**Arbeitsanleitung / Manual**

# VDBP ELISA

***Zur in-vitro-Bestimmung von VDBP (Vitamin-D-Bindungsprotein) in Serum, Plasma und Urin***

***For the in vitro determination of VDBP (vitamin D binding protein) in serum, plasma and urine***

Gültig ab / Valid from 2022-04-11

REF K 2314

Σ 96

+8 °C
+2 °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** 4

**6. PROBENVORBEREITUNG** 5

*Serum- und Plasmaproben* 5
*Urinproben* 5

**7. TESTDURCHFÜHRUNG** 5

*Testprinzip* 5
*Pipettierschema* 6

**8. ERGEBNISSE** 7

**9. EINSCHRÄNKUNGEN** 8

**10. QUALITÄTSKONTROLLE** 8

*Referenzwerte* 8
*Zusätzliche Referenzwerte* 9

**11. TESTCHARAKTERISTIKA** 9

*Genauigkeit – Präzision* 9
*Genauigkeit – Richtigkeit* 10
*Linearität* 10
*Analytische Sensitivität* 11
*Analytische Spezifität* 11

**12. VORSICHTSMASSNAHMEN** 12

**13. TECHNISCHE MERKMALE** 12

**14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST** 13

**15. LITERATUR** 14

*Allgemeine Literatur* 14
*Literatur mit dem Immundiagnostik AG VDBP-ELISA* 14

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung des freien bzw. nicht im Actin-Komplex gebundenen Vitamin-D-bindenden Proteins (VDBP) aus Serum, Plasma und Urin geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

## 2. EINLEITUNG

Vitamin-D-Bindeprotein (VDBP, auch *group-specific component*/Gc-Protein) ist ein multifunktionales Serumprotein, welches in der Leber gebildet wird. Erhöhte Östrogenspiegel, z. B. während der Schwangerschaft oder durch hormonelle Verhütung, regen die Synthese an. VDBP kann in Plasma, Aszites, Liquor, Urin und auf der Oberfläche von verschiedenen Zelltypen nachgewiesen werden.

Im Blut bindet VDBP den Großteil des zirkulierenden 25-OH-Vitamin D und transportiert es zu den Nieren, wo es zum Hormon 1,25-$(OH)_2$-Vitamin D umgewandelt wird.

Zusätzlich bindet VDBP monomeres Aktin im Verhältnis 1:1. Aktin ist ein intrazelluläres Protein, das als Monomer oder als Filament vorliegen kann. Bei massiver Gewebezerstörung und Zelltod steigt der Aktinspiegel im Plasma signifikant an, woraufhin sich VDBP-Aktin-Komplexe bilden, die schnell abgebaut werden. Daher sinkt der VDBP-Spiegel bei Trauma- oder Sepsis-Patienten deutlich ab, besonders massiv bei Patienten mit hohem Risiko für Multiorganversagen.

Des Weiteren ist VDBP ein Vorläufer des immunmodulierenden Proteins Gc-MAF (*Gc protein-derived macrophage activating factor*), welches die gegen Tumore gerichtete Makrophagenaktivität erhöht.

**Indikationen**

- Prognosefaktor bei Trauma
- Nephrotisches Syndrom
- Tumorerkrankungen

## 3. INHALT DER TESTPACKUNG

| Art.-Nr. | Bezeichnung | Kit-Komponenten | Menge |
|---|---|---|---|
| K 2314 | PLATE | Mikrotitermodul, vorbeschichtet | 12 x 8 Vertiefungen |
| K 0001.C.100 | WASHBUF | Waschpufferkonzentrat, 10x | 2 x 100 ml |
| K 2314 | CONJ | Konjugatkonzentrat, peroxidasemarkiert (Kaninchen anti-human-VDBP) | 1 x 200 µl |





| Art.-Nr. | Bezeichnung | Kit-Komponenten | Menge |
|---|---|---|---|
| K 2314 | STD | Standards, lyophilisiert (60; 20; 6,6; 2,2; 0 ng/ml) | 2 x 5 vials |
| K 2314 | STDBUF | Standardverdünnungspuffer, gebrauchsfertig | 1 x 20 ml |
| K 2314 | CTRL1 | Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen) | 2 x 1 vial |
| K 2314 | CTRL2 | Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen) | 2 x 1 vial |
| K 2314 | 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 |

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

## 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1 000 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.
- **Die lyophilisierten Standards (STD)** und **Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. STD und CTRL werden mit **500 µl Standardverdünnungspuffer (STDBUF)** rekonstituiert und kurz geschwenkt, um eine vollständige Rekonstitution zu gewährleisten. Sie werden zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. **Standards und Kontrollen** (rekonstituierte STD und CTRL) **können 4 Wochen bei 2–8 °C oder 4 Wochen bei -20 °C gelagert werden.**
- **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 gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.





## 6. PROBENVORBEREITUNG

### *Serum- und Plasmaproben*

Serum- und Plasmaproben (Normalpatienten) werden **1:40 000** in Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) verdünnt. Zum Beispiel:

- **20 µl** Probe + **980 µl** SAMPLEBUF, gut mischen = **1:50** (**Verdünnung I**)
- **20 µl** Verdünnung I + **980 µl** SAMPLEBUF, gut mischen = **1:50 (Verdünnung II**)
- **20 µl** Verdünnung II + **300 µl** SAMPLEBUF, gut mischen = **1:16** (**Verdünnung III**). Diese entspricht nun einer **Gesamtverdünnung von 1:40 000**.

**100 µl** der **Verdünnung III** wird im Test pro Vertiefung eingesetzt.

Andere Patientenkollektive werden entsprechend der erwarteten VDBP-Konzentration vorverdünnt.

Serum- und Plasmaproben sind bei -20 °C für 9 Monate stabil. Mehr als 3 Einfrier-Auftau-Zyklen sind zu vermeiden.

### *Urinproben*

Urinproben werden **1:10** in Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) verdünnt. Zum Beispiel:

- **100 µl** Probe + **900 µl** SAMPLEBUF, mischen = **1:10**

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

Andere Patientenkollektive werden entsprechend der erwarteten VDBP-Konzentration vorverdünnt.

## 7. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Testprinzip*

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung des VDBP aus Serum, Plasma und Urin. In diesem ELISA wird das VDBP aus den Proben an polyklonale, auf Mikrotiterplatten fixierte Antikörper (Kaninchen-anti-human-VDBP) gebunden. Während eines Waschschrittes werden ungebundene Komponenten entfernt. Gebundenes VDBP 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. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei

450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

### *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 automatenspezifische 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 Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. |
| 2. | **100 µl Standards/Kontrollen/verdünnte 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 Waschschritt 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 Waschschritt 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 Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

## 8. ERGEBNISSE

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

**1. 4-Parameter-Funktion**

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

**2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung**

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

**3. Gewichtete Spline-Funktion**

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

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

**Serum-/Plasmaproben**

Um die Konzentration in Serum-/Plasmaproben zu bestimmen, wird der ermittelte VDBP-Wert mit dem Verdünnungsfaktor **40 000** multipliziert.

**Urinproben**

Um die Konzentration in Urinproben zu bestimmen, wird der ermittelte VDBP-Wert mit dem Verdünnungsfaktor **10** multipliziert.

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*

**Plasma-/Serumproben**

200–550 mg/l

L. Thomas, 1982

Weitere Referenzwerte finden Sie in folgenden Publikationen im Literaturverzeichnis: Bouillon (1977), Haughton (1992), Jorgensen (2004), Heijboer (2012).

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.





**Urinproben**

Doorenbos et al. analysierten die Ausscheidung von VDBP im 24-h-Urin. Bei gesunden Kontrollen ergab sich ein Wert von 64 µg/24 h (23–111 µg/24 h).

Mirkovic et al. normalisierten die erhaltenen VDBP-Werte auf Albuminurie. Normalbuminurie maßen sie als 0,44 mg/mg Albumin (0,22–0,77 mg/mg Albumin).

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

### *Zusätzliche Referenzwerte*

Bei einigen Patientengruppen ist der Referenzbereich von Serum-/Plasmaproben laut Literatur verändert.

**Schwangere**

Die Proben von Schwangeren weisen laut den bei Serum-/Plasmaproben genannten Referenzen einen um 30–80 % erhöhten Referenzbereich auf.

**Lebererkrankungen**

Gemäß Haughton et al. ist der Referenzbereich von Leberkranken um 35 % niedriger als der von gesunden Kontrollen.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### *Genauigkeit – Präzision*

**Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n=16**

Die Wiederholbarkeit wurde mit 2 Serumproben unter gleichbleibenden Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

| Probe | Mittelwert [mg/l] | VK [%] |
|---|---|---|
| 1 | 242,4 | 5,0 |
| 2 | 429,0 | 3,3 |

**Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n=17**

Die Reproduzierbarkeit wurde mit einer Serum- und einer Kontrollprobe unter variablen Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

| Probe | Mittelwert [mg/l] | VK [%] |
|---|---|---|
| 1 | 128,3 | 13,9 |
| 2 | 383,2 | 3,3 |

### *Genauigkeit – Richtigkeit*

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. 4 Serumproben wurden dafür mit bekannten VDBP-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 [%] |
|---|---|---|---|---|
| 2,25 | 5 | 7,25 | 8,00 | 110,27 |
| | 10 | 12,25 | 13,17 | 107,45 |
| | 20 | 22,25 | 25,55 | 114,83 |
| 6,91 | 2,5 | 9,41 | 9,07 | 96,45 |
| | 7,5 | 14,41 | 13,58 | 94,28 |
| | 15 | 21,91 | 23,39 | 106,76 |
| 2,21 | 5 | 7,21 | 7,78 | 107,96 |
| | 10 | 12,21 | 12,72 | 104,22 |
| | 20 | 22,21 | 22,87 | 102,99 |
| 6,74 | 2,5 | 9,24 | 8,79 | 95,16 |
| | 7,5 | 14,24 | 13,11 | 92,13 |
| | 15 | 21,74 | 22,53 | 103,66 |

### *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 einer seriellen Verdünnung von 2 Serumproben nachgewiesen.

Für VDBP in Serum, Plasma und Urin wurde Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung der verwendeten Probenverdünnung ein lineares Verhalten im Bereich von 2,38 bis 46,20 ng/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als ±20 %.





| Probe | Verdünnung | Erwartet [ng/ml] | Gemessen [ng/ml] | Wiederfindung [%] |
|---|---|---|---|---|
| A | 1:5 000 | 46,20 | 46,20 | 100,00 |
| | 1:10 000 | 23,10 | 23,30 | 100,87 |
| | 1:20 000 | 11,55 | 10,50 | 90,91 |
| | 1:40 000 | 5,78 | 5,83 | 100,87 |
| | 1:80 000 | 2,89 | 2,80 | 96,97 |
| B | 1:10 000 | 38,00 | 38,00 | 100,00 |
| | 1:20 000 | 19,00 | 20,25 | 106,58 |
| | 1:40 000 | 9,50 | 8,75 | 92,11 |
| | 1:80 000 | 4,75 | 4,30 | 90,53 |
| | 1:160 000 | 2,38 | 2,49 | 104,74 |

### *Analytische Sensitivität*

Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Leerwert (*limit of blank*, LoB) 0,154 ng/ml

Nachweisgrenze (*limit of detection*, LoD) 0,944 ng/ml

Bestimmungsgrenze (*limit of quantitation*, LoQ) 0,944 ng/ml

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP17-A2 durchgeführt. Das festgelegte Präzisionsziel für die Bestimmungsgrenze lag bei 20 % VK.

### *Analytische Spezifität*

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen. Es wurde keine Kreuzreaktivität nachgewiesen.

| Getestete Substanz | Eingesetzte Konzentration | Gefundene Konzentration [ng/ml] | Fazit |
|---|---|---|---|
| h-Albumin | 10 µg/ml | < 0,154 | < LoB |
| CRP | 10 µg/ml | < 0,154 | < LoB |
| RBP | 10 µg/ml | < 0,154 | < LoB |

## 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 gesundheitsgefährdend und umweltschädlich. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen können zu Haut- und/oder Atemwegsreizungen führen. Jeder Kontakt mit den Substanzen ist zu vermeiden. Weiterführende Sicherheitsinformationen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen, welches Sie auf Anfrage bei der Immundiagnostik AG erhalten.
- 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 beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

## 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

## 15. LITERATUR

### *Allgemeine Literatur*


1. Bouillon, R., van Baelen, H. & de Moor, P., 1977. The measurement of the vitamin D-binding protein in human serum. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **45**(2), pp.225–31.
2. Fu, L. et al., 2009. Common genetic variants of the vitamin D binding protein (DBP) predict differences in response of serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] to vitamin D supplementation. *Clinical biochemistry*, **42**(10-11), pp.1174–7.
3. Haughton, M.A. & Mason, R.S., 1992. Immunonephelometric assay of vitamin D-binding protein. *Clinical chemistry*, **38**(9), pp.1796–801.
4. Heijboer, A.C. et al., 2012. Accuracy of 6 Routine 25-Hydroxyvitamin D Assays: Influence of Vitamin D Binding Protein Concentration. *Clinical Chemistry*, **58**(3), pp.543–548.
5. Jørgensen, C.S. et al., 2004. Gc globulin (vitamin D-binding protein) levels: an inhibition ELISA assay for determination of the total concentration of Gc globulin in plasma and serum. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, **64**(2), pp.157–66.
6. Malik, S. et al., 2013. Common variants of the vitamin D binding protein gene and adverse health outcomes. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*.
7. Schmidt-Gayk, H. et al., 1977. 25-hydroxy-vitamin-D in nephrotic syndrome. *Lancet*, **2**(8029), pp.105–8.
8. Thomas, L., 1982. Proteindiagnostik: Diagnose, Therapiekontrolle. **1**st ed., Frankfurt am Main: *Behringwerke, Medizinische Information und Vertrieb*.


### *Literatur mit dem Immundiagnostik AG VDBP-ELISA*


9. Cauley, J.A. et al., 2011. Serum 25-hydroxyvitamin D and clinical fracture risk in a multiethnic cohort of women: the Women's Health Initiative (WHI). *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, **26**(10), pp.2378–88.
10. Comabella, M. et al., 2010. Cerebrospinal fluid chitinase 3-like 1 levels are associated with conversion to multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, **133**(Pt 4), pp.1082–93.
11. Correale, J., Ysrraelit, M.C. & Gaitán, M.I., 2010. Gender differences in 1,25 dihydroxyvitamin D3 immunomodulatory effects in multiple sclerosis patients and healthy subjects. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **185**(8), pp.4948–58.







12. Doorenbos, C.R.C. et al., 2012. Antiproteinuric treatment reduces urinary loss of vitamin D-binding protein but does not affect vitamin D status in patients with chronic kidney disease. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, **128**(1-2), pp.56–61.
13. Gressner, O. et al., 2007. Gc-globulin concentrations and C5 haplotype-tagging polymorphisms contribute to variations in serum activity of complement factor C5. *Clinical biochemistry*, **40**(11), pp.771–5.
14. Jeffery, L.E. et al., 2012. Availability of 25-hydroxyvitamin D(3) to APCs controls the balance between regulatory and inflammatory T cell responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **189**(11), pp.5155–64.
15. Jeng, L. et al., 2009. Alterations in vitamin D status and anti-microbial peptide levels in patients in the intensive care unit with sepsis. *Journal of translational medicine*, **7**, p.28.
16. Lee, S.-H. et al., 2011. Relationship between group-specific component protein and the development of asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*, **184**(5), pp.528–36.
17. Meguro, S. et al., 2011. Plasma 25-hydroxyvitamin d is independently associated with hemoglobin concentration in male subjects with type 2 diabetes mellitus. *International journal of endocrinology*, 2011, p.362981.
18. Mirković, K. et al., 2013. Urinary vitamin D binding protein: a potential novel marker of renal interstitial inflammation and fibrosis. *PloS one*, **8**(2), p.e55887.
19. Prytuła, A. et al., 2012. Urinary and dialysate losses of vitamin D-binding protein in children on chronic peritoneal dialysis. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany),* **27**(4), pp.643–9.
20. Turner, A.M. et al., 2013. Circulating DBP level and prognosis in operated lung cancer: an exploration of pathophysiology. *The European respiratory journal,* **41**(2), pp.410–6.
21. Wagner, D. et al., 2013. Randomized clinical trial of vitamin D3 doses on prostatic vitamin D metabolite levels and ki67 labeling in prostate cancer patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **98**(4), pp.1498–507.
22. Wang, X. et al., 2013. Vitamin D-binding protein levels in female patients with primary hyperparathyroidism. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*, **19**(4), pp.609–13.
23. Wood, A.M. et al., 2011. Vitamin D-binding protein contributes to COPD by activation of alveolar macrophages. *Thorax*, **66**(3), pp.205–10.

***Verwendete Symbole:***

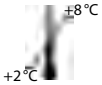
| | | | |
|---|---|---|---|
| | Temperaturbegrenzung | | Bestellnummer |
| | *In-Vitro*-Diagnostikum | | Zu verwenden mit |
| | Hersteller | | Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen |
| | Chargenbezeichnung | | Verwendbar bis |
| | Achtung | | Gebrauchsanweisung beachten |
| | Spezifikationsdatenblatt beachten | | Reizend |

# VDBP ELISA

***For the in vitro determination of VDBP (vitamin D binding protein) in serum, plasma and urine***

Valid from 2022-04-11

**REF K 2314**




**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

# Table of Contents


**1. INTENDED USE** 19

**2. INTRODUCTION** 19

**3. MATERIAL SUPPLIED** 19

**4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED** 20

**5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS** 20

**6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES** 21

*Serum and plasma samples* 21

*Urine* 22

**7. ASSAY PROCEDURE** 22

*Principle of the test* 22

*Test procedure* 22

**8. RESULTS** 23

**9. LIMITATIONS** 24

**10. QUALITY CONTROL** 25

*Reference range* 25

*Additional reference ranges* 25

**11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS** 26

*Accuracy – Precision* 26

*Accuracy – Trueness* 26

*Linearity* 27

*Analytical sensitivity* 28

*Analytical specificity* 28

**12. PRECAUTIONS** 28

**13. TECHNICAL HINTS** 29

**14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE** 29

**15. REFERENCES** 30

*General literature* 30

*Literature using the Immundiagnostik AG VDBP ELISA* 30






## 1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of free and not actin complex bound vitamin D binding protein (VDBP) in serum, plasma and urine. For *in vitro* diagnostic use only.

## 2. INTRODUCTION

Vitamin D binding protein (VDBP, also known as group-specific component / Gc protein) is a multifunctional serum protein which is formed in the liver. High estrogen levels, caused e.g. by pregnancy or hormonal birth control, stimulate its synthesis. VDBP can be found in plasma, ascites, liquor, urine and at the surface of various cell types.

In the blood, VDBP binds the bigger part of the circulating 25-OH vitamin D and brings it to the kidneys, where it is transformed into the hormone 1,25-$(OH)_2$ vitamin D.

In addition, VDBP binds monomeric actin at the ratio of 1:1. Actin is an intracellular protein which is available as monomer or filament. Massive tissue destruction or cell death cause the plasma level of actin to rise significantly, whereupon VDBP-actin complexes are formed which are removed quickly. Hence the VDBP level of trauma or sepsis patients decreases quickly, especially in patients with a high level of multiorgan failure.

Furthermore VDBP is a precursor of the immunomodulating protein Gc-MAF (Gc protein-derived macrophage activating factor) which increases the activity of macrophages against tumours.

**Indications**

- Prognostic factor for trauma patients
- Nephritic syndrome
- Tumours

## 3. MATERIAL SUPPLIED

| Cat. No. | Label | Kit components | Quantity |
|---|---|---|---|
| K 2314 | PLATE | Microtiter plate, pre-coated | 12 x 8 wells |
| K 0001.C.100 | WASHBUF | Wash buffer concentrate, 10 x | 2 x 100 ml |
| K 2314 | CONJ | Conjugate concentrate, peroxidase-labelled (rabbit-anti-VDBP) | 1 x 200 µl |

| Cat. No. | Label | Kit components | Quantity |
|---|---|---|---|
| K 2314 | STD | Calibrators, lyophilised (60; 20; 6,6; 2,2; 0 ng/ml) | 2 x 5 vials |
| K 2314 | STDBUF | Standard dilution buffer, ready-to-use | 1 x 20 ml |
| K 2314 | CTRL1 | Control, lyophilised (see specification for range) | 2 x 1 vial |
| K 2314 | CTRL2 | Control, lyophilised (see specification for range) | 2 x 1 vial |
| K 2314 | 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 |

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

## 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1 000 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 redissolved 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**.
- The **lyophilised standards (STD)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the STD and CTRL have to be reconstituted with **500 µl of standard dilution buffer (STDBUF)** and mixed by gentle inversion to ensure complete reconstitution. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and then mix thoroughly. **Standards and controls** (reconstituted STD and CTRL) **can be stored at 2–8 °C for 4 weeks or at -20 °C for 4 weeks.**
- **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 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*

Dilute all plasma and serum samples 1:40 000 with sample dilution buffer (SAMPLEBUF). For example:

- **20 µl** sample + **980 µl** SAMPLEBUF, mix well = **1:50** (**dilution I**)
- **20 µl** dilution I + **980 µl** SAMPLEBUF, mix well = **1:50** (**dilution II**)
- **20 µl** dilution II + **300 µl** SAMPLEBUF, mix well = **1:16** (**dilution III**). This results in a final dilution of 1:40 000.

For analysis, pipet **100 µl** of **dilution III** per well.

Other sample collectives should be diluted according to the expected VDBP concentration.

Serum and plasma samples can be stored for 9 months at -20 °C. Avoid more than 3 freeze thaw cycles.

### *Urine*

Urine samples have to be diluted 1:10 with sample dilution buffer (SAMPLEBUF). For example:

**100 µl** sample + **900 µl** SAMPLEBUF, mix well = **1:10**

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

Other sample collectives should be diluted according to the expected VDBP concentration.

## 7. ASSAY PROCEDURE

### *Principle of the test*

This enzyme immunoassay is a sandwich assay for the quantitative determination of VDBP in serum, plasma and urine samples. The wells of the microtiterplate are coated with polyclonal anti-VDBP antibodies. In a first incubation step, the VDBP in the samples is bound to the coated polyclonal rabbit antibodies (in excess). To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a second incubation step, a polyclonal peroxidase-labeled rabbit anti-VDBP 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 colour converts to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the VDBP concentration in the sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. VDBP, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

### *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/diluted samples** into the respective wells. |
| 3. | Cover the strips and incubate for **1 hour** 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 hour** 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/plasma samples**

The obtained VDBP levels of plasma and serum samples have to be multplied with the dilution factor of 40 000.

**Urine samples**

The obtained VDBP levels of urine samples have to be multplied with the dilution factor of 10.

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 can be further diluted and re-assayed. Please consider this greater dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range 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*

**Plasma / serum samples**

200–550 mg/l

L. Thomas, 1982

You can find further reference ranges in the following publications in the references section: Bouillon (1977), Haughton (1992), Jorgensen (2004), Heijboer (2012).

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

**Urine samples**

Doorenbos et al. analysed the urinary loss of VDBP in 24 h urine samples. In the healthy control group, they reported a value of 64 µg/24 h (23–111 µg/24 h).

Mirkovic et al. normalised the measured VDBP levels for albuminuria. Normalbuminuria was reported as 0,44 mg/mg albumin (0,22–0,77 mg/mg albumin).

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

### *Additional reference ranges*

For some patient groups, other reference ranges of serum / plasma samples have been reported.

**Pregnant women**

Samples of pregnant women were measured to have a 30–80 % higher reference range than the control groups (see publications cited for the serum reference range).

**Liver diseases**

According to Haughton et al., the reference range of patients with liver diseases is 35 % lower than the one of healthy controls.

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Accuracy – Precision*

**Repeatability (Intra-Assay); n=16**

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

| Sample | Mean value [mg/l] | CV [%] |
|---|---|---|
| 1 | 242.4 | 5.0 |
| 2 | 429.0 | 3.3 |

**Reproducibility (Inter-Assay); n=17**

The reproducibility was assessed with a serum and a control sample under varying parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots).

| Sample | Mean value [mg/l] | CV [%] |
|---|---|---|
| 1 | 128.3 | 13.9 |
| 2 | 383.2 | 3.3 |

### *Accuracy – Trueness*

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, VDBP spikes with known concentrations were added to 4 serum samples. The results below were obtained without consideration of the sample dilution factor.

| Sample [ng/ml] | Spike [ng/ml] | Expected [ng/ml] | Obtained [ng/ml] | Recovery [%] |
|---|---|---|---|---|
| 2.25 | 5 | 7.25 | 8.00 | 110.27 |
| | 10 | 12.25 | 13.17 | 107.45 |
| | 20 | 22.25 | 25.55 | 114.83 |
| 6.91 | 2.5 | 9.41 | 9.07 | 96.45 |
| | 7.5 | 14.41 | 13.58 | 94.28 |
| | 15 | 21.91 | 23.39 | 106.76 |





| Sample [ng/ml] | Spike [ng/ml] | Expected [ng/ml] | Obtained [ng/ml] | Recovery [%] |
|---|---|---|---|---|
| 2.21 | 5 | 7.21 | 7.78 | 107.96 |
| | 10 | 12.21 | 12.72 | 104.22 |
| | 20 | 22.21 | 22.87 | 102.99 |
| 6.74 | 2.5 | 9.24 | 8.79 | 95.16 |
| | 7.5 | 14.24 | 13.11 | 92.13 |
| | 15 | 21.74 | 22.53 | 103.66 |

### *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 2 different serum samples.

For VDBP in serum, plasma and urine, the method has been demonstrated to be linear from 2.38 to 46.20 ng/ml based on the standard curve without considering possibly used sample dilution factors, showing a non-linear behaviour of less than ±20 % in this interval.

| Sample | Dilution | Expected [ng/ml] | Obtained [ng/ml] | Recovery [%] |
|---|---|---|---|---|
| A | 1:5 000 | 46.20 | 46.20 | 100.00 |
| | 1:10 000 | 23.10 | 23.30 | 100.87 |
| | 1:20 000 | 11.55 | 10.50 | 90.91 |
| | 1:40 000 | 5.78 | 5.83 | 100.87 |
| | 1:80 000 | 2.89 | 2.80 | 96.97 |
| B | 1:10 000 | 38.00 | 38.00 | 100.00 |
| | 1:20 000 | 19.00 | 20.25 | 106.58 |
| | 1:40 000 | 9.50 | 8.75 | 92.11 |
| | 1:80 000 | 4.75 | 4.30 | 90.53 |
| | 1:160 000 | 2.38 | 2.49 | 104.74 |

*Analytical sensitivity*

The following values have been estimated based on the concentrations of the standard without considering possibly used sample dilution factors.

| | |
|---|---|
| Limit of blank, LoB | 0.154 ng/ml |
| Limit of detection, LoD | 0.944 ng/ml |
| Limit of quantitation, LoQ | 0.944 ng/ml |

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP17-A2. The specified accuracy goal for the LoQ was 20 % CV.

*Analytical specificity*

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against a range of compounds with structural similarity to VDBP. There was no cross-reactivity observed.

| Substance tested | Concentration added | Concentration obtained [ng/ml] | Conclusion |
|---|---|---|---|
| h-albumin | 10 µg/ml | < 0.154 | < LoB |
| CRP | 10 µg/ml | < 0.154 | < LoB |
| RBP | 10 µg/ml | < 0.154 | < LoB |

## 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 harmful to health and the environment. Substrates for enzymatic color reactions can also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances should be avoided. Further safety information can be found in the safety data sheet, which is available from Immundiagnostik AG on request.
- 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.





## 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 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 send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

## 15. REFERENCES

### *General literature*


1. Bouillon, R., van Baelen, H. & de Moor, P., 1977. The measurement of the vitamin D-binding protein in human serum. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **45**(2), pp.225–31.
2. Fu, L. et al., 2009. Common genetic variants of the vitamin D binding protein (DBP) predict differences in response of serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] to vitamin D supplementation. *Clinical biochemistry*, **42**(10-11), pp.1174–7.
3. Haughton, M.A. & Mason, R.S., 1992. Immunonephelometric assay of vitamin D-binding protein. *Clinical chemistry*, **38**(9), pp.1796–801.
4. Heijboer, A.C. et al., 2012. Accuracy of 6 Routine 25-Hydroxyvitamin D Assays: Influence of Vitamin D Binding Protein Concentration. *Clinical Chemistry*, **58**(3), pp.543–548.
5. Jørgensen, C.S. et al., 2004. Gc globulin (vitamin D-binding protein) levels: an inhibition ELISA assay for determination of the total concentration of Gc globulin in plasma and serum. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, **64**(2), pp.157–66.
6. Malik, S. et al., 2013. Common variants of the vitamin D binding protein gene and adverse health outcomes. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*.
7. Schmidt-Gayk, H. et al., 1977. 25-hydroxy-vitamin-D in nephrotic syndrome. *Lancet*, **2**(8029), pp.105–8.
8. Thomas, L., 1982. Proteindiagnostik: Diagnose, Therapiekontrolle. **1**st ed., Frankfurt am Main: *Behringwerke, Medizinische Information und Vertrieb*.


### *Literature using the Immundiagnostik AG VDBP ELISA*


9. Cauley, J.A. et al., 2011. Serum 25-hydroxyvitamin D and clinical fracture risk in a multiethnic cohort of women: the Women's Health Initiative (WHI). *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, **26**(10), pp.2378–88.
10. Comabella, M. et al., 2010. Cerebrospinal fluid chitinase 3-like 1 levels are associated with conversion to multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, **133**(Pt 4), pp.1082–93.
11. Correale, J., Ysrraelit, M.C. & Gaitán, M.I., 2010. Gender differences in 1,25 dihydroxyvitamin D3 immunomodulatory effects in multiple sclerosis patients and healthy subjects. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **185**(8), pp.4948–58.







12. Doorenbos, C.R.C. et al., 2012. Antiproteinuric treatment reduces urinary loss of vitamin D-binding protein but does not affect vitamin D status in patients with chronic kidney disease. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, **128**(1-2), pp.56–61.
13. Gressner, O. et al., 2007. Gc-globulin concentrations and C5 haplotype-tagging polymorphisms contribute to variations in serum activity of complement factor C5. *Clinical biochemistry*, **40**(11), pp.771–5.
14. Jeffery, L.E. et al., 2012. Availability of 25-hydroxyvitamin D(3) to APCs controls the balance between regulatory and inflammatory T cell responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **189**(11), pp.5155–64.
15. Jeng, L. et al., 2009. Alterations in vitamin D status and anti-microbial peptide levels in patients in the intensive care unit with sepsis. *Journal of translational medicine*, **7**, p.28.
16. Lee, S.-H. et al., 2011. Relationship between group-specific component protein and the development of asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*, **184**(5), pp.528–36.
17. Meguro, S. et al., 2011. Plasma 25-hydroxyvitamin d is independently associated with hemoglobin concentration in male subjects with type 2 diabetes mellitus. *International journal of endocrinology*, 2011, p.362981.
18. Mirković, K. et al., 2013. Urinary vitamin D binding protein: a potential novel marker of renal interstitial inflammation and fibrosis. *PloS one*, **8**(2), p.e55887.
19. Prytuła, A. et al., 2012. Urinary and dialysate losses of vitamin D-binding protein in children on chronic peritoneal dialysis. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany),* **27**(4), pp.643–9.
20. Turner, A.M. et al., 2013. Circulating DBP level and prognosis in operated lung cancer: an exploration of pathophysiology. *The European respiratory journal,* **41**(2), pp.410–6.
21. Wagner, D. et al., 2013. Randomized clinical trial of vitamin D3 doses on prostatic vitamin D metabolite levels and ki67 labeling in prostate cancer patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **98**(4), pp.1498–507.
22. Wang, X. et al., 2013. Vitamin D-binding protein levels in female patients with primary hyperparathyroidism. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*, **19**(4), pp.609–13.
23. Wood, A.M. et al., 2011. Vitamin D-binding protein contributes to COPD by activation of alveolar macrophages. *Thorax*, **66**(3), pp.205–10.

***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

Irritant

**Immundiagnostik AG**

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0
Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com