

ELISA Kit

Vitamin-D-Bindungsprotein

*Zur in vitro Bestimmung des Vitamin-D-Bindungsprotein in
Serum, Plasma und Urin*

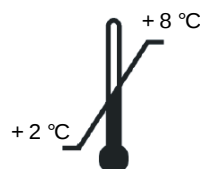
Vitamin D binding protein

*For the in vitro determination of Vitamin D binding protein in
serum, plasma and urine*

Gültig ab / Valid from 09.07.2010



K 2314



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

Tel.: ++49 6251 70190-0

Fax: ++ 49 6251 849430

e.mail: Info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhaltsverzeichnis	Seite/Page
Table of content	2
1. VERWENDUNGSZWECK	3
2. EINLEITUNG	3
3. TESTPRINZIP	3
4. INHALT DER TESTPACKUNG	4
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	4
7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	6
8. PROBENVORBEREITUNG	6
9. TESTDURCHFÜHRUNG	7
HINWEISE	7
PIPETTIERSHEMA	8
10. ERGEBNISSE	9
11. EINSCHRÄNKUNGEN	9
12. QUALITÄTSKONTROLLE	10
ERWARTETE ERGEBNISSE	10
13. TESTCHARAKTERISTIKA	11
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	11
SENSITIVITÄT	12
WIEDERFINDUNG	12
LINEARITÄT	13
14. LITERATUR	13
15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	14

Table of content	Page
1. INTENDED USE	17
2. CLINICAL RELEVANCE	17
3. PRINCIPLE OF THE TEST	17
4. MATERIAL SUPPLIED	18
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	19
7. PRECAUTIONS	19
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	20
9. ASSAY PROCEDURE	20
PROCEDURAL NOTES	20
TEST PROCEDURE	21
10. RESULTS	22
11. LIMITATIONS	22
12. QUALITY CONTROL	23
EXPECTED VALUES	23
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	24
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	24
SENSITIVITY	25
RECOVERY	25
SAMPLE DILUTION	26
14. REFERENCES	26
15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	27

1. VERWENDUNGSZWECK

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

2. EINLEITUNG

Vitamin D Bindeprotein (VDB; MW = 51 243 Da, Positionen 17-474, 458 Aminosäuren, P02774 VTDB_HUMAN) oder auch Gc-Globulin genannt ist ein multifunktionales Serumprotein. In seiner Struktur und Größe ist es dem Albumin ähnlich. VDB wird in der Leber synthetisiert. Der Hauptteil des im Blut zirkulierenden Vitamin D ist an das Gc-Globulin gebunden.

In der Literatur wird VDB als ein Makrophagen stimulierender Faktor beschrieben, der die Chemotaxin Aktivität beeinflusst und eine endotoxinen Bindungseigenschaft hat.

VDB kann Actin binden. Das Bindeverhältnis ist 1:1 mit einem monomeren Actin. Actin ist ein intrazelluläres Protein und kann sowohl polymerisieren als auch Filamente bilden. Die Beweglichkeit als auch die Form von Zellen ist von den Eigenschaften des Actins abhängig.

Bei massiver Gewebeerstörung und Zelltod steigt der Actinspiegel signifikant an. Die Actin-Gc-Globulin-Komplexbildung bedingt erniedrigte Gc-Globulin-Konzentration in Serumproben verschiedener Risikogruppen, die für ein multi-Organversagen in Frage kommen, z.B. Trauma, Sepsis, etc.

Indikationen

- Prognosefaktor bei Trauma
- Nephrotisches Syndrom

3. TESTPRINZIP

Dieser Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) dient zur quantitativen Bestimmung des VDB aus Serum, Plasma und Urin. In diesem ELISA wird das VDB aus den Proben an polyklonale, auf Mikrotiterplatten fixierte Antikörper (Kaninchen anti human VDB) gebunden. Während eines Waschschrtes werden ungebundene Komponenten entfernt. Gebundenes VDB wird mit Hilfe eines Antikörper-Peroxidase/TMB-System detektiert. Nach Zugabe einer Stopplösung wechselt die Farbe von blau nach gelb. Die Farbentwicklung ist dabei zur nachgewiesenen Analytmenge (Probe bzw. Standard) proportional.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art. Nr.	Bezeichnung	Kit Komponenten	Menge
K 2314MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	96
K 2314WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 2314K	CONJ	POD Antikörper, (Kaninchen anti human VDB, Peroxidase-markiert)	1 x 200 µl
K 2314ST	STD	Standards, lyophilisiert (60; 20; 6,6; 2,2; 0 ng/ml)	4 x 5 vials
K 2314KO1	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	4 vials
K 2314KO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	4 vials
K 2314PV	SAMPLEBUF	Verdünnungspuffer, gebrauchsfertig	2 x 100 ml
K 2314TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 2314AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes (aqua bidest.) oder deionisiertes Wasser
- Tiefkühlschrank -20 °C
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Wasserbad bzw. Heizblock
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenreader mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** (Pufferkonzentrat) kann **bei 2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. **Die verdünnte Pufferlösung ist bei 2-8 °C einen Monat in einem geschlossenen Gefäß haltbar.**
- Die lyophilisierten **STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrollen) werden mit **500 µl** aqua bidest. rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Rekonstituierte Standards und Kontrollen können nicht gelagert werden.
- Das **CONJ** (Konjugat, POD-markierter Antikörper) wird **1:100** in Waschpuffer verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer; nur die für den jeweiligen Ansatz benötigte Menge frisch ansetzen). Unverdünntes Konjugat ist bei 2–8 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Verdünntes Konjugat ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.
- Alle anderen Reagenzien sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar (siehe Etikett).

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet 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 Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

Serum- und Plasmaproben

Serum- und Plasmaproben (Normalpatienten) werden **1: 40000** in **SAMPLEBUF** (Probenverdünnungspuffer) verdünnt. Zum Beispiel:

10 µl Probe + 990 µl SAMPLEBUF=1:100 (**Verdünnung I**)

10 µl Verdünnung I + 990 µl SAMPLEBUF=1:10 000 (**Verdünnung II**)

250 µl Verdünnung II + 750 µl SAMPLEBUF=1:40 000 (**Verdünnung III**)

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

Proben mit einer erhöhten VDB-Konzentration müssen höher verdünnt und erneut gemessen werden. Zur Berechnung der VDB-Konzentration muss der Verdünnungsfaktor miteinkalkuliert werden. Andere Patientenkollektive werden entsprechend der erwarteten VDB Konzentration vorverdünnt.

Urinproben

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

100 µl Probe + 900 µl SAMPLEBUF

Proben mit einer erhöhten VDB-Konzentration müssen höher verdünnt und erneut gemessen werden. Zur Berechnung der VDB-Konzentration muss der Verdünnungsfaktor mit einkalkuliert werden. Andere Patientenkollektive werden entsprechend der erwarteten VDB Konzentration vorverdünnt.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Der Assay ist immer, nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung abzuarbeiten.

Pipettierschema

Die vorbeschichtete PLATE (Mikrotiterplatte) vor Gebrauch **5x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. PLATE nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.

Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

1. **100 µl STD** (Standard), **CTRL** (Kontrollen) und verdünnte Probe in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
2. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
3. Den Inhalt der PLATE verwerfen und **5 x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. PLATE nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
4. **100 µl** verdünntes **CONJ** (Konjugat) pro Vertiefung pipettieren.
5. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
6. Den Inhalt der PLATE verwerfen und **5 x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. PLATE nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
7. **100 µl SUB** (Substrat) in jede Vertiefung pipettieren.
8. **10-20 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren bis ausreichend große Farbdifferenzen auftreten.
9. **50 µl STOP** (Stopplösung) in jede Vertiefung pipettieren.
10. **Extinktion sofort** im Mikrotiterplattenphotometer bei **450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Sollte die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigen, sofort bei 405 nm gegen 620 nm (oder 690 nm) messen.

10. 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 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).

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/Plasma Proben

Um die Konzentration in Serum/Plasma Proben zu bestimmen wird der ermittelte VDBP-Wert mit **40000** multipliziert.

Uriproben

Um die Konzentration in Uriproben zu bestimmen wird der ermittelte VDBP-Wert mit **10** multipliziert.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer VDB Konzentration größer dem größten Standard sollten mit Verdünnungspuffer höher verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden.

12. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen die Kontrollen oder Serum/Plasma/Urin-Pools, bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Proben nicht gewährleisten.

Erwartete Ergebnisse

Normwerte

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

Plasma oder Serum 20 - 55 mg/dl
(MW = 51 243 Da, Positionen 17-474, 458 Aminosäuren, P02774 VTDB_HUMAN)

Abweichungen vom Normbereich liegen vor bei:

- **Schwangerschaft**
(erhöht, Mittelwert) 124.9 mg/dl^[2]
- **schweren Lebererkrankungen**
(erniedrigt, Mittelwert) 23 mg/dl^[2]

Urin < 200 µg/l

Erhöhte Werte weisen auf das **nephrotische Syndrom** hin.

Urin 0.8 - 34 mg/g gesamt Protein^[1]

13. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Es wird die Reproduzierbarkeit von zwei Proben innerhalb einer Messserie geprüft. Zwei Normalproben wurden 16-mal in einem VDB ELISA von einer Person angesetzt.

Intra-Assay VK: n= 16

Probe	VDB Mittelwert [mg/dl]	Intra-Assay Vk [%]
1	24.2	5,0
2	42.9	3,2

Es wird die Reproduzierbarkeit von einer Probe an unterschiedlichen Tagen geprüft. Eine Normalprobe wurde an verschiedenen Tagen und von verschiedenen Personen im VDB ELISA gemessen.

Inter-Assay VK: n= 14

Probe	VDB Mittelwert [mg/dl]	Inter-Assay Vk [%]
1	19.3	12.7

Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 20-mal der Standard Null von einer Person im VDB ELISA.

Nachweisgrenze: $n=22$

Probe	VDB Mittelwert [OD]	Standard- abweichung	Nachweisgrenze [ng/ml]
1	0.025	0.003	1.23

Wiederfindung

Verschiedene Proben wurden mit unterschiedlichen VDB-Spikes gemessen.

Wiederfindung $n=2$

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	VDB erwartet [ng/ml]	VDB gemessen [ng/ml]
2.2	5	7.5	7.7
2.2	10	12.2	12.7
2.2	20	22.2	25.3
6.7	2.5	9.2	8.7
6.7	7.5	14.2	13.1
6.7	15	21.7	22.5

Linearität

Zwei Proben unterschiedlicher Konzentration wurden auf Verdünnungsgerechtigkeit überprüft. Als Verdünnungsmedium wurde Verdünnungspuffer eingesetzt.

Linearität: n=2

Probe	Verdünnung	Erwartet [mg/dl]	Gemessen [mg/dl]
A	1:5000	46.2	46.2
	1:10000	23.1	23.3
	1:20000	11.5	10.4
	1:40000	5.7	5.8
	1:80000	2.8	2.7
B	1:5000	38	38
	1:10000	19	20.2
	1:20000	9.5	8.7
	1:40000	4.7	4.3
	1:80000	2.3	2.4

14. LITERATUR

1. Schmidt-Gayk H et al. (1977) The Lancet 16:105-108
2. Houghton M et al (1992) Clin Chem 38:1796-1801
3. Bouillon R et al. (1977) JCE & M 45:225-231
4. Feldmann et al. Vitamin D (1997) by Academic Press.
5. Ray R (1996) P. S. E. B. M. 212:305-312
6. Cooke N et al. (1989) Endocrine Reviews 10:294-307
7. 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. Scand J Clin Lab Invest 64: 157–166

15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Falls für die Herstellung der Testkomponenten Humanseren verwendet wurde, sind diese auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Testkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid und Thimerosal sind giftig. Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit der Haut oder der Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Alle im Test enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken oder, wenn vermerkt, zur in vitro Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Datums nicht mehr verwendet werden. Einzelkomponenten verschiedener Chargen dürfen nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die, für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik 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 zurück zu senden.

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

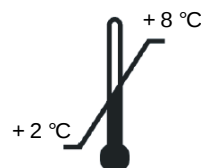
Vitamin D binding protein

*For the in vitro determination of Vitamin D binding protein in
serum, plasma and urine*

Gültig ab / Valid from 09.07.2010



K 2314



1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is intended for the quantitative determination of free, not Actin-bound, Vitamin-D binding protein in serum, plasma and urine. For *in vitro* diagnostic use only.

2. CLINICAL RELEVANCE

Vitamin D-binding protein (VDB; MW = 51 243 Da, positions 17–474, 458 amino acids, P02774 VTDB_HUMAN) or Gc-globulin is a multifunctional serum protein synthesized in the liver. It is structurally related to albumin and is similar in size. The majority of vitamin D in the blood circulates bound to the VDB. Gc-globulin has been reported to be a macrophage-stimulating factor, to possess chemotaxin activity and to have endotoxin-binding capacity. Furthermore, Gc-globulin has one actin-binding site and forms 1:1 complexes with monomeric actin. Actin is an intracellular protein that can polymerise and form filaments. The mobility and the shape of cells depends on this ability.

Upon massive cell death and tissue destruction, the release of actin may lead to a significant decrease in the components of the extracellular actin scavenger system. Decreased VDB levels were found in serum samples from several patients groups at risk of developing multi-organ failure, e.g. trauma, sepsis etc.

Indications

- Risk factor for traumatic injury
- Nephrotic syndrom

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This Enzyme Immuno Assay is a sandwich assay for VDB determination in serum, plasma and urine samples. The wells of the micro titer plate are coated with polyclonal anti-VDB antibodies. In a first incubation step, the VDB 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-VDB antibody is added. After another washing step, to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate, Tetramethylbenzidine. An acidic stopping solution is then added. The color converts to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the VDB concentration in the sample. A dose response curve of the absorbance (at 450 nm) unit vs. concentration is generated.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit Components	Quantity
K 2314MTP	PLATE	one holder with precoated strips	96
K 2314WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 2314K	CONJ	POD antibody, (rabbit-anti-VDB, Peroxidase-labeled), pre-diluted	1 x 200 µl
K 2314ST	STD	Calibrators, lyophilized (60; 20; 6,6; 2,2; 0 ng/ml)	4 x 5 vials
K 2314KO1	CTRL	Control, lyophilized	4 vials
K 2314KO2	CTRL	Control, lyophilized	4 vials
K 2314PV	SAMPLEBUF	Dilution buffer, ready to use	2 x 100 ml
K 2314TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K 2314AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Distilled water
- Bidistilled (aqua bidest.) or deionized water
- Deep freezer -20 °C
- Precision pipettors calibrated to deliver 10-1000 µl
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Vortex-Mixer
- Water bath or heating block
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc. (one time products)
- Microtiter plate reader 450 nm (reference wave length 620 or 690 nm)
- Seal cover for microtiter plates

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** 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.
- The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at 37°C in a water bath before dilution. The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) is stable **at 2-8°C** until the expiry date stated on the label. **Diluted buffer solution can be stored in a closed flask at 2-8°C for one month.**
- The lyophilized **STD** (standards) and **CTRL** (controls) must be reconstituted with **500 µl** aqua bidest. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. Reconstituted standards and controls are not stable.
- The **CONJ** (conjugate, POD-antibody) must be diluted 1:100 in wash buffer (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The undiluted **CONJ** (conjugate) is stable **at 2-8 °C** until the expiry date stated on the label. Diluted conjugate is not stable and can not be stored.
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label of kit.

7. PRECAUTIONS

- 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 thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.

- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum, plasma

Dilute all plasma and serum samples **1:40000** with **SAMPLEBUF** (sample dilution buffer). For example:

10 µl Sample + 990 µl SAMPLEBUF=1:100 (**Dilution I**)

10 µl Dilution I + 990 µl SAMPLEBUF=1:10 000 (**Dilution II**)

250 µl Dilution II + 750 µl SAMPLEBUF=1:40 000 (**Dilution III**)

For analysis, pipette **100 µl** of **Dilution III** per well.

Samples with VDB levels greater than the highest calibrator should be further diluted and re-assayed.

Urine

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

100 µl Sample + 900 µl SAMPLEBUF

Samples with VDB levels greater than the highest calibrator should be further diluted and re-assayed.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not mix different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Quality control guidelines should be observed.

- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the test results. Immundiagnostik can therefore not be held responsible for any damage.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Test procedure

Wash the precoated PLATE (microtiter plate) **5 x with 250 µl diluted wash buffer**. After the final washing step, the inverted PLATE should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.

Carry out the tests in duplicate.

1. Add **100 µl STD** (Standard), **CTRL** (Controls) and pre-diluted sample into respective well.
2. Incubate for **1 hour** shaking on a horizontal mixer at room temperature.
3. Decant the content of the PLATE and wash the wells **5 x with 250µl** diluted wash buffer.
4. Add **100 µl** diluted **CONJ** (Peroxidase-labeled antibody).
5. Incubate for **1 hour** shaking on a horizontal mixer at room temperature.
6. Decant the content of the PLATE and wash the wells **5 x with 250µl** diluted wash buffer.
7. Add **100 µl SUB** (TMB substrate).
8. Incubate for **10-20 minutes** at room temperature.
9. Add **50 µl STOP** (stop solution) and mix shortly.
10. Determine **absorption immediately** with an ELISA reader at **450 nm** against 620 nm (or 690 nm) as reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the measurement range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm (or 690 nm) as reference.

10. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend to use the "4-Parameter-algorithm".

1. 4-parameter-algorithm

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

2. Point-to-point-calculation

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

3. Spline-algorithm

We recommend a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.001).

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

Serum/plasma samples

For the calculation of the VDBP concentration in serum or plasma samples, the result must be multiplied by **40000**.

Urine samples

For the calculation of the VDBP concentration in urine samples, the result must be multiplied by **10**.

11. LIMITATIONS

Samples with VDB levels greater than the highest calibrator should be further diluted in dilution buffer and re-assayed.

12. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends commercial control samples for internal quality control.

Control samples or serum pools should be analyzed with each run of calibrators and patient samples. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. In assays in which one or more of the quality control sample values lie outside the acceptable limits, the results for the patient sample may not be valid.

Expected values

Normal range values

The levels listed should be used as a guideline only. It is recommended that each laboratory establishes an own expected range for its patient population.

Plasma or serum

20-55 mg/dl

(MW = 51 243 Da, positions 17-474, 458 amino acids, P02774 VTDB_HUMAN)

Deviations of the reference range may be present in the case of

- **pregnancy** (elevated) or 124.9 mg/dl^[2]
- **acute disorders of the liver** (decreased) 23 mg/dl^[2]

Urine

< 200 µg/l

Elevated levels may indicate a **nephritic syndrome**

Urine

0.8 - 34 mg/dl^[1]

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

The precision (intra-assay variation) of the Immundiagnostik VDB ELISA test was calculated from 16 replicate determinations on each of one samples.

Intra-Assay CV: n= 16

Sample	VDB Mean value [mg/dl]	Intra-Assay CV [%]
1	24.2	5.0
2	42.9	3.2

The total precision (inter-assay variation) of the Immundiagnostik VDB ELISA test was calculated from data on 1 sample obtained in 14 different assays by three technicians on two different lots of reagents over a period of three months.

Inter-Assay CV: n= 14

Sample	VDB Mean value [mg/dl]	Inter-Assay CV [%]
1	19.3	12.7

Sensitivity

Sensitivity: n=22

Sample	VDB Mean value [OD]	Standard variation	Detection limit [ng/ml]
1	0.025	0.003	1.23

Recovery

Two samples were spiked with VDB calibrator and measured with this assay.

Recovery n=2

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	VDB expected [ng/ml]	VDB measured [ng/ml]
2.2	5	7.5	7.7
2.2	10	12.2	12.7
2.2	20	22.2	25.3
6.7	2.5	9.2	8.7
6.7	7.5	14.2	13.1
6.7	15	21.7	22.5

Sample dilution

Two patient samples were diluted with sample dilution buffer. The results are shown below:

Linearity: n=2

Sample	Dilution	Expected [mg/dl]	Measured [mg/dl]
	1:5000	46.2	46.2
	1:10000	23.1	23.3
	1:20000	11.5	10.4
	1:40000	5.7	5.8
	1:80000	2.8	2.7
	1:5000	38	38
	1:10000	19	20.2
	1:20000	9.5	8.7
	1:40000	4.7	4.3
	1:80000	2.3	2.4

14. REFERENCES

1. Schmidt-Gayk H et al. (1977) The Lancet 16:105-108
2. Houghton M et al (1992) Clin Chem 38:1796-1801
3. Bouillon R et al. (1977) JCE & M 45:225-231
4. Feldmann et al. Vitamin D (1997) by Academic Press
5. Ray R (1996) P. S. E. B. M. 212:305-312
6. Cooke N et al. (1989) Endocrine Reviews 10:294-307
7. 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. Scand J Clin Lab Invest 64: 157–166

15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The test components which are made of human serum are tested for HVB and HIV and found to be negative. However, since no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent, these reagents should be handled as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen. The normal precautions for laboratory working should be observed.
- Reagents of the test package contain sodium azide as a bactericide. Contact with skin or mucous membranes has to be avoided.
- All reagents in the test package are to be used for in-vitro diagnostics only.
- The reagents should not be used after the date of expiry (see label on the test package).
- Single components with different lot numbers should not be mixed or exchanged.
- The guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components have been defined by the producer. Any alterations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik can therefore not be held responsible for any damage.

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number