation and tissue necrosis. Within 6 hours of an acute inflammatory challenge the CRP level starts to rise.

Serum concentration of CRP increases significantly in cases of both infectious and non-infectious inflammation, of tissue damage and necrosis and in the presence of malignant tumours. CRP is present in the active stages of inflammatory disorders like rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, Reiter's syndrome, psoriatic arthropathy, systemic lupus erythematosus, polyarteritis, ulcerative colitis and Crohn's disease.

Injuries causing tissue breakdown and necrosis are associated with increases in serum CRP which are seen in thermal burns, major surgery and myocardial infarction.

Widespread malignant disease with carcinoma of the lung, stomach, colon, breast, prostate and pancreas, Hodgkin's disease, non-Hodgkin's lymphoma and lymphosarcoma will give rise to high levels of CRP resulting from tissue damage by invading tumour cells. CRP therefore may be used to monitor malignancy.

The CRP-level increases dramatically following microbial infections, and this may be particularly helpful for the diagnosis and monitoring of bacterial septicemia in neonates and other immunocompromised patients at risk. In children, CRP is useful for differential diagnosis of bacterial and viral meningitis.

Because the biological half-life of this protein is only 24 hours, CRP accurately parallels the activity of the inflammation process and the CRP concentration decreases much faster than ESR or any other acute phase parameter, which is particularly useful in monitoring appropriate treatment of bacterial diseases with antibiotics.

C-Reactive Protein measurements during the early and late post-transplant period of bone marrow and organ transplantations is particularly useful in the management of interfering infections in these immunosuppressed patients.

The **CRP ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative determination of C-Reactive Protein in human serum and plasma.

## 2 PRINCIPLE OF THE CRP ELISA

Microtiterstrips coated with anti-CRP antibody are incubated with diluted standard sera and patient samples. During this incubation step CRP is bound specifically to the wells. After removal of the unbound serum proteins by a washing procedure, the antigen-antibody complex in each well is detected with specific peroxidase-conjugated antibodies.

After removal of the unbound conjugate, the strips are incubated with a chromogen solution containing tetramethylbenzidin and hydrogen peroxide: a blue colour develops in proportion to the amount of immunocomplex bound to the wells of the strips. The enzymatic reaction is stopped by the addition of 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the absorbance values at 450 nm are determined.

A standard curve is obtained by plotting the absorbance values versus the corresponding standard values. The concentration of CRP in patient samples is determined by interpolation from the standard curve.

### 3 REAGENTS

1. **Coated Microtiterstrips** – **MTP** - 12 x 8-well strips coated with monoclonal antibodies to human CRP.
2. **Standard Sera** – **CAL N** - 5 vials, each containing 1/10 prediluted CRP standard solutions (0.2 mL):  
N having following values:  
N=0: 0 µg/mL; N=5: 5 µg/mL; N=25: 25 µg/mL; N=50: 50 µg/mL; N=100: 100 µg/mL.  
Calibrated against the NIBSC 1<sup>st</sup> International Standard, 85/506.  
Contain 0,09 % NaN<sub>3</sub>.
3. **Conjugate** – **CONJ** - 1 vial, containing peroxidase conjugated monoclonal anti-human CRP antibodies (12 mL). Contains antimicrobial agents and an inert red dye.
4. **Specimen Dilution Buffer** **DIL 5x** - 1 vial, containing 40 mL dilution buffer 5x concentrated. Contains 0.09 % NaN<sub>3</sub> and an inert green dye.
5. **Washing Solution**– **WASH 20x** - 1 vial containing 50 mL 20 x concentrated phosphate buffered washing solution.
6. **Chromogen Solution** – **CHROM** 1 vial, containing 15 mL of a solution containing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and tetramethylbenzidin.
7. **Stopping Solution**– **STOP** - 1 vial, containing 12 mL of 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Controls can be ordered separately:

**REF** EIA-1952-CTRL

Level 1 & 2; 0.5 mL per level (lyophilized)

### 4 MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

1. Precision micropipettes and standard laboratory pipettes.
2. Clean standard laboratory volumetric glassware.
3. Clean glass or plastic tubes for the dilution of the samples.
4. A microtiterplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm

### 5 WARNINGS AND PRECAUTIONS FOR USERS

1. For in vitro diagnostic use only.
2. Human blood components used in the preparation of the standard sera have been tested and found to be nonreactive for hepatitis B surface antigen and HIV I. Since no known method can ever offer complete assurance that products derived from human blood will not transmit hepatitis or other viral infections, it is recommended to handle these standard sera in the same way as potentially infectious material. Dispose patient samples and all materials used to perform this test as if they contain infectious agents.
3. Do not mix reagents or coated microtiterstrips from kits with different lot numbers.
4. Chromogen Solution contains the hazardous ingredient N-Methyl-2-pyrrolidone at a concentration > 0.3 %. It is classified as a Reproductive Toxicant Category 1B.  
Following hazard statements are applicable:  
H360D: May damage the unborn child.  
Following precautionary statements are applicable:  
P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.  
P308+P313: IF exposed or concerned: Get medical advice/attention.
5. Some kit components contain sodium azide as a preservative. In order to prevent the formation of potentially explosive metal azides in laboratory plumbing, flush drains thoroughly after disposal of these solutions.

### 6 STORAGE CONDITIONS

2 °C - 8 °C

1. Store the microtiterstrips in their original package with the desiccant until all the strips have been used.
2. Never use any kit components beyond the expiration date.

## 7 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Human serum and plasma may be used in this assay.

Remove serum from clot as soon as possible to avoid haemolysis. Lipemic and/or haemolysed samples can cause false results. Transfer the serum to a clean storage tube.

Specimens may be stored at 2 °C - 8 °C for a few days, or they can be stored frozen for a longer period of time. Avoid repeated freezing and thawing.

## 8 ASSAY PROCEDURE

### 8.1 General Remarks

1. Use a separate disposable tip for each sample transfer to avoid cross-contamination.
2. All reagents must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
3. Once the assay has been started, all steps should be completed without interruption.
4. If an ELISA Washer is used, adaptation of the washing step might be necessary to obtain optimal results.

### 8.2 Reconstitution of the Reagents

#### *Washing Solution*

Dilute 50 mL of concentrated Washing Solution (5) to 1000 mL with distilled water.

Reconstituted solution can be stored at least 1 month or as long as solution remains clear.

Store at 2 °C - 8 °C.

At higher temperatures, the concentrated Washing Solution (5) may appear cloudy without affecting its performance. Upon dilution, the solution will be clear.

#### *Specimen Dilution Buffer*

Dilute 40 mL of the concentrated Specimen Dilution Buffer (4) to 200 mL with distilled water.

Reconstituted solution can be stored at least 3 months or as long as solution remains clear.

Store at 2 °C - 8 °C.

### 8.3 Assay Procedure

1. The 10x prediluted standard sera (2) are diluted 1:100 as follows:  
pipette 10 µL of each calibrator into separate glass or plastic dilution tubes.  
Add 990 µL of diluted Specimen Dilution Buffer (4) and mix carefully.
2. The patient samples are diluted **1:1000** in two consecutive steps:  
pipette 10 µL of each patient sample into separate glass or plastic dilution tubes and  
add 990 µL of diluted Specimen Dilution Buffer (4).  
Mix thoroughly.  
Add 450 µL of diluted Specimen Dilution Buffer to 50 µL of these 100x prediluted samples. Mix thoroughly.  
**Warning: Do not store the diluted samples for more than 8 hours.**
3. Pipette 100 µL of the diluted calibrators and samples into each of a pair of adjacent wells (1).
4. Incubate the covered microtiter strips for 30 ± 2 min at room temperature.
5. Wash the microtiter strips three times with Washing Solution.  
This can either be performed with a suitable microtiter plate washer or by briskly shaking out the contents of the strips and immersing them in washing solution. During the third step, the washing solution is left in the strips for 2 - 3 min. Change washing solution for each cycle.  
Finally empty the microtiter strips and remove excess fluid by blotting the inverted strips on adsorbent paper.
6. Add 100 µL of Conjugate Solution (3) and incubate the covered microtiter strips for 30 ± 2 min at room temperature.
7. Repeat the washing procedure as described in 5.
8. Add 100 µL of Chromogen Solution (6) to each well.
9. Incubate for 10 ± 2 min at room temperature. Avoid light exposure during this step.
10. Add 50 µL of Stopping Solution (7) to each well.
11. Determine the absorbance of each well at 450 nm within 30 min following the addition of acid.

## 9 RESULTS

The average absorbance value of each calibrator is plotted against the corresponding CRP value and the best calibration curve (e.g. log/linear) is constructed.

Use the average absorbance of each patient sample obtained in the CRP-ELISA to determine the corresponding value by simple interpolation from the curve.

Depending on the experience and/or availability of computer capability, other methods of data reduction may be used.

### Example of typical O.D. values:

CALIBRATOR µg/mL	O.D. value
0	0.019
5	0.240
25	0.821
50	1.301
100	2.018

## 10 EXPECTED VALUES

### Normal Values

Serum and plasma samples from 360 healthy Belgian blood donors were tested with the CRP ELISA (EIA-1952), following distribution of CRP levels has been found:

Concentration Range CRP µg/mL	Number of donors
≤ 5	328
6 - 25	31
26 - 50	1
> 50	0

All individuals have small amounts of CRP in their blood. The upper limit of the normal range is situated between 5 and 8 µg/mL (343 donors in the population of 360 individuals had CRP levels < 8 µg/mL).

## 11 TEST CHARACTERISTICS

### 11.1 Precision

Intra Assay (n=10)	Level 1	Level 2	
Mean (µg/mL)	5.2	48.3	
SD (µg/mL)	0.27	3.3	
% CV	5.12	6.84	
Inter Assay (n=7)	Level 1	Level 2	Level 3
Mean (µg/mL)	4.3	31.0	67.2
SD (µg/mL)	0.6	3.6	8.5
% CV	14.3	11.6	12.7

### 11.2 Specificity

#### Cross-reactivity

The CRP ELISA recognizes natural and recombinant human CRP.

No cross-reactivity was observed with following factors, prepared at 1 µg/mL in sample diluent: human pentraxin 2; human pentraxin 3; human monomeric CRP; rat CRP.

### 11.3 Analytical Sensitivity

The minimal detectable concentration is < 1 µg/mL.

## 12 TEST VALIDITY

The following specifications must be met for each run to be valid:

O.D. value for the zero calibrator: < 0.080

O.D. value for the highest value calibrator: > 1.000

If one of the specifications is not met, the test run should be repeated.

## 13 TROUBLE SHOOTING

In case of high background signal, the washing was insufficient. Repeat the test with more vigorous washing (increased number of cycles, soak time).

## 14 REFERENCES / LITERATURE

1. POWELL L. J. C-Reactive Protein - a Review Am. J. Med. Technol., **87**, 138-142 (1979).
2. GEWURZ H., MOLD C., SIEGEL J. and FIEDEL B. C-Reactive Protein and the Acute Phase Response Advances in Internal Medicine, **27**, 345-372 (1982).
3. HELGESON N. G. P., ADAMSON D. M., PIKE R. B., JAMES D. S., NICODEMUS D. S., LEE B. A. and MILLER G. W. C-Reactive Protein : Laboratory Medicine, Vol. 2 (Race G. J., Ed.), Harper & Row, Hagerstown, chapter 29 (1973).
4. Johnson HL., Chiou CC., Cho CT. Applications of acute phase reactants in infectious diseases J. Microbiol. Immunol. Infect. **32**(2):73-82 (1999).

## 1 VERWENDUNGSZWECK

**C-reaktives Protein (CRP)** ist ein Akut-Phasen-Protein, das ausschließlich von der Leber produziert wird. Interleukin-6 (IL-6) beschleunigt die CRP-Synthese durch die Hepatozyten. CRP ist ein Pentamer von circa 120000 Dalton. Bei gesunden Menschen beträgt die CRP-Konzentration im Serum bis zu 5 mg/l. Das Protein wird im Fötus und im Neugeborenen produziert und ist nicht plazentagängig, somit kann es für die Früherkennung von Säuuglingssepsis eingesetzt werden.

Da Fieberzustand, Leukozytenzahl und Sedimentationsgeschwindigkeit oft zu falschen Schlüssen führen, bevorzugen Forscher und Kliniken zurzeit die quantitative CRP-Bestimmung zur Erkennung von akuter Entzündung und Nekrosen. Innerhalb von 6 Stunden eines akuten Entzündungsproblems beginnt die CRP Konzentration zu steigen.

Die CRP-Konzentration im Serum steigt in beiden Fällen von infektiösen und nicht infektiösen Entzündungen, Gewebeschäden, und Vorkommen von malignen Tumoren stark an. CRP ist vorhanden in aktiven Stadien der Entzündungserkrankung wie rheumatische Arthritis, Spondylitis ankylosans, Reiter-Syndrom, Psoriasis-Arthropathie, systemischem Lupus erythematodes, Polyarthritits, ulcerative Colitis und Morbus Crohn.

Bei Verletzungen, die das Gewebe beschädigen oder eine Nekrose bewirken, steigt die CRP-Konzentration im Serum ebenfalls an. Dies ist bei Verbrennungen, großen Operationen und Myokardinfarkten der Fall.

Sich ausdehnende bösartige Krankheiten wie Lungen-, Magen-, Dickdarm-, Brust-, Prostata- oder Bauchspeicheldrüsen-Karzinom, Hodgkin Krankheit, Non-Hodgkin-Lymphom und Lymphosarkom lassen die CRP-Werte ansteigen, weil die sich ausbreitenden Tumorzellen das Gewebe zerstören. Aus diesem Grund eignet sich der CRP-Test zur Überwachung der Malignität. Der CRP-Wert steigt dramatisch bei mikrobiologischen Infektionen und ist besonders wichtig für die Diagnose und Überwachung von bakteriellen Blutvergiftungen beim Neugeborenen und anderen immungeschwächten Risikopatienten. Bei den Kindern ist CRP nützlich für die verschiedenen Diagnosen von bakterieller und viraler Meningitis. Da die biologische Halbwertszeit dieses Proteins nur 24 Stunden beträgt, spiegelt CRP genau die Entwicklung des Infektionsprozesses wieder. Außerdem nimmt die CRP-Konzentration wesentlich schneller ab als die Blutkörperchensenkungsreaktion (ESR) oder andere Parameter zur Messung der akuten Phase, was insbesondere bei der Überwachung der sachgemäßen Behandlung bakterieller Krankheiten mit Antibiotika von großem Nutzen ist.

Messungen des C-reaktiven Proteins in der frühen und späten postoperativen Phase von Knochenmark- und Organtransplantationen sind besonders nützlich bei immungeschwächten Patienten.

Der CRP ELISA ist ein Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von C-reaktivem Protein in Humanserum und Plasma.

## 2 PRINZIP DES CRP ELISA

Mikrotiterstreifen, die mit anti-CRP Antikörper beschichtet sind, werden mit verdünnten Standardseren und Patientenproben inkubiert. Während der Inkubationsphase bindet sich CRP an die Vertiefungen des Probenstreifens. Nachdem die ungebundenen Serumproteine durch Waschen entfernt wurden, wird der Antigen-Antikörper-Komplex in jeder Vertiefung durch anti-CRP-spezifische Peroxidase-konjugierte Antikörper erkannt.

Nach Entfernung des ungebundenen Peroxidase-Konjugats werden die Probestreifen in einer Substratlösung inkubiert, welche Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid enthält. Eine Blaufärbung zeigt die Enzymaktivität des an die Vertiefung gebundenen Enzyms an. Die Enzymreaktion wird durch Hinzufügen von 0.5 M  $H_2SO_4$  gestoppt, und die Absorptionswerte werden bei 450 nm gemessen.

Für jeden Test wird eine Standardkurve erstellt, indem die Absorptionswerte und die entsprechenden Standardwerte in ein Achsenkreuz eingetragen werden. Die CRP-Konzentration der Patientenproben wird durch Interpolation aus der entsprechenden Standardkurve bestimmt.



### 3 REAGENZIEN

1. **Beschichtete Mikrotiterstreifen** – **MTP** – 12 x 8 Vertiefungen beschichtet mit monoklonalen Antikörpern gegen humanes CRP.
2. **Standard-Serum** – **CAL N** – 5 Fläschchen, jedes enthält 1/10 vorverdünnte CRP-Standardlösungen (0.2 mL). N mit den folgenden Werten:  
N=0: 0 µg/mL; N=5: 5 µg/mL; N=25: 25 µg/mL; N=50: 50 µg/mL; N=100: 100 µg/mL.  
Kalibriert gegen den NIBSC 1. Internationalen Standard, 85/506  
Enthält 0.09 % NaN<sub>3</sub>.
3. **Konjugat** – **CONJ** – 1 Fläschchen, mit Peroxidase-konjugiertem monoklonalen anti-human CRP-Antikörper (12 mL). Enthält antimikrobiologische Wirkstoffe und einen inerten roten Farbstoff.
4. **Proben-Verdünnungspuffer** – **DIL 5x** – 1 Fläschchen, enthält 40 mL 5x-konzentrierten Verdünnungspuffer. Enthält 0.09 % NaN<sub>3</sub> und einen inerten grünen Farbstoff.
5. **Waschlösung** – **WASH 20x** – 1 Fläschchen enthält 50 mL 20x-gepufferte konzentrierte Waschlösung.
6. **Chromogene Lösung** – **CHROM** – 1 Fläschchen enthält 15 mL einer Lösung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Tetramethylbenzidin.
7. **Stopplösung** – **STOP** – 1 Fläschchen enthält 12 mL 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Kontrollen können separat bestellt werden:

**REF** EIA-1952-CTRL

Level 1 & 2; 0,5 mL pro Level (lyophilisiert)

### 4 ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

1. Präzisionsmesspipetten und laborübliche Pipetten.
2. Saubere laborübliche Messbecher aus Glas
3. Saubere Reagenzröhrchen (aus Glas- oder Plastik) zur Verdünnung der Proben und Standardseren.
4. Lesegerät für Mikrotiterplatten für die Absorptionsmessung bei 450 nm.

### 5 WARNUNG UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Die Tests sind ausschließlich für den Gebrauch als in-vitro Diagnostikum bestimmt.
2. Beim Test auf Hepatitis B Oberflächen-Antigen, HCV und HIV reagierte das zur Herstellung von Standardseren benützte Humanblut negativ. Da keine bekannte Testmethode die absolute Sicherheit bieten kann, dass aus Humanblut hergestellte Präparate weder Hepatitis noch andere Viruskrankheiten übertragen, sollten diese Standardseren als potentiell ansteckendes Material betrachtet werden. Aus diesem Grund sollten Patientenproben und sämtliches Material, das zur Durchführung des Tests benutzt worden ist, anschließend nach den geltenden Bestimmungen entsorgt werden.
3. Keine Reagenzien oder beschichtete Mikrotiterstreifen aus Packungen mit verschiedenen Lotnummern mischen.
6. Die Chromogene Lösung enthält als gefährlichen Inhaltsstoff N-Methyl-2-pyrrolidon in einer Konzentration > 0.3 %. It is classified as a Reproductive Toxicant Category 1B.  
Es gilt der folgende Gefahrenhinweis:  
H360D: Kann das Kind im Mutterleib schädigen.  
Es gelten die folgenden Sicherheitshinweise:  
P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.  
P308+P313: BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
4. Einige Packungsbestandteile enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Dies erfordert die Beachtung der gesetzlichen Vorschriften im Umgang mit Natriumazid. Um die Bildung explosiver Blei- oder Kupferazide in den Abflüssen zu vermeiden, sollten diese nach dem Wegschütten der Lösungen mit reichlich Wasser nachgespült werden.

## 6 LAGERUNG

2 °C – 8 °C

1. Die Mikrotiterstreifen zusammen mit dem Trockenmittel in der Originalverpackung lagern, bis alle Streifen aufgebraucht sind.
2. Die Packungsbestandteile dürfen nur bis zu dem vermerkten Verfalldatum benutzt werden.

## 7 PROBENENTNAHME UND HANDHABUNG

Für diesen Test kann sowohl menschliches Serum als auch Plasma verwendet werden.

Um eine Hämolyse zu vermeiden, sollte das Serum oder Plasma schnellstmöglich vom geronnenen Blut getrennt werden. Lipämische und/ oder hämolytische Proben können falsch positive oder negative Ergebnisse bewirken. Das Serum in einen sauberen Behälter geben.

Die Proben bleiben mehrere Tage lang stabil, wenn sie zwischen 2 °C - 8 °C gelagert werden. Für eine längere Lagerung können sie eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte jedoch vermieden werden.

## 8 TESTVERFAHREN

### 8.1 Allgemeine Bemerkungen

1. Für jede Probe sollte eine neue Wegwerfpipettenspitze benutzt werden, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
2. Alle Reagenzien müssen vor dem Gebrauch Raumtemperatur haben. Außerdem ist bei der Mischung der Reagenzien darauf zu achten, dass kein Schaum entsteht.
3. Sobald der Test begonnen wurde, sollten alle Schritte ohne Unterbrechungen durchgeführt werden.
4. Wird ein ELISA-Waschgerät verwendet, kann die Adaption des Waschschrittes notwendig sein, um optimale Ergebnisse zu erzielen.

### 8.2 Vorbereitung der Reagenzien

#### Waschlösung

50 mL der konzentrierten Waschlösung (5) werden mit destilliertem Wasser bis auf 1000 mL verdünnt.

Die verdünnte Waschlösung ist mindestens 1 Monat haltbar, oder solange die Lösung klar ist.

Lagerung bei 2 °C – 8 °C.

Bei höheren Temperaturen kann die konzentrierte Waschlösung trüb erscheinen, ohne dass die Eigenschaften dadurch beeinflusst werden. Nach der Verdünnung ist die Lösung klar.

#### Proben-Verdünnungspuffer (Specimen Dilution Buffer)

40 mL Proben-Verdünnungspuffers (4) werden mit destilliertem Wasser bis auf 200 mL verdünnt.

Der verdünnte Puffer ist mindestens 3 Monat haltbar, oder solange die Lösung klar ist.

Lagerung bei 2 °C - 8 °C.

### 8.3 Testverfahren

1. Die 10-fach vorverdünnten Standardseren (2) werden folgendermaßen 1:100 verdünnt:  
10 µL der einzelnen Kalibratoren in je ein Reagenzröhrchen geben, 990 µL Proben-Verdünnungspuffer (4) hinzugeben und vorsichtig mischen.
2. Die Patientenproben werden in zwei aufeinanderfolgenden Schritten **1:1000** verdünnt, indem man 10 µL der einzelnen Patientenproben mit einer Pipette in je ein Reagenzröhrchen gibt, 990 µL Proben-Verdünnungspuffer (4) hinzufügt und alles gut mischt.  
Anschließend fügt man 450 µL verdünnten Proben-Verdünnungspuffer zu 50 µL dieser 100-fach verdünnten Proben hinzu und mischt alles.  
**WARNUNG: Die Verdünnung muss immer direkt vor dem Test gemacht werden. Die Verdünnung darf nicht länger als 8 Stunden stehen gelassen werden..**
3. Mit einer Pipette 100 µL der verdünnten Kalibratoren und Proben auf je ein Paar nebeneinander liegender Vertiefungen geben.
4. Die bedeckten Mikrotiterstreifen 30 Minuten lang ( $\pm 2$  min) bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Die Mikrotiterstreifen dreimal mit der verdünnten Waschlösung abspülen. Dazu kann man entweder ein für Mikrotiterstreifen geeignetes Waschgerät verwenden oder die Streifen gut ausklopfen und dann in die Waschlösung tauchen. Beim ersten Schritt bleiben die Streifen 2-3 Minuten lang in der Waschlösung. Zum Schluss werden die Mikrotiterstreifen herausgenommen und die überschüssige Flüssigkeit entfernt, indem man die Streifen umgekehrt auf absorbierendem Papier ausklopft.
6. 100 µL der Konjugat-Lösung (3) dazu pipettieren und die bedeckten Mikrotiterstreifen für 30 Minuten ( $\pm 2$  Min) bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Den in Punkt 5 beschriebenen Waschzyklus wiederholen.
8. 100 µL der Chromogenlösung (6) in jede Vertiefung hinzufügen.
9. 10 Minuten lang ( $\pm 1$  Min.) bei Raumtemperatur inkubieren.  
Bei diesem Arbeitsschritt sollten die Mikrotiterstreifen vor Lichteinwirkung geschützt sein.
10. 50 µL Stopplösung (7) in jede Vertiefung pipettieren.
11. Innerhalb von 30 Minuten nach dem Hinzufügen der Säure, die Absorption der einzelnen Vertiefungen bei 450 nm messen.

### 9 TESTERGEBNISSE

Für jeden Test wird der mittlere Absorptionswert der einzelnen Kalibratoren gegen den entsprechenden CRP-Wert aufgezeichnet und die optimale Kalibrationskurve (z.B. logarithmisch-linear) erstellt.

Anhand der mittleren Absorptionswerte, den die einzelnen Patientenproben beim CRP-Test ergeben haben, bestimmt man durch einfache Interpolation aus der Kurve den entsprechenden CRP-Wert.

Je nach der Verfügbarkeit von Computern können die Daten auch anhand anderer Methoden ausgewertet werden.

### 10 ERWARTETE WERTE

Serum und Plasmaproben von 360 gesunden belgischen Blutspendern wurden mit dem CRP ELISA (EIA-1952) getestet, dabei wurden folgende Bereiche gefunden:

CRP-Konzentrationsbereich µg/mL	N
≤ 5	328
6 - 25	31
26 - 50	1
> 50	0

Alle Individuen haben kleine Mengen an CRP in ihrem Blut.

Die obere Grenze des normalen Bereichs liegt zwischen 5 und 8 µg/mL (343 Spender in der Population der 360 Individuen hat CRP-Level < 8 µg/mL).

## 11 TESTCHARAKTERISTIKA

### 11.1 Präzision

Intra Assay (n=10)	Level 1	Level 2	
Mittelwert (µg/mL)	5.2	48.3	
SD (µg/mL)	0.27	3.3	
% VK	5.12	6.84	
Inter Assay (n=7)	Level 1	Level 2	Level 3
Mittelwert (µg/mL)	4.3	31.0	67.2
SD (µg/mL)	0.6	3.6	8.5
% VK	14.3	11.6	12.7

### 11.2 Spezifität

#### Kreuzreaktivität

Der CRP ELISA natürliches und rekombinantes CRP.

Für folgende Faktoren wurde keine Kreuzreaktivität beobachtet (mit 1 µg/mL in Probenverdünnungspuffer):  
humanes Pentraxin 2; humanes Pentraxin 3; humanes monomeres CRP; Ratten-CRP

### 11.3 Analytische Sensitivität

< 1 µg/mL.

## 12 TEST-VALIDIERUNG

Die folgenden Spezifikationen müssen erfüllt sein, damit der Testlauf gültig ist:

OD-Wert des Standard 0:	< 0,080
OD-Wert des höchsten Standards:	> 1,000

Ist eine der Bedingungen nicht erfüllt, muss der Test wiederholt werden.

## 13 FEHLERSUCHE

Sollte das Hintergrundsignal zu hoch sein, ist der Waschschrift nicht ausreichend. Der Test sollte wiederholt werden mit verbessertem Waschschrift (erhöhte Anzahl an Waschzyklen, verlängerte Einwirkzeit).

## 14 LITERATUR

1. POWELL L. J. C-Reactive Protein - a Review Am. J. Med. Technol., **87**, 138-142 (1979).
2. GEWURZ H., MOLD C., SIEGEL J. and FIEDEL B. C-Reactive Protein and the Acute Phase Response Advances in Internal Medicine, **27**, 345-372 (1982).
3. HELGESON N. G. P., ADAMSON D. M., PIKE R. B., JAMES D. S., NICODEMUS D. S., LEE B. A. and MILLER G. W. C-Reactive Protein : Laboratory Medicine, Vol. 2 (Race G. J., Ed.), Harper & Row, Hagerstown, chapter 29 (1973).
4. Johnson HL., Chiou CC., Cho CT. Applications of acute phase reactants in infectious diseases J. Microbiol. Immunol. Infect. **32**(2):73-82 (1999).

## SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Diagnostica in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence
	Batch code *	Chargencode *	Lotto no	Número de lote	No. de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité