

MegaELISA[®] CRP canine ad us. vet.

Enzymimmunoassay zum quantitativen Nachweis
von C-Reaktivem Protein im Plasma oder Serum des Hundes

In vitro Diagnostikum

GEBRAUCHSINFORMATION

Enzyme immunoassay for the quantitative detection
of C-reactive protein in plasma or serum of the dog

In vitro diagnosticum

INSTRUCTIONS FOR USE

Art. No. 760096EE1 (96's)

Hersteller/Manufacturer:



Lochauer Str. 2
A-6912 Hörbranz – AUSTRIA
☎ (+43) 5573 85400
📄 (+43) 5573 85400-4
✉ elisa@megacor.at
🌐 www.megacor.com

MegaELISA® CRP canine ad us. vet.

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	3
2. Verwendungszweck	3
3. Testprinzip	3
4. Testkitkomponenten	4
5. Haltbarkeit und Lagerung	5
6. Informationen zum Probenmaterial	5
7. Testvorbereitung	6
8. Testdurchführung	7
9. Testauswertung	9
10. Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise	11
11. Haftung	12
12. Kurz-Protokoll MegaELISA® CRP canine	13
Abkürzungen	2

Contents	Page
1. Introduction	14
2. Intended use	14
3. Test principle	14
4. Test-kit components	15
5. Stability and Storage	16
6. Information on the sample material	16
7. Test preparation	17
8. Test procedure	18
9. Test evaluation	19
10. Safety measures and precautions	21
11. Liability	22
12. Short protocol MegaELISA® CRP canine	23
Abbreviations	2

Abkürzungen / Abbreviations

- CRP C-Reaktives Protein/C-reactive protein
- H₂O₂ Wasserstoffperoxid/Hydrogen peroxide
- HRP Meerrettich-Peroxidase/Horseradish Peroxidase
- PPM Proben-Puffer-Mischung (DE)
- PVP Probenverdünnungspuffer (DE)
- SBM Sample buffer mixture (EN)
- SDB Sample dilution buffer (EN)
- TMB 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin/3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

1. EINLEITUNG

Auf Gewebeschädigungen und Entzündungen reagiert der Körper u.a. mit der Bildung so genannter Akute-Phase-Proteine (APP) in der Leber. Eines der wichtigsten und empfindlichsten Akute-Phase-Proteine ist CRP mit niedrigen Serumkonzentrationen während der normalen Homöostase und einer schnellen Antwort während und nach Entzündungsbeginn. Aufgabe des C-reaktiven Proteins ist u. a. Stimulation der unspezifischen Immunabwehr durch Aktivierung der Fresszellen und der Komplementkaskade. Die CRP-Bestimmung beim Hund eignet sich für die Diagnose und Verlaufskontrolle der Therapie von entzündlichen Krankheiten. Dabei ist die physiologische CRP-Konzentration beim gesunden Hund unter 10 mg/l. Ein drastischer Anstieg der CRP-Konzentration erfolgt bei Entzündungsprozessen innerhalb weniger Stunden (Ø 24–28 h um das 10–100-fache) auf Grund von Infektionen, Immunerkrankungen, Neoplasien und Traumata. Sobald der Entzündungsreiz durch eine erfolgreiche Therapie nachlässt, sinkt die CRP-Konzentration schnell innerhalb Ø 24–28 h wieder ab.

CRP kann somit als „Echtzeitmarker“ betrachtet werden. Für Entzündungen ist CRP sensitiver als die Bestimmung der Rektaltemperatur oder die Leukozytendifferentialdiagnostik. Ein weiterer Vorteil der CRP-Bestimmung liegt in der Unabhängigkeit dieses Markers von endogenen oder iatrogenen Störfaktoren (z. B. Glucocorticoiden, Stress).

Der **MegaELISA® CRP canine** basiert auf hochspezifischen Antikörpern, die gegen Hunde-CRP gerichtet sind. Er kann mit Plasma oder Serum des Hundes in der tierärztlichen Praxis und/oder im Labor durchgeführt werden.

2. VERWENDUNGSZWECK

Der **MegaELISA® CRP canine** ist ein Enzymimmunoassay zum quantitativen Nachweis von C-Reaktivem Protein (CRP) im Plasma oder Serum des Hundes.

3. TESTPRINZIP


Der **MegaELISA® CRP canine** ist ein indirekter quantitativer Immunoassay-Nachweis von C-Reaktivem Protein (CRP) im Sandwich-Prinzip.

An der Oberfläche der Wells sind spezifische polyklonale Antikörper gegen CRP gebunden. Eine Verdünnung des zu untersuchenden Hundeplasmas oder -serums bzw. die Kontrollen werden zur Inkubation bei Raumtemperatur (20–25°C) in die Wells pipettiert. Nach einem Waschschrift wird Anti-canines CRP-Konjugat, markiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP), dazugegeben und bei Raumtemperatur (20–25°C) inkubiert. Nicht gebundenes Konjugat wird in einem weiteren Waschschrift entfernt. Nach der Zugabe von Substrat (Tetramethylbenzidin, TMB) wandelt gebundenes Enzym bei positiven Proben die farblose Lösung in den Wells der Mikrotiterplatte in eine blaue Lösung um. Durch Zugabe von Stopp-Reagenz (HCl) erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Mittels der Standardkurve sind die Ergebnisse der Proben quantifizierbar.

4. TESTKITKOMPONENTEN

4.1. MITGELIEFERTE REAGENZIEN / TESTKITKOMPONENTEN

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen.

	96er Kit	Inhalt	
1.	12 Streifen mit 8 Wells	Mikrotiterplatte , beschichtet mit spezifischen Antikörpern gegen canines CRP	
2.	100 ml	Probenverdünnungspuffer (PVP, enthält 0,06 % Bronidox), gebrauchsfertig, durchsichtiger Deckel	
3.	30 ml	Waschpuffer (50× Puffer), durchsichtiger Deckel	
4.	12 ml	Assaypuffer , gebrauchsfertig, durchsichtiger Deckel	
5.	0,4 ml	Standard-Stammlösung (500 ng/100 µl canines CRP), roter Deckel	
6.	0,05 ml	Kontrolle 1 („low Control“), gelber Deckel	
7.	0,05 ml	Kontrolle 2 („high Control“), gelber Deckel	
8.	12 ml	Konjugat (Peroxidase-konjugierte CRP-spezifische Antikörper), gebrauchsfertig, durchsichtiger Deckel	
9.	12 ml	Substrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin [TMB]/H ₂ O ₂), gebrauchsfertig, brauner Deckel. Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.	
10.	12 ml	Stopp-Reagenz (1 M Salzsäure [HCl]), gebrauchsfertig, durchsichtiger Deckel	
11.	1	Deckel zum Abdecken	
12.	1	Evaluationsblatt	
13.	1	Analysezertifikat	
14.	1	Gebrauchsinformation	

4.2. ERFORDERLICHE, NICHT MITGELIEFERTE REAGENZIEN / ZUBEHÖR

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Einmal-Probenröhrchen (Probenverdünnung)
- Laborpipetten (Bereich zwischen 5 und 1000 µl)
- Multikanalpipette (100 µl)
- Vortex-Mixer
- Filterpapier/Labortücher
- Messzylinder (1000 ml)
- Stoppuhr
- ELISA plate shaker (Orbital Shaker, 500 rpm)

- Waschautomat für Mikrotiterplatten (350 µl)
- Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm, Referenzfilter 590–650 nm)
- Abfallbehälter mit einer 0,5%-igen Hypochloritlösung

5. HALTBARKEIT UND LAGERUNG



Lagerung
2–8 °C



Verwendbar bis
– siehe Etikett



Für den tierärztlichen
Gebrauch



Chargen-Bezeichnung



In vitro Diagnostikum



Keine Reagenzien verschiedener
Testkits, Chargennummern oder
mit abgelaufenem Verfallsdatum
verwenden.



Gebrauchsinformation
genau beachten

- Mikrobielle Kontamination der Reagenzien ist zu vermeiden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Bei Öffnung des verschweißten Aluminiumbeutels der Mikrotiterplatte ist darauf zu achten, dass der wiederverschließbare Klippverschluss nicht beschädigt oder gar abgetrennt wird.
- Eine direkte Lichteinwirkung auf das farblose Substrat ist unbedingt zu vermeiden, um Zersetzung bzw. Blaufärbung durch Autooxidation zu verhindern. Bei aufgetretener Blaufärbung kann das Substrat nicht mehr verwendet werden (Funktionsunfähigkeit).

6. INFORMATIONEN ZUM PROBENMATERIAL

- Nur Hunde-Plasma oder Serum verwenden.
- Zentrifugieren Sie Vollblutproben innerhalb von 4 Stunden.
- Beachten Sie, dass das Probenmaterial, ebenso wie alle verwendeten Testkitkomponenten, zum Zeitpunkt der Anwendung Raumtemperatur haben sollte.
- Das Probenmaterial vor der Verwendung gut homogenisieren.
- Ungekühlt (**20–25 °C**) sollte das Plasma oder Serum innerhalb von 24 Stunden getestet werden. Bei **2–8 °C** kann das Plasma oder Serum bis max. 5 Tage gelagert werden. Plasma- oder Serumproben können aliquotiert und dauerhaft bei mindestens –20 °C aufbewahrt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.

- Einige lipämische Proben können eine Hintergrundfärbung verursachen. Sollte dies der Fall sein, wird empfohlen, den Test mit Proben höherer Qualität durchzuführen.
- Nicht Hitze-inaktivieren.
- **ACHTUNG:** Unvollständig gefüllte und/oder unzureichend durchmischte EDTA-, Citrat- oder Heparinröhrchen können Störeffekte verursachen, die zu unterschiedlichen Testergebnissen führen können.

7. TESTVORBEREITUNG

Gebrauchsinformation vor Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Gebrauchsinformation genau zu befolgen. Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen. Für jeden Pipettierschritt saubere Einmalspitzen verwenden.

7.1. ALLGEMEINES

- Die Mikrotiterstreifen sind erst nach Erreichen der Raumtemperatur dem Aluminiumbeutel zu entnehmen. Zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten empfiehlt es sich, diese abzudecken oder abzukleben. Die nicht benötigten Mikrotiterstreifen sofort wieder in den Beutel geben, den Beutel verschließen und bei 2–8°C lagern.
- Die Reagenzien sind unmittelbar vor ihrer Verwendung gut zu mischen.
- Nach Gebrauch sind die Reagenzien wieder bei 2–8°C zu lagern.
- Einmal benutzte Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden.
- Beschädigte Testkitkomponenten dürfen nicht verwendet werden.
- Ein direkter Kontakt von Proben mit den Testkitkomponenten ist zu vermeiden (Kreuzkontamination).
- Direkte Sonneneinstrahlung während der Testdurchführung vermeiden.

7.2. HERSTELLUNG DES WASCHPUFFERS 1:50

1 Teil des Waschpufferkonzentrates wird mit 49 Teilen destilliertem Wasser gemischt. Sollten im Waschpufferkonzentrat Kristalle zu sehen sein, lösen Sie diese durch Erwärmen des Waschpufferkonzentrates im Wasserbad bei 37°C auf. Der verdünnte Puffer ist bei 2–8°C 4 Wochen haltbar.

7.3. PROBENVORBEREITUNG / PROBENVERDÜNNUNG 1:100

- Die zu untersuchenden Proben werden zu Beginn 1:100 mit Probenverdünnungspuffer (PVP) verdünnt (z.B. 10 µl Probe + 990 µl PVP). Die Kontrollen müssen ebenfalls verdünnt werden!
- Homogenisieren Sie die Proben-Puffer-Mischung (PPM) gut (mehrfachiges Mischen mit der Pipette oder auf einem Vortex-Mixer).
- **ACHTUNG:** Bei Verwendung eines ELISA-Waschautomaten muss die PPM partikel-frei sein. Um dies zu gewährleisten, zentrifugieren Sie bitte die PPM bei 5000 rpm für 5 Minuten.

- Um sehr niedrige CRP-Konzentrationen (< 5 mg/l) in der Probe und Kontrolle zu bestimmen, sollten die Proben 1:50 oder 1:25 verdünnt werden. Niedrigere Verdünnungen als 1:25 werden nicht empfohlen.
- Um sehr hohe CRP-Konzentrationen (> 50 mg/l) zu bestimmen, sollten die Proben bei höheren Verdünnungen (z.B. 1:200 oder 1:500) gemessen werden.

7.4. VORBEREITUNG DER STANDARDS

- Die Standards müssen vor jedem Testdurchlauf frisch hergestellt werden. Nutzen Sie hierfür den PVP.
- Der unverdünnte Standard hat eine Konzentration von 500 ng/100 µl.
- Stellen Sie mehrere Standard-Verdünnungen her.

ID	Konzentration	Standardverdünnung
Standard A	500 ng/ml	900 µl PVP + 100 µl Standard Stammlösung
Standard B	278 ng/ml	400 µl PVP + 500 µl Standard A
Standard C	154 ng/ml	400 µl PVP + 500 µl Standard B
Standard D	86 ng/ml	400 µl PVP + 500 µl Standard C
Standard E	48 ng/ml	400 µl PVP + 500 µl Standard D
Standard F	0 ng/ml	PVP

Tabelle 1: Herstellung der Standardverdünnungen

8. TESTDURCHFÜHRUNG

- Probenmaterial vor der Verwendung gut homogenisieren.
- **Es wird empfohlen, Kontrollen, Standards und Proben in Doppelbestimmung zu testen.**
- Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Evaluationsblatt die Position der Patientenproben, der Kontrollen und der Standardverdünnungen auf den Wells genau festlegen.
- Multikanalpipette für Assaypuffer, Konjugat, TMB und Stopp-Reagenz verwenden!

8.1. PROBENAUFTRAG UND ERSTE INKUBATION

- Stecken Sie die benötigte Anzahl an Mikrotiterstreifen in den Halterahmen.
- Geben Sie jeweils **100 µl Assaypuffer** in jedes Well (Multikanalpipette).
- Geben Sie jeweils **20 µl**
 - **Standard A bis F**
 - **verdünnte Kontrollen**
 - **verdünnte Proben (PPM)**
in der gewünschten Reihenfolge in das jeweilige Well.
- Decken Sie die Mikrotiterplatte zu und inkubieren Sie für **60 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C)** auf dem Shaker (500 rpm).

8.2. WASCHEN – SORGFÄLTIG und STRIKT NACH ANLEITUNG!

WASCHEN PER WASCHAUTOMAT, 3× mit je 350 µl

- Entsorgen Sie das Inkubat durch Ausleeren in einen Abfallbehälter mit Hypochlorit. Gemäß den behördlichen Vorschriften entsorgen.
- **ACHTUNG:** PPM mit Partikeln sollten vor dem ersten Waschschrift manuell durch Ausklopfen aus den Wells entfernt werden (Verstopfungsgefahr der Waschnadeln).
- Korrekte Einstellung des Automaten beachten (**3×350 µl**).
- Zur Erzielung optimaler Waschergebnisse mindestens 350 µl Waschpuffer pro Well und Waschschrift verwenden.
- Komplettes Absaugen der Flüssigkeit nach jedem Waschschrift.
- Nach letztem Waschschrift Platte gründlich auf saugfähigem Papier/Labortuch ausklopfen. Es sollte keine Restfeuchtigkeit in den Wells zurückbleiben.

8.3. ZWEITE INKUBATION

- Geben Sie je **100 µl Konjugat** in jedes Well (Multikanalpipette).
- Decken Sie die Mikrotiterplatte zu und inkubieren Sie für **30 Minuten bei Raumtemperatur (20–25 °C)** und **im Dunkeln** (z. B. Abdecken mit Alufolie) auf dem Shaker (500 rpm).

8.4. WASCHEN

- Waschen wie in Punkt 8.2., jedoch mit **5 Waschschriften**.

8.5. DRITTE INKUBATION

- Geben Sie **100 µl Substrat (TMB)** in jedes Well (Multikanalpipette).
- Decken Sie die Mikrotiterplatte zu und inkubieren Sie für **15–20 Minuten bei Raumtemperatur (20–25 °C)** und **im Dunkeln** auf dem Shaker (500 rpm).
- Geben Sie **100 µl Stopp-Reagenz** in jedes Well, in derselben Reihenfolge und Geschwindigkeit wie für die TMB-Substratlösung (Multikanalpipette).

8.6. MESSUNG

- Nach vorsichtigem Mischen (leichtes Antippen an den Plattenrand) wird die Extinktion innerhalb 10 Minuten nach Zugabe des Stopp-Reagenzes bei 450 nm gemessen. Eine zusätzliche Messung in der Referenzwellenlänge 590–650 nm wird empfohlen.
- Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

9. TESTAUSWERTUNG

9.1. STANDARDKURVE

Die Standardkurve wird erstellt, indem die Standardkonzentration auf der x-Achse (lineare Skala) gegen die Extinktion der Standards auf der y-Achse (lineare Skala) aufgetragen wird (vgl. Bild 1). Eine 4-Parameter-Methode (Kurven-Fitting) sollte für die automatische Datenreduktion verwendet werden. Alternativ ist auch eine quadratische (polynomielle) Analyse möglich.

ID	Konzentration	Extinktion bei 450 nm
Standard A	500 ng/ml	3,088
Standard B	278 ng/ml	1,297
Standard C	154 ng/ml	0,456
Standard D	86 ng/ml	0,211
Standard E	48 ng/ml	0,114
Standard F	0 ng/ml	0,006

Tabelle 2: Beispiel für Ermittlung der Standardkonzentration

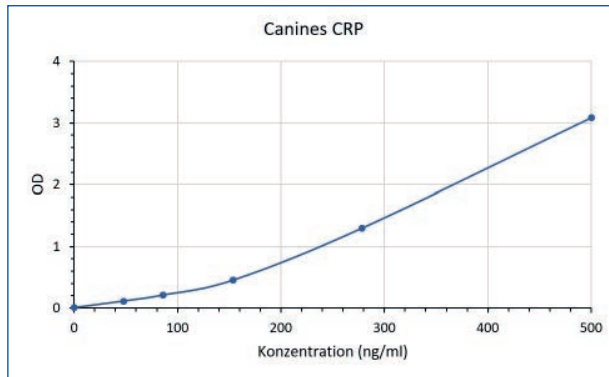


Bild 1: Beispiel für Ermittlung der Standardkonzentration

ID	Wert
A	0,032593
B	1,85576
C	849,366
D	11,2598
R ²	0,9996

Berechnung mittels Kurvenfitting:

$$y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$$

$$y = (0,032593 - 11,2598) / (1 + x/849,366)^{1,85576} + 11,2598$$

9.2 INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Die Werte der Kontrollen stehen auf dem mitgelieferten CoA. Diese sollten auf der ermittelten Standardkurve liegen.

Eine Abweichung von den geforderten Werten kann ebenso wie eine Trübung oder Blaufärbung des farblosen Substrates vor Zugabe in die Wells ein Hinweis auf einen Reagenzienverfall sein. Sollten die vorgegeben Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu prüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte (Kalibrierung)
- Visuelle Kontrolle der Testkitkomponenten auf Kontamination oder Undichtigkeit; eine bläulich verfärbte Substratlösung darf nicht mehr verwendet werden.

9.3. CUT-OFF

- CRP in gesunden Hunden < 10 mg/l
- Bereich der Testung 5–50 mg/l
- Sensitivität: 2,9 mg/l

9.4. AUSWERTUNG DER TESTERGEBNISSE

Die CRP-Konzentration der Hunde-Proben wird durch Multiplikation des von der Standardkurve abgelesenen Wertes mit der für die jeweilige Probe verwendeten Verdünnung errechnet. Werte > 10 mg/l gelten als erhöht/akute Entzündung.

Proben mit einer höheren Extinktion als Standard A sollten mit einer höheren Verdünnung nochmals getestet werden.

9.5. EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTS

- Die Diagnose einer Infektionserkrankung sollte nicht aufgrund eines einzelnen Tests gestellt werden. Eine konkrete Diagnose sollte sowohl Klinik, Symptomatik als auch serologische Daten berücksichtigen.
- Bakterielle Kontamination oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Probe können die Extinktionswerte beeinflussen.

9.6. INTERFERENZEN

Es wurden keine Kreuzreaktionen mit Maus, Ziege, Pferd, Ratte, Rind, Huhn, Schaf, Schwein und Mensch festgestellt.

Es wurden keine Interferenzen mit Hämoglobin/Hämolysat festgestellt.

10. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Tragen von Schutzkleidung (Einmal-Handschuhe, Laborkittel, Schutzbrille) und Händewaschen nach Ende der Testdurchführung.
- Essen, Trinken und Rauchen während der Testdurchführung verboten.
- Das Probenmaterial und die Kontrollen müssen als potentiell infektiös angesehen werden und sind mit den verwendeten Testkitkomponenten nach der Testdurchführung fachgemäß zu entsorgen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Keine Reagenzien unterschiedlicher Chargen zusammen verwenden.
- Deckel der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen.
- Flaschen nach Gebrauch sofort fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Reagenzien-Fläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
 - Probenverdünnungspuffer enthält 0,06% Bronidox als Konservierungsmittel. Kontakt mit Haut, Augen und Kleidung vermeiden. Bei Kontakt mit Wasser spülen. Bei Verschlucken den Arzt aufsuchen.
 - Stopp-Reagenz enthält 1 M Salzsäure. Salzsäure ist ätzend und kann starke Verbrennungen verursachen. Bei Kontakt mit Augen oder Haut intensiv mit Wasser spülen und den Arzt aufsuchen. Außerhalb der Reichweite von Kindern aufbewahren.
 - Substratlösung enthält Wasserstoffperoxid.

Eine Berührung mit Augen, Haut oder Schleimhaut ist unbedingt zu vermeiden.

- **ACHTUNG:** Flüssigabfall, der Stopp-Reagenz enthält, muss zuerst neutralisiert werden, bevor er in eine Hypochloritlösung gegeben wird.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Niemals mit dem Mund pipettieren.
- Beschriften Sie Probenmaterial und zugehöriges Probenröhrchen, damit die exakte Zuordnung gewährleistet ist.
- Für jede Probe ein neues Probenröhrchen verwenden.
- Während der Inkubations- und Waschschrte müssen die Wells vollständig mit Flüssigkeit bedeckt sein.
- Die Wells sollten nicht länger leer bleiben als unbedingt notwendig.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Testergebnissen Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Wells pipettieren.
- Der **MegaELISA® CRP canine** ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, das die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

Die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung sind strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet nicht für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse, die mit diesen Gründen in Zusammenhang stehen. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.

11. HAFTUNG

Das gesamte Haftungsrisiko im Zusammenhang mit der Verwendung dieses Produktes liegt beim Käufer. Der Hersteller übernimmt keine Haftung für indirekte, spezielle oder daraus folgende Schäden jeglicher Art, die aus der Benutzung, Testdurchführung und -auswertung dieses Produktes resultieren.

12. KURZ-PROTOKOLL MegaELISA® CRP canine

TESTVORBEREITUNG

Benötigte Mikrotiterstreifen und Reagenzien auf **Raumtemperatur (20–25°C)** bringen.

Waschpuffer 1:50 mit destilliertem Wasser **verdünnen**.

Proben und Kontrollen 1:100 mit Verdünnungspuffer **verdünnen**
(z. B. 10 µl Probe + 990 µl PVP).

Standard-Verdünnungsreihe erstellen.

TESTDURCHFÜHRUNG

100 µl Assay-Puffer
je Well pipettieren.

20 µl verdünnte Plasma- oder Serumproben bzw. **Kontrollen**
bzw. **Standard-Verdünnungen**
je Well pipettieren.

Zugedeckt **60 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C) auf dem Shaker** inkubieren.

3× mit je 350 µl Waschpuffer waschen.

100 µl Konjugat
je Well pipettieren.

Zugedeckt **30 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C)**
im Dunkeln auf dem Shaker inkubieren.

5× mit je 350 µl Waschpuffer waschen.

100 µl Substrat (TMB)
je Well pipettieren.

Zugedeckt **15–20 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C)**
im Dunkeln auf dem Shaker inkubieren.

100 µl Stopp-Reagenz
je Well pipettieren.

Photometrische Auswertung der Wells bei 450 nm.
Referenzwellenlänge 590–650 nm.

1. INTRODUCTION

As response to tissue injury and inflammation, the body produces, among others, so-called acute-phase proteins (APP) in the liver. The C-reactive protein (CRP) is the most sensitive and fastest acute-phase protein of the dog, with low serum concentrations during normal homeostasis and a quick answer during and after beginning of inflammation. The function of CRP is, among others, stimulation of the unspecific immune defence by activation of phagocytes and the complement cascade.

The measurement of CRP in dogs is useful for the diagnostics and follow-up of inflammatory diseases. In healthy dogs, there is a low CRP level below 10 mg/l. A drastic increase in the CRP level occurs on inflammatory processes within few hours (Ø 24–28 h by a factor of 10 to 100) due to infections, immune disorders, neoplasia and traumata. As soon as the inflammation subsides through a successful therapy, the CRP level decreases rapidly within Ø 24–28 h.

Therefore CRP can be regarded as a real-time marker. Indicating inflammations, CRP is more sensitive than the determination of rectal temperature or leucocyte differential diagnostics. Another advantage of CRP determination is its independence to endogenous or iatrogenic disturbing factors (e. g. glucocorticoids, stress).

The **MegaELISA® CRP** canine is based on highly specific antibodies against canine CRP. It can be carried out with dog plasma or serum in the veterinary practice and/or in the laboratory.

2. INTENDED USE

MegaELISA® CRP canine is an enzyme immunoassay for the quantitative detection of C-reactive protein (CRP) in plasma or serum of the dog.

3. TEST PRINCIPLE

The **MegaELISA® CRP** canine is an indirect quantitative immunoassay to detect C-reactive protein (CRP) using a sandwich principle.


Specific polyclonal antibodies against CRP are bound to the surface of the wells. The diluted plasma or serum samples to be tested as well as the Controls are pipetted into the wells and incubated at room temperature (20–25°C). After a wash step, the Conjugate against CRP, labelled with horse radish peroxidase (HRP), is added and incubated at room temperature (20–25°C). Non-bound Conjugate is removed in another wash step. After addition of Substrate (Tetramethylbenzidine, TMB), with positive samples, the bound enzyme changes the colourless solution in the wells into a blue solution. By addition of Stop solution (HCl), the colour changes from blue to yellow.

With help of the Standard curve, the results of the samples are quantifiable.

4. TEST-KIT COMPONENTS

4.1. REAGENTS / COMPONENTS PROVIDED WITH THE TEST-KIT

The reagents of one package are sufficient for 96 determinations.

	96's kit	Content	
1.	12 strips with 8 wells	ELISA plate , coated with specific antibodies against canine CRP	
2.	100 ml	Sample dilution buffer (SDB, contains 0.06 % Bronidox), ready to use, transparent cap	
3.	30 ml	Wash buffer (50× buffer), transparent cap	
4.	12 ml	Assay buffer , ready to use, transparent cap	
5.	0.4 ml	Standard stock solution (500 ng/100 µl canine CRP), red cap	
6.	0.05 ml	Control 1 ("low Control"), yellow cap	
7.	0.05 ml	Control 2 ("high Control"), yellow cap	
8.	12 ml	Conjugate (peroxidase-conjugated CRP-specific antibodies, ready to use, transparent cap	
9.	12 ml	Substrate (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine [TMB]/H ₂ O ₂), ready to use, brown cap. Do not expose to sun light.	
10.	12 ml	Stop solution (1 M hydrochloric acid [HCl]), ready to use, transparent cap	
11.	1	Microplate lid	
12.	1	Evaluation sheet	
13.	1	Certificate of Analysis	
14.	1	Instructions for use	

4.2. REQUIRED, NON-PROVIDED REAGENTS / DEVICES

- Distilled or deionised water
- Disposable sample tubes (sample dilution)
- Laboratory pipettes (range between 5 and 1000 µl)
- Multichannel pipette (100 µl)
- Vortex mixer
- Filter paper/laboratory cloths
- Measuring cylinder (1000 ml)
- Stop watch
- ELISA plate shaker (orbital shaker, 500 rpm)
- Washing station for ELISA plates (350 µl)
- Photometer for ELISA plates (450 nm, reference filter 590–650 nm)
- Waste bin with a 0.5 % hypochlorite solution

5. STABILITY AND STORAGE



Store at
2–8°C



Expiry date
– see label



For veterinary use
only



Lot number



In vitro diagnosticum



Do not use test-kit
components from
different kits, lot
numbers or beyond
stated expiry date.



Follow instructions for
use precisely

- Microbial contamination must be avoided. After the expiration date, the guarantee of quality is not provided.
- When opening the sealed aluminium pouch with the ELISA plate, care must be taken that the reclosable clip closure is not damaged or even separated.
- A direct influence of light onto the colourless Substrate must be absolutely avoided to prevent degradation or colour change to blue by autooxidation. If the Substrate colour has changed to blue, it cannot be used any more (functional incapacity).

6. INFORMATION ON THE SAMPLE MATERIAL

- Use only dog plasma or serum samples.
- Centrifuge whole blood samples within 4 hours.
- Keep in mind that the sample material, as well as all used test-kit components, should have reached room temperature at the time of application.
- Mix the sample material well before use.
- Non-cooled (**20–25°C**), plasma or serum should be tested within 24 hours. At **2–8°C**, the plasma or serum can be stored up to 5 days. Plasma or serum samples can be aliquoted and permanently stored at minimum –20°C. Avoid repeated freezing and thawing.
- Some lipaemic samples can cause a background colour. In such cases, it is recommended to repeat the test with better quality samples.
- Do not heat inactivate.
- **ATTENTION:** Partially filled and/or insufficient mixed EDTA, Citrate or Heparin tubes could create interference effects resulting in varying test results.

7. TEST PREPARATION

Read instructions for use carefully before starting the test. For the reliability of the results, it is important to follow the instructions for use exactly as described. Carry out the test in the given order and without delay. Use clean disposable pipette tips for each pipetting step.

7.1. GENERAL

- Remove the strips from the aluminium pouches after they have reached room temperature. To avoid loss by evaporation, it is advisable to cover or mask them. Immediately return non-used strips into the pouch, close the pouch and store it at 2–8°C.
- Mix the reagents well immediately before their use.
- After use, reagents should be stored at 2–8°C again.
- Strips that were once used cannot be used again.
- Damaged test-kit components must not be used.
- Direct contact of samples with the test-kit components has to be avoided (cross-contamination).
- Direct solar radiation during testing must be avoided.

7.2. PREPARATION OF WASH BUFFER 1:50

Mix 1 part of the Wash buffer concentrate with 49 parts of distilled water. When crystals are visible in the Wash buffer concentrate, dissolve these by warming the Wash buffer concentrate in a water bath at 37°C. The diluted buffer will be stable for 4 weeks if stored at 2–8°C.

7.3. SAMPLE PREPARATION / SAMPLE DILUTION 1:100

- The samples to be tested are diluted 1:100 with Sample dilution buffer (SDB, e.g. 10 µl sample + 990 µl SDB) before beginning. The controls must also be diluted!
- Homogenise the sample-buffer mixture (SBM) well (repeated mixture with pipette or vortex mixer).
- **ATTENTION:** During the use of an ELISA washing station, the SBM must be free of particles. To guarantee this, please centrifuge the SBM at 5000 rpm for 5 minutes.
- To determine very low CRP concentrations (< 5 mg/l) in the sample and Control, the samples should be diluted 1:50 or 1:25. Lower dilutions than 1:25 are not recommended.
- To determine very high CRP concentrations (> 50 mg/l), the samples should be measured at higher dilutions (e.g., 1:200 or 1:500).

7.4. PREPARATION OF THE STANDARDS

- The standards have to be prepared freshly before each use. Use the SDB for this.
- The undiluted standard has a concentration of 500 ng/100 µl.
- Prepare several standard dilutions.

ID	Concentration	Standard dilution
Standard A	500 ng/ml	900 µl SDB + 100 µl Standard stock solution
Standard B	278 ng/ml	400 µl SDB + 500 µl Standard A
Standard C	154 ng/ml	400 µl SDB + 500 µl Standard B
Standard D	86 ng/ml	400 µl SDB + 500 µl Standard C
Standard E	48 ng/ml	400 µl SDB + 500 µl Standard D
Standard F	0 ng/ml	SDB

Table 1: Preparation of the standard dilutions

8. TEST PROCEDURE

- Mix sample material well before application.
- **It is recommended to test controls, standards and samples in duplicates.**
- Before beginning, the position of the patient samples, the Controls and the standard dilutions on the ELISA plate must be determined on the Evaluation sheet supplied with the kit.
- Use a multichannel pipette for Assay buffer, Conjugate, TMB and stop solution!

8.1. SAMPLING AND FIRST INCUBATION

- Place the required amount of strips into the holding frame.
- Add **100 µl** each of **Assay buffer** into each well (multichannel pipette).
- Add **20 µl** each of
 - **Standard A to F**
 - **diluted Controls**
 - **diluted samples (SBM)**
 in the desired order into the particular well.
- Cover the ELISA plate and incubate for **60 minutes at room temperature (20–25°C)** on the shaker (500 rpm).

8.2. WASHING – CAREFULLY and STRICTLY FOLLOWING THE INSTRUCTIONS!

AUTOMATIC WASHING, 3× with 350 µl each

- Remove the incubation solution by emptying into a waste bin with hypochlorite. Disposal must be made according to official regulations.
- **ATTENTION:** SBM still containing any particles should be manually removed from the cavities by shaking off (danger of blockage of the washing needles).

- Observe correct setting of the washing station (**3×350 µl**).
- To reach optimal washing results use at least 350 µl Wash buffer per well and wash step.
- Aspirate liquid completely after each wash step.
- After the final wash step, beat the plate carefully but thoroughly on filter paper/laboratory cloth. There should not be any residual moisture in the cavities.

8.3. SECOND INCUBATION

- Add **100 µl Conjugate** into each well (multichannel pipette).
- Cover the ELISA plate and incubate for **30 minutes at room temperature (20–25 °C)** and **in the dark** (e. g., by covering with aluminium foil) on the shaker (500 rpm).

8.4. WASHING

- Wash as described in issue 8.2., but with **5 washing steps**.

8.5. THIRD INCUBATION

- Add **100 µl Substrate (TMB)** into each well (multichannel pipette).
- Cover the ELISA plate and incubate for **15–20 minutes at room temperature (20–25 °C)** and **in the dark** on the shaker (500 rpm).
- Add **100 µl Stop solution** into each well, in the same order and at the same rate as for the TMB substrate solution (multichannel pipette).

8.6. MEASUREMENT

- After careful mixing (tipping softly at the plate rim), the extinction can be measured at 450 nm within 10 minutes after addition of the Stop solution. An additional measurement at the reference wavelength 590–650 nm is recommended.
- If duplicates or multiple determinations were done, calculate the **mean extinction values**.

9. TEST EVALUATION

9.1. STANDARD CURVE

The standard curve is created by plotting the standard concentration on the x-axis (linear scale) against the extinction of the standards on the y-axis (linear scale) (see fig.1). A 4-parameter method (curve fitting) should be used for automatic data reduction. Alternatively, a quadratic (polynomial) analysis is also possible.

ID	Concentration	Extinction at 450 nm
Standard A	500 ng/ml	3.088
Standard B	278 ng/ml	1.297
Standard C	154 ng/ml	0.456
Standard D	86 ng/ml	0.211
Standard E	48 ng/ml	0.114
Standard F	0 ng/ml	0.006

Table 2: Example for evaluation of the standard concentration

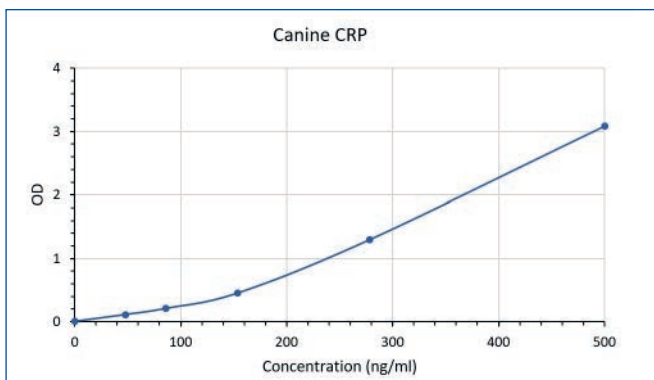


Fig.1: Example for evaluation of the standard concentration

ID	Value
A	0.032593
B	1.85576
C	849.366
D	11.2598
R ²	0.9996

Calculation by means of curve fitting:

$$y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$$

$$y = (0.032593 - 11.2598) / (1 + x/849.366)^{1.85576} + 11.2598$$

9.2. INTERNAL QUALITY CONTROL

The values of the controls are shown on the CoA supplied. These should lie on the determined standard curve.

A variation of the required values as well as any clouding or blue staining of the colourless Substrate before addition into the cavities can be a hint on expiry of reagents. If the prescribed issues are not fulfilled, following should be ensured before test repetition:

- Shelf life of the used reagents
- Functionality of the used machines (calibration)
- Visual control of the test-kit components for contamination or leakage; a blueish stained Substrate solution should not be used.

9.3. CUT-OFF

- CRP in healthy dogs < 10 mg/l
- Range of testing 5–50 mg/l
- Sensitivity: 2.9 mg/l

9.4. EVALUATION OF TEST RESULTS

The CRP concentration of the dog samples is calculated by multiplication of the value read from the standard curve by the dilution used for the respective sample. Values > 10 mg/l are considered elevated/acute inflammation.

Samples with a higher absorbance than standard A should be retested with a higher dilution.

9.5. LIMITATIONS OF THE TEST PROCEDURE

- The diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptoms as well as serological data.
- Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the extinction values.

9.6. INTERFERENCES

There were no cross reactions with mouse, goat, horse, rat, cattle, chicken, sheep, pig and human.

There were no interferences with hemoglobin/hemolysate.

10. SAFETY MEASURES AND PRECAUTIONS

- Wear safety clothes (disposable gloves, lab coat, safety glasses) and wash the hands after finishing the test procedure.
- No eating, drinking and smoking during test procedure.
- The sample material and Controls must be seen as potentially infectious and disposed of accordingly after test procedure, together with the used test-kit components.
- Do not use reagents of other manufacturers together with the reagents of this test-kit.
- Do not mix reagents of different Lot numbers.
- Do not change the caps of the individual reagents among each other.
- Close bottles immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening, the reagent bottles must be checked for microbial contamination before reusing.

- – Sample dilution buffer contains 0.06 % Bronidox as preservative. Avoid contact with skin, eyes and clothing. Upon contact, wash with water. If ingested, call a physician.
- – Stop solution contains 1 M Hydrochloric acid. Hydrochloric acid is caustic and can cause severe burns. Upon contact with eyes or skin, rinse thoroughly with water and consult a doctor. Keep out of the reach of children.
- – Substrate solution contains hydrogen peroxide.

Absolutely avoid eye, skin or mucosa contact.

- **ATTENTION:** Liquid waste containing Stop solution must be neutralised prior to addition to a hypochlorite solution.
- Only use clean pipette tips, dispenser and laboratory material.
- Never pipet with your mouth.
- Label sample material and associated sample tube to ensure a precise assignment.
- Use a new sample tube for each sample.
- During the incubation and wash steps, the cavities must be completely covered with liquid.
- The cavities of the ELISA plate must not stay empty longer as necessarily required.
- To avoid cross contamination and falsely elevated test results, pipet the patient samples and conjugate carefully into the cavities of the ELISA plate.
- **MegaELISA® CRP** canine is only provided for the use of qualified staff that knows the work technique objectionable.

The test procedure, the information, the safety measures and warnings in the Instructions for use are to be followed strictly. For use of the test-kit in diagnostic instruments, the test method has to be validated. Each change in appearance, composition and the test procedure as well as each use in combination with other products not authorised by the manufacturer is not permitted; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents being associated herewith. No liability is accepted for false test results due to visual evaluation.

11. LIABILITY

The entire risk of liability in connection with the use of this product remains with the purchaser. The manufacturer is not liable for indirect, special or consequential damages of any kind resulting from the usage, test performance and evaluation of this product.

12. SHORT PROTOCOL MegaELISA® CRP canine

TEST PREPARATION

Warm needed strips and reagents to **room temperature (20–25°C)**.

Dilute Wash buffer 1:50 with distilled water.

Dilute samples and controls 1:100 with Sample dilution buffer
(e. g. 10 μl sample + 990 μl SDB)

Prepare standard dilution series

TEST PROCEDURE

Add **100 μl Assay buffer**
into each well.

Add **20 μl of 1:100 diluted plasma or serum samples** or **Controls**
or **Standard dilutions**
into each well.

Cover and incubate **60 minutes at room temperature (20–25°C) on the shaker.**

Wash 3 \times with 350 μl Wash buffer each.

Add **100 μl Conjugate**
into each well.

Cover and incubate **30 minutes at room temperature (20–25°C)**
in the dark on the shaker.

Wash 5 \times with 350 μl 1 \times Wash buffer each.

Add **100 μl Substrate (TMB)**
into each well.

Cover and incubate **15–20 minutes at room temperature (20–25°C)**
in the dark on the shaker.

Add **100 μl Stop solution**
into each well.

Photometric evaluation of the cavities at 450 nm.

Reference wavelength 590–650 nm.

FÜR EIGENE NOTIZEN / FOR YOUR OWN NOTES