

Osteoprotegerin ELISA Kit

Zur in-vitro-Bestimmung des OPG in Serum und Plasma

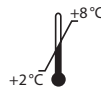
For the in vitro determination of OPG in serum and plasma

EU: IVD / CE

US: Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Gültig ab / Valid from: 07.05.2014

REF K 1011



IVD **CE**



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

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	2
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	3
6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG	4
7. TESTDURCHFÜHRUNG	4
<i>Testprinzip</i>	4
<i>Pipettierschema</i>	5
8. ERGEBNISSE	6
9. EINSCHRÄNKUNGEN	6
10. QUALITÄTSKONTROLLE	7
<i>OPG-Werte nach Kudlacek et al. 2003</i>	7
<i>Referenzwerte</i>	8
<i>Umrechnungsfaktor</i>	8
11. TESTCHARAKTERISTIKA	8
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	8
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	8
13. TECHNISCHE MERKMALE	9
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	9
15. LITERATUR	10

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von **Osteoprotegerin** (human) aus Serum, EDTA-Plasma, Heparin-Plasma oder Citrat-Plasma geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Osteoprotegerin (OPG) oder Osteoclast inhibitory factor (OCIF) ist ein Glykoprotein der TNF-Rezeptor-Superfamilie 11b (Gen Name TNFRSF11B) <http://www.uniprot.org/uniprot/O00300>. OPG wird als Monomer von 380 Aminosäuren synthetisiert, als Homodimer in der Zelle zusammengesetzt, und dann hauptsächlich als Disulfid-verknüpftes Homodimer in den extrazellulären Raum sekretiert. OPG wird von vielen verschiedenen Geweben und Zelltypen, einschließlich Osteoblasten, produziert. OPG ist ein negativer Regulator der Knochenresorption, indem es als Decoy-Rezeptor für RANKL fungiert und damit dessen Funktion in der Osteoklastogenese neutralisiert. Dieses Glykoprotein ist auch an der Regulation der Gefäßverkalkung beteiligt.

Indikationen

- Osteoporose^{1,2}
- Krankheiten mit lokal induzierter Knochenresorptionsaktivität³⁻⁶
- Arthritis^{7,8}
- Therapieüberwachung⁹⁻¹¹
- Kardiovaskuläre Krankheiten¹²⁻¹⁷

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 1011MTP	PLATE	Polyklonaler Ziege-anti-OPG-Antikörper, beschichtet auf Mikrotiterplattenstreifen im Streifenhalter. In Aluminiumverpackung mit Trockenmittel	12 x 8 Tests
K 1011WP	WASHBUF	Waschpuffer, 20-fach Konzentrat, durchsichtiger Schraubverschluss	1 x 50 ml
K 1011AB	AB	Monoklonaler Maus-anti-OPG-Antikörper, biotinyliert, grüner Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 7 ml
K 1011ST	STD	Standards 1-6 (0; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 pmol/l), weißer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	6 x 300 µl

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 1011KO	CTRL	Kontrolle, gelber Schraubverschluss, gebrauchsfertig (genaue Konzentration siehe Etikett)	1 x 300 µl
K 1011AP	ASYBUF	Verdünnungspuffer, roter Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 25 ml
K 1011K	CONJ	Konjugat (Streptavidin-HRP), braune Flasche, brauner Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
K 1011TMB	SUB	Substrat (TMB-Lösung), braune Flasche, blauer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
K 1011AC	STOP	Stopplösung, weißer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 7 ml

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Mikrotiterplattenwascher wird empfohlen, alternativ Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- 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. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:20 in Reinstwasser** verdünnt werden (50 ml Konzentrat + 950 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur

bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** (Waschpuffer) ist bei **2–8°C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8°C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

- Die Abnahme von venösem Blut sollte mittels standardisierter Blutabnahmeröhrchen zur Gewinnung von Serum oder Plasma erfolgen. Wir empfehlen, die Blutprobe so bald wie möglich für 20 Minuten bei 2000 g abzuzentrifugieren, bevorzugt bei 4°C (2 - 8°C). Falls dies nicht möglich ist, kann das Blut vor der Zentrifugation bei 4°C (2 - 8°C) bis zu 24 Stunden gelagert werden.
- Das gewonnene Serum oder Plasma sollte so schnell wie möglich gemessen werden. Für eine eventuelle Lagerung sollten die Proben aliquotiert und bei -20°C oder kälter gelagert werden. Die Proben bleiben für mindestens vier Einfrier-Auftau-Zyklen stabil. Lipämische und hämolytische Proben können falsche Ergebnisse liefern.
- Proben vor Verwendung gut mischen.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der "Sandwich"-ELISA Technik. Es werden spezifische Antikörper, die gegen OPG gerichtet sind, verwendet.

Standards, Kontrollen und verdünnte Patientenproben, die auf OPG zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem polyklonalen Ziege-anti-OPG-Antikörper beschichtet sind. In diesem ersten Inkubationsschritt wird OPG aus der Probe von dem Primärantikörper an die Mikrotiterplatte gebunden. Dann wird ein monoklonaler mit Biotin markierter Maus-anti-OPG-Antikörper zugegeben. Der nächste Schritt ist die Zugabe des Streptavidin-Peroxidase-Konjugats und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte:

1. Antikörper – OPG–biotinylierter Antikörper- – Streptavidin-Peroxidase-Konjugat

Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem OPG-Gehalt direkt proportional.

Aus den Konzentrationen der mitgeführten Standards wird eine Standardkurve erstellt, anhand der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

Pipettierschema

Vor Gebrauch alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (18–26 °C) bringen, gut mischen.

Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können in der Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Pipettieren Sie 150 µl ASYBUF (Verdünnungspuffer, roter Schraubverschluss) in alle Vertiefungen. Pipettieren Sie zusätzlich 100 µl ASYBUF in die Vertiefung für den Leerwert .
2.	Pipettieren Sie 20 µl STD / PROBE / CTRL (Standard / Probe / Kontrolle) in die Mikrotiterstreifen. Mischen.
3.	Pipettieren Sie 50 µl AB (biotinylierter anti-OPG-Antikörper, durchsichtiger Schraubverschluss) in alle Vertiefungen mit Ausnahme der des Leerwerts. Mischen.
4.	Streifen abdecken und 4 Stunden bei Raumtemperatur (18 - 26 °C) inkubieren.
5.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Waschpufferreste durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
6.	Pipettieren Sie 200 µl CONJ (Konjugat, brauner Schraubverschluss) in alle Vertiefungen.
7.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18 - 26 °C) inkubieren.
8.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Waschpufferreste durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
9.	Pipettieren Sie 200 µl SUB (Substrat, blauer Schraubverschluss) in alle Vertiefungen.
10.	30 Minuten bei Raumtemperatur (18 - 26 °C) im Dunkeln inkubieren.

11.	Pipettieren Sie 50 µl STOP (Stopplösung, weißer Schraubverschluss) in alle Vertiefungen.
12.	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.

* 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- und Plasmaproben

Die Konzentration der Proben wird direkt von der Standardkurve abgelesen.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben, deren OD höher ist als die des höchsten Standards, sollten mit STD 1 oder OPG-negativem Humanserum stärker verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden. Bei der folgenden Auswertung ist der veränderte Verdünnungsfaktor zu be-

achten.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik 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 die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

OPG-Werte nach Kudlacek et al. 2003

OPG Referenzwerte¹⁸ (n = 1134, 50.83 ± 51.47 pg/ml, median 36, 2-584;
n = 1134, 2.54 ± 2.57 pmol/L, median 1.8, 0.1-29.2)

Alter	OPG (mean ± SD)		OPG (median, Bereich)		n
	pg/ml	pmol/L	pg/ml	pmol/L	
Weibliche Personen (n = 687, 51.9 ± 51.3 pg/ml, median 39; 2.60 ± 2.57 pmol/L, median 1.95)					
< 30	44.5 ± 21.2	2.23 ± 1.06	41.7, 87.7	2.09, 4.39	48
31-40	44.1 ± 1.25	2.21 ± 1.69	36, 260	1.8, 13	198
41-50	41.2 ± 25.0	2.06 ± 33.8	36, 204	1.8, 10.2	217
51-60	39.5 ± 22.3	1.98 ± 1.12	35.5, 160	1.78, 8	150
61-70	69.6 ± 62.9	3.48 ± 3.15	60.5, 342	3.03, 17.1	34
71-80	134.0 ± 70.0	6.70 ± 3.50	131, 244	6.55, 12.2	16
> 81	227.0 ± 100.0	11.35 ± 5.00	206, 479	10.3, 23.95	24
Männliche Personen (n = 447, 50 ± 51.7 pg/ml, median 34.8; 2.5 ± 2.59 pmol/L, median 1.74)					
< 30	40.7 ± 26.3	2.04 ± 1.32	32, 96	1.6, 4.8	19
31-40	41.4 ± 30.5	2.07 ± 1.53	33.5, 170	1.68, 8.5	72
41-50	36.3 ± 31.8	1.82 ± 1.59	36.2, 316	1.81, 15.8	116
51-60	36.9 ± 20.2	1.85 ± 1.01	34, 134	1.7, 6.7	176
61-70	41.0 ± 22.7	2.05 ± 1.14	29.8, 160	1.49, 8	32
71-80	119.0 ± 71.0	5.95 ± 3.55	38, 103	1.9, 5.15	12
> 81	226.0 ± 78.0	11.30 ± 3.90	130, 219	6.5, 10.95	20

Referenzwerte

Anhand einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich Gesunden (n = 60) wurde ein Median von 2,7 pmol/l ermittelt.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

Umrechnungsfaktor

1 pg/ml = 0.05 pmol/l

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 5)

Probe	Durchschnitt [pmol/l]	Vk [%]	Standardabweichung SD
1	3,2	2	0,05
2	10,1	3	0,34

Inter-Assay (n = 12)

Probe	Durchschnitt [pmol/l]	Vk [%]	Standardabweichung SD
1	3,2	3	0,10
2	9,9	5	0,50

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate

für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

- 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.

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 Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den 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 im Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und 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

1. Szulc, P. et al., 2011. Cortical bone status is associated with serum osteoprotegerin concentration in men: the STRAMBO study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **96**(7), pp.2216–26.
2. Samelson, E.J. et al., 2008. Increased plasma osteoprotegerin concentrations are associated with indices of bone strength of the hip. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **93**(5), pp.1789–95.
3. Terpos, E. et al., 2009. The clinical significance of serum markers of bone turnover in NSCLC patients: surveillance, management and prognostic implications. *Anti-cancer research*, **29**(5), pp.1651–7.
4. Madarász, E. et al., 2009. Osteoprotegerin levels in women with prior gestational diabetes mellitus. *Diabetes care*, **32**(1), p.e5.
5. Kearns, A.E., Khosla, S. & Kostenuik, P.J., 2008. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocrine reviews*, **29**(2), pp.155–92.
6. Pepene, C.E. et al., 2011. Circulating osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor κ B ligand in polycystic ovary syndrome: relationships to insulin resistance and endothelial dysfunction. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, **164**(1), pp.61–8.
7. Van Tuyl, L.H.D. et al., 2010. Baseline RANKL:OPG ratio and markers of bone and cartilage degradation predict annual radiological progression over 11 years in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, **69**(9), pp.1623–8.
8. Anastasilakis, A.D. et al., 2008. Acute changes in serum osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor-kappaB ligand levels in women with established osteoporosis treated with teriparatide. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, **158**(3), pp.411–5.
9. Faienza, M.F. et al., 2009. Osteoclastogenesis in children with 21-hydroxylase deficiency on long-term glucocorticoid therapy: the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand/osteoprotegerin imbalance. *The Journal of clinical*

- endocrinology and metabolism*, **94**(7), pp.2269–76.
10. Park, J.S. et al., 2011. Effect of pioglitazone on serum concentrations of osteoprotegerin in patients with type 2 diabetes mellitus. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, **164**(1), pp.69–74.
 11. Nybo, M. et al., 2011. Rosiglitazone decreases plasma levels of osteoprotegerin in a randomized clinical trial with type 2 diabetes patients. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, **109**(6), pp.481–5.
 12. Semb, A.G. et al., 2009. Osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and risk for coronary events: a nested case-control approach in the prospective EPIC-Norfolk population study 1993-2003. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **29**(6), pp.975–80.
 13. Svensson, M. et al., 2012. Osteoprotegerin as a predictor of renal and cardiovascular outcomes in renal transplant recipients: follow-up data from the ALERT study. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, **27**(6), pp.2571–5.
 14. Stavroulopoulos, A. et al., 2011. Evolution of coronary artery calcification in patients with chronic kidney disease Stages 3 and 4, with and without diabetes. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, **26**(8), pp.2582–9.
 15. Lieb, W. et al., 2010. Biomarkers of the osteoprotegerin pathway: clinical correlates, subclinical disease, incident cardiovascular disease, and mortality. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **30**(9), pp.1849–54.
 16. Ueland, T. et al., 2011. Osteoprotegerin predicts progression of chronic heart failure: results from CORONA. *Circulation. Heart failure*, **4**(2), pp.145–52.
 17. Jiang, J.-Q. et al., 2011. Serum osteoprotegerin measurement for early diagnosis of chronic kidney disease-mineral and bone disorder. *Nephrology (Carlton, Vic.)*, **16**(6), pp.588–94.
 18. Kudlacek, S. et al., 2003. Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population. *Bone*, **32**(6), pp.681–6.

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Osteoprotegerin ELISA Kit

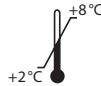
For the in vitro determination of OPG in serum and plasma

EU: IVD / CE

US: Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Gültig ab / Valid from: 07.05.2014

REF K 1011



IVD **CE**



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

Table of Contents

1. INTENDED USE	15
2. INTRODUCTION	15
3. MATERIAL SUPPLIED	15
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	16
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	17
7. ASSAY PROCEDURE	17
<i>Principle of the test</i>	17
<i>Test procedure</i>	17
8. RESULTS	18
9. LIMITATIONS	19
10. QUALITY CONTROL	19
<i>Reference range</i>	19
<i>Conversion factor</i>	19
<i>OPG-Werte from Kudlacek et al. 2003</i>	20
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	20
<i>Precision and reproducibility</i>	20
12. PRECAUTIONS	21
13. TECHNICAL HINTS	21
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	22
15. REFERENCES	22

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is a sandwich ELISA intended for the quantitative determination of osteoprotegerin in serum, EDTA plasma, heparin plasma or citrate plasma. It is for *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Osteoprotegerin (OPG) or osteoclast inhibitory factor (OCIF) is a glycoprotein of the TNF receptor superfamily 11b (gene name TNFRSF11B) <http://www.uniprot.org/uniprot/O00300>. OPG is synthesized as a monomer of 380 amino acids and is assembled as a homodimer within the cell, and then secreted mainly as a disulfide-linked homodimer into the extracellular compartment. OPG is produced by many different tissues and cell types including osteoblasts. OPG is a negative regulator of bone resorption by acting as decoy receptor for RANKL, thus neutralizing its function in osteoclastogenesis. This glycoprotein is also involved in the regulation of vascular calcification.

Indications

- Osteoporosis ^{1,2}
- Diseases with locally incr. resorption activity ³⁻⁶
- Arthritis ^{7,8}
- Therapy monitoring ⁹⁻¹¹
- Cardiovascular Disease ¹²⁻¹⁷

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 1011MTP	PLATE	Goat polyclonal anti OPG antibody, pre-coated microtiter strips in a strip-holder, packed in an aluminium bag with desiccant	12 x 8 wells
K 1011WP	WASHBUF	Wash buffer concentrate 20x, natural cap	1 x 50 ml
K 1011K	CONJ	Conjugate, (streptavidin-HRP), amber bottle, amber cap, ready to use	1 x 22 ml
K 1011ST	STD	Standards 1-6, (0; 1.25; 2.5; 5; 10; 20 pmol/l), white caps, ready to use	6 x 300 µl
K 1011KO	CTRL	Control, yellow cap, ready to use, (exact concentration on the label)	300 µl

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 1011AB	AB	Mouse monoclonal anti OPG antibody, biotin labelled, green cap, yellow dye, ready to use	1 x 7 ml
K 1011AP	ASYBUF	Assay Buffer, red cap, ready to use	1 x 25 ml
K 1011TMB	SUB	Substrate (TMB solution), amber bottle blue cap, ready to use	1 x 22 ml
K 1011AC	STOP	Stop solution, white cap, ready to use	1 x 7 ml

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Laboratory balance
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Plate washer is recommended for washing, alternatively multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 g
- Vortex
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure 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 MΩcm).

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted **1:20 in ultra pure water** before use (50 ml concentrate + 950 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or 37 °C before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted buffer solution** (wash buffer) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for one month**.
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

- Collect venous blood samples by using standardized blood collection tubes for serum or plasma. We recommend performing plasma or serum separation by centrifugation as soon as possible (e.g. 20 min at 2000 *g*, preferably at 4 °C (2–8 °C). If this is not possible, store the samples at 4 °C (2–8 °C) prior to centrifugation (up to one day).
- The acquired plasma or serum samples should be measured as soon as possible. For longer storage aliquot samples and store at -20 °C or lower. Samples are at least stable for 4 freeze-thaw cycles. Lipemic or haemolysed samples may give erroneous results.
- Samples should be mixed well before assaying.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

The assay utilizes the “sandwich” technique with specific antibodies against OPG. Standards, controls and diluted samples which are assayed for OPG are added into the wells of a micro plate coated with polyclonal goat-anti-OPG-antibody. During the first incubation step, OPG is bound by the immobilized primary antibody. Then a biotinylated monoclonal mouse-anti-OPG-antibody, is added into each microtiter well. In the next step, the streptavidin-peroxidase-conjugate is added and a “sandwich” of 1st antibody – OPG - biotinylated antibody – streptavidin-peroxidase-conjugate is formed. Tetramethylbenzidine is used as peroxidase substrate. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The colour changes from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of OPG. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. standard concentration is generated, using the values obtained from the standard.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15–30 °C) and mix well.

Take as many **microtiter strips** as needed from kit. Store unused strips in the aluminium bag with desiccant at 2–8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Pipet 150 µl ASYBUF (assay buffer, red cap) into each well. Add further 100 µl ASYBUF in the well for the BLANK .
	Add 20 µl STD / SAMPLE / CTRL (standard / sample / control) into respective wells.
	Add 50 µl AB (biotinylated anti OPG antibody, natural cap) into each well, except BLANK , mix gently.
	Cover tightly and incubate for 4h at room temperature (18 - 26 °C).
	Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted wash buffer . After final wash, remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel.
	Add 200 µl CONJ (conjugate, amber cap) into each well.
	Cover tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18 - 26 °C).
	Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted Wash buffer. After final wash, remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel.
	Add 200 µl SUB (substrate, blue cap) into each well.
	Incubate for 30 min* at room temperature (18 - 26 °C) in the dark .
	Add 50 µl STOP (stop solution, white cap) into each well.
12.	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.

* The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend observing the color 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 logarithm-

mic 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.

9. LIMITATIONS

Samples with an OD higher than the OD of the highest standard should be further diluted with STD 1 or OPG negative human serum and re-assayed. For the following analysis, the changed dilution factor has to be taken into consideration.

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik 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

Based on a laboratory intern study of samples of apparently healthy persons (n = 60), a median of 2,7 pmol/ml was estimated.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

Conversion factor

1 pg/ml = 0.05 pmol/l

OPG-Werte from Kudlacek et al. 2003

OPG reference data⁸ (n = 1134, 50.83 ± 51.47 pg/ml, median 36, 2-584;
n = 1134, 2.54 ± 2.57 pmol/L, median 1.8, 0.1-29.2)

Alter	OPG (mean ± SD)		OPG (median, Bereich)		n
	pg/ml	pmol/L	pg/ml	pmol/L	
Female population (n = 687, 51.9 ± 51.3 pg/ml, median 39; 2.60 ± 2.57 pmol/L, median 1.95)					
< 30	44.5 ± 21.2	2.23 ± 1.06	41.7, 87.7	2.09, 4.39	48
31-40	44.1 ± 1.25	2.21 ± 1.69	36, 260	1.8, 13	198
41-50	41.2 ± 25.0	2.06 ± 33.8	36, 204	1.8, 10.2	217
51-60	39.5 ± 22.3	1.98 ± 1.12	35.5, 160	1.78, 8	150
61-70	69.6 ± 62.9	3.48 ± 3.15	60.5, 342	3.03, 17.1	34
71-80	134.0 ± 70.0	6.70 ± 3.50	131, 244	6.55, 12.2	16
> 81	227.0 ± 100.0	11.35 ± 5.00	206, 479	10.3, 23.95	24
Male Population (n = 447, 50 ± 51.7 pg/ml, median 34.8; 2.5 ± 2.59 pmol/L, median 1.74)					
< 30	40.7 ± 26.3	2.04 ± 1.32	32, 96	1.6, 4.8	19
31-40	41.4 ± 30.5	2.07 ± 1.53	33.5, 170	1.68, 8.5	72
41-50	36.3 ± 31.8	1.82 ± 1.59	36.2, 316	1.81, 15.8	116
51-60	36.9 ± 20.2	1.85 ± 1.01	34, 134	1.7, 6.7	176
61-70	41.0 ± 22.7	2.05 ± 1.14	29.8, 160	1.49, 8	32
71-80	119.0 ± 71.0	5.95 ± 3.55	38, 103	1.9, 5.15	12
> 81	226.0 ± 78.0	11.30 ± 3.90	130, 219	6.5, 10.95	20

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS*Precision and reproducibility***Intra-Assay (n = 5)**

Sample	Mean [pmol/l]	CV [%]	Standard deviation
1	3.2	2	0.05
2	10.1	3	0.34

Inter-Assay (n = 12)

Sample	Mean [pmol/l]	CV [%]	Standard deviation
1	3.2	3	0.10
2	9.9	5	0.50

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or Proclin as bactericides. Sodium azide and Proclin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analyzed 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 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

1. Szulc, P. et al., 2011. Cortical bone status is associated with serum osteoprotegerin concentration in men: the STRAMBO study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **96**(7), pp.2216–26.
2. Samelson, E.J. et al., 2008. Increased plasma osteoprotegerin concentrations are associated with indices of bone strength of the hip. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **93**(5), pp.1789–95.
3. Terpos, E. et al., 2009. The clinical significance of serum markers of bone turnover in NSCLC patients: surveillance, management and prognostic implications. *Anti-cancer research*, **29**(5), pp.1651–7.
4. Madarász, E. et al., 2009. Osteoprotegerin levels in women with prior gestational diabetes mellitus. *Diabetes care*, **32**(1), p.e5.
5. Kearns, A.E., Khosla, S. & Kostenuik, P.J., 2008. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocrine reviews*, **29**(2), pp.155–92.
6. Pepene, C.E. et al., 2011. Circulating osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor kB ligand in polycystic ovary syndrome: relationships to insulin resistance and endothelial dysfunction. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, **164**(1), pp.61–8.
7. Van Tuyl, L.H.D. et al., 2010. Baseline RANKL:OPG ratio and markers of bone and cartilage degradation predict annual radiological progression over 11 years in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, **69**(9), pp.1623–8.

8. Anastasilakis, A.D. et al., 2008. Acute changes in serum osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor-kappaB ligand levels in women with established osteoporosis treated with teriparatide. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, **158**(3), pp.411–5.
9. Faienza, M.F. et al., 2009. Osteoclastogenesis in children with 21-hydroxylase deficiency on long-term glucocorticoid therapy: the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand/osteoprotegerin imbalance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **94**(7), pp.2269–76.
10. Park, J.S. et al., 2011. Effect of pioglitazone on serum concentrations of osteoprotegerin in patients with type 2 diabetes mellitus. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, **164**(1), pp.69–74.
11. Nybo, M. et al., 2011. Rosiglitazone decreases plasma levels of osteoprotegerin in a randomized clinical trial with type 2 diabetes patients. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, **109**(6), pp.481–5.
12. Semb, A.G. et al., 2009. Osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and risk for coronary events: a nested case-control approach in the prospective EPIC-Norfolk population study 1993-2003. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **29**(6), pp.975–80.
13. Svensson, M. et al., 2012. Osteoprotegerin as a predictor of renal and cardiovascular outcomes in renal transplant recipients: follow-up data from the ALERT study. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, **27**(6), pp.2571–5.
14. Stavroulopoulos, A. et al., 2011. Evolution of coronary artery calcification in patients with chronic kidney disease Stages 3 and 4, with and without diabetes. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, **26**(8), pp.2582–9.
15. Lieb, W. et al., 2010. Biomarkers of the osteoprotegerin pathway: clinical correlates, subclinical disease, incident cardiovascular disease, and mortality. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **30**(9), pp.1849–54.
16. Ueland, T. et al., 2011. Osteoprotegerin predicts progression of chronic heart failure: results from CORONA. *Circulation. Heart failure*, **4**(2), pp.145–52.
17. Jiang, J.-Q. et al., 2011. Serum osteoprotegerin measurement for early diagnosis of chronic kidney disease-mineral and bone disorder. *Nephrology (Carlton, Vic.)*, **16**(6), pp.588–94.
18. Kudlacek, S. et al., 2003. Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population. *Bone*, **32**(6), pp.681–6.

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number