

OSTEOPROTEGERIN

(EN) ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF
OSTEOPROTEGERIN IN SERUM, EDTA PLASMA, HEPARIN PLASMA OR CITRATE
PLASMA

CAT. NO. BI-20403 . 12 X 8 TESTS

(DE) ENZYM IMMUNOASSAY ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON
OSTEOPROTEGERIN IN SERUM, EDTA PLASMA, HEPARIN PLASMA ODER CITRAT
PLASMA

KAT. NR. BI-20403 . 12 X 8 TESTE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES

rev.no. 230321 (replacing 220524)

This kit was developed and manufactured by:
Biomedica Medizinprodukte GmbH, A-1210 Wien, Divischgasse 4
Tel. +43/1/291 07 45, Fax +43/1/291 07 6389, E-mail info@bmgrp.com



CONTENT / INHALT

ENGLISH	Page 3
DEUTSCH	Seite 8

Additional information on our products is available on our website.
Zusätzliche Information zu unseren Produkten ist auf unserer Homepage erhältlich.

www.bmgrp.com

1) 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.

Areas of interest:

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

2) CONTENT OF THE KIT

CONT	KIT COMPONENTS	QUANTITY
PLATE	Goat polyclonal anti OPG antibody, pre-coated microtiter strips in a stripholder, packed in an aluminium bag with desiccant	12 x 8 tests
WASHBUF	Wash buffer concentrate 20x, natural cap	1 x 50 ml
AB	Mouse monoclonal anti OPG antibody, biotin labelled, green cap, yellow dye, ready to use	1 x 7 ml
STD	Standards 1-6, (0; 1.25; 2.5; 5; 10; 20 pmol/l), white caps, ready to use	6 x 300 µl
CTRL	Controls A and B, yellow caps, ready to use, (exact concentration on the label)	2 x 300 µl
ASYBUF	Assay Buffer, red cap, ready to use	1 x 25 ml
CONJ	Conjugate, (streptavidin-HRPO), amber bottle, amber cap, ready to use	1 x 22 ml
SUB	Substrate (TMB solution), amber bottle, blue cap, ready to use	1 x 22 ml
STOP	Stop solution, white cap, ready to use	1 x 7 ml

3) ADDITIONAL MATERIAL IN THE KIT

- 2 self-adhesive plastic films
- Quality control protocol
- Protocol sheet
- Instruction for use

4) MATERIAL AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Precision pipettes calibrated to deliver 20 µl, 50 µl, 150 µl, 200 µl, 300 µl and disposable tips
- Distilled or deionised water
- Plate washer is recommended for washing, alternative multichannel pipette or manifold dispenser
- Refrigerator with 4°C (2-8°C)
- ELISA reader capable of measuring absorbance at 450 nm (with correction wavelength at 630 nm)
- Graph paper or software for calculation of results

5) REAGENTS AND SAMPLE PREPARATION

All reagents of the kit are stable at 4°C (2-8°C) until expiry date stated on the label of each reagent.

Sample preparation:

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 x 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 -25°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. Samples with values above highest STD can be diluted with STD1 or OPG negative human serum.

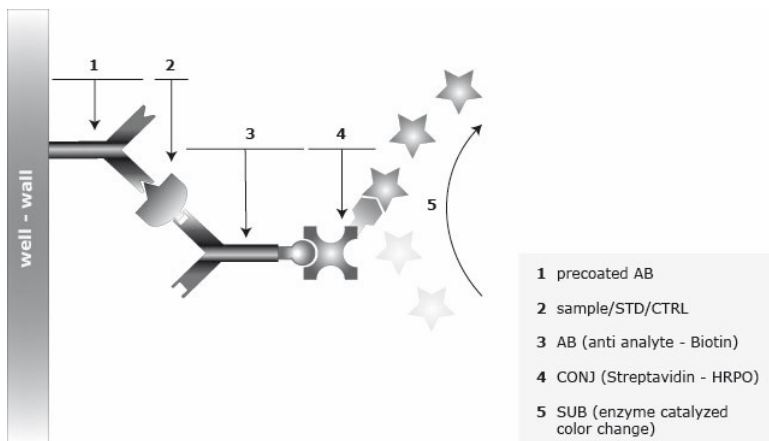
For further information on sample stability please visit our website www.bmgrp.com (see Validation Data) or contact our customer service by e-mail info@bmgrp.com or by phone +43/ 1/ 29107-45.

Reconstitution/Handling:

WASHBUF (Wash buffer): Salt precipitate in the concentrated wash buffer is normal. Dissolve any precipitate by mixing gently at room temperature then dilute the concentrate 1:20 with distilled/DI water, e.g. 50 ml WASHBUF + 950 ml distilled water, prior to using in the assay. Undiluted wash buffer is stable at 4°C (2-8°C) until expiry date on the label. Diluted wash buffer is stable at 4°C (2-8°C) for one month. Only use diluted WASHBUF (Wash buffer) for optimum assay performance.

6) PRINCIPLE OF THE ASSAY

This kit is a sandwich enzyme immunoassay for the determination of OPG in human serum and plasma samples. In a first step, assay buffer, STD/sample/CTRL, and detection antibody (mouse monoclonal anti human OPG-Biotin) are pipetted into the wells of the microtiter strips, which are pre-coated with goat polyclonal anti OPG antibody. OPG present in the STD/sample/CTRL binds to the pre-coated antibody in the well and forms a sandwich with the detection antibody. In the washing step all non-specific unbound material is removed. In a second step, the conjugate (Streptavidin-HRPO) is pipetted into the wells and reacts with the detection antibody. After another washing step, the substrate (TMB Tetramethylbenzidine) is pipetted into the wells. The enzyme catalysed colour change of the substrate is directly proportional to the amount of OPG. This colour change is detectable with a standard microtiter plate ELISA reader. A dose response curve of the absorbance (optical density, OD at 450 nm) vs. standard concentration is generated, using the values obtained from the standard. The concentration of OPG in the sample is determined directly from the dose response curve.



7) ASSAY PROTOCOL

All reagents and samples must be at room temperature (18-24°C) before use in the assay.

Mark position for STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) on the protocol sheet.

Take microtiter strips out of the aluminium bag. Store unused strips with desiccant at 4°C (2-8°C) in the aluminium bag. Strips are stable until expiry date stated on the label.

1) Pipette 150 µl ASYBUF (Assay Buffer, red cap) into each well.

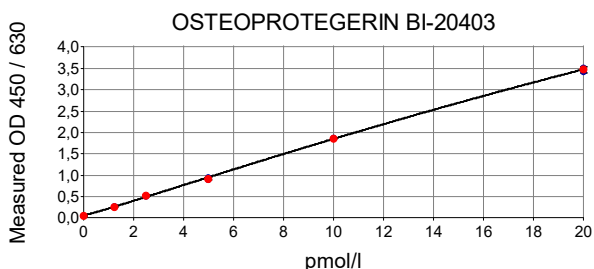
2) Add 20 µl STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) in duplicate into respective wells, swirl gently.

- 3) Add 50 µl AB (biotinylated anti OPG antibody, green cap) into each well, swirl gently.
- 4) **Cover tightly and incubate for 4 hours at room temperature (18-24°C).**
- 5) Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer). After final wash, remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel.
- 6) Add 200 µl CONJ (Conjugate, amber cap) into each well.
- 7) **Cover tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-24°C).**
- 8) Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer). After final wash, remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel.
- 9) Add 200 µl SUB (Substrate, blue cap) into each well.
- 10) **Incubate for 30 min at room temperature (18-24°C) in the dark.**
- 11) Add 50 µl STOP (Stop solution, white cap) into each well, swirl gently.
- 12) Measure absorbance immediately at 450 nm with reference 630 nm, if available.

8) CALCULATION OF RESULTS

Read the optical density (OD) of all wells on a plate reader using 450 nm wavelength (correction wavelength 630 nm). Construct the standard curve from the OD values of the STD. Use commercially available software or graph paper. Obtain sample concentration from this standard curve. The assay was evaluated with 4PL algorithm. Different curve fitting methods need to be evaluated by the user. Respective dilution factors have to be considered.

Example typical STD-curve:



The quality control (QC) protocol supplied with the kit shows the results of the final release QC for each kit at production date. Data for OD obtained by customers may differ due to various influences and/or due to the normal decrease of signal intensity during shelf life. However, this does not affect validity of results as long as an OD of 1.50 or more is obtained for the STD6 (standard with highest concentration) and the value of the CTRLs are in range (target ranges see labels).

9) ASSAY CHARACTERISTICS

Method:	Sandwich ELISA, HRP/TMB, 12x8-well strips
Sample type:	Serum, EDTA plasma, heparin plasma, and citrate plasma
Standard range:	0 to 20 pmol/l (6 standards and 2 controls in a human serum matrix)
Conversion factor:	1 pg/ml = 0.05 pmol/l (MW: 19.9 kd)
Sample volume:	20 µl / well
Incubation time:	4 h / 1 h / 30 min
Sensitivity:	LOD: (0 pmol/l + 3 SD): 0.07 pmol/l; LLOQ: 0.08 pmol/l
Specificity:	The ELISA recognizes human endogenous and recombinant OPG. The OPG ELISA detects monomeric and dimeric OPG as well as OPG-

	RANKL complexes. The assay does not cross-react with rat or mouse samples.	
Precision:	Intra-assay (n=5) ≤ 3%, Inter-assay (n=12) ≤ 5%	
Spike/Recovery (average recovery spiked with rec. OPG):	Serum (n=3): 98%	Heparin plasma (n=3): 89%
	EDTA plasma (n=3): 100%	Citrate plasma (n=3): 95%
Dilution linearity (average recovery of expected OPG after a 1+1; 1+3; 1+7 dilution):	Dilution:	Serum (n=3)
	1 + 1	98%
	1 + 3	90%
	1 + 7	87%
Values from apparently healthy individuals:	Median serum (n=60): 2.7 pmol/l Median EDTA plasma (n=6): 2.2 pmol/l Median heparin plasma (n=7): 2.3 pmol/l Median citrate plasma (n=5): 2.3 pmol/l Each laboratory should establish its own reference range for the samples under investigation. Do not change sample type during the study.	

For further information on assay characteristics please visit our website www.bmgrp.com (see Validation Data) or contact our customer service by e-mail info@bmgrp.com or by phone +43/ 1/ 29107-45.

10) PRECISION

Intra-assay: 2 samples of known concentrations were tested 5 times.

Inter-assay: 2 samples of known concentrations were tested 12 times in 2 different kit lots by 3 different operators.

Intra-assay (n=5)	Sample 1	Sample 2	Inter-assay (n=12)	Sample 1	Sample 2
Mean (pmol/l)	3.2	10.1	Mean (pmol/l)	3.2	9.9
SD (pmol/l)	0.05	0.34	SD (pmol/l)	0.10	0.50
CV (%)	2	3	CV (%)	3	5

11) TECHNICAL HINTS

- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- Do not mix stoppers and caps from different reagents or use reagents between lots.
- Do not use reagents beyond expiration date.
- Protect reagents from direct sunlight.
- Substrate solution should remain colourless until added to the plate.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.

12) PRECAUTIONS

All test components of human source were tested against HIV-Ab, HCV-Ab and HBsAg; and were found negative. Nevertheless, they should be handled and disposed as if they were infectious. Liquid reagents contain ≤0.1% Proclin 950 as preservative. Avoid contact with skin and mucous membrane. Proclin 950 is not toxic in concentrations used in this kit. It may cause allergic skin reactions – avoid contact with skin or eyes.

- Do not pipette by mouth.
- Do not eat, drink, smoke, or apply cosmetics where reagents are used.
- Wear gloves, glasses, and lab jacket while performing this assay.
- Sulfuric acid is irritating to eyes and skin. Avoid contact with skin and mucous. Irritations are possible - Flush with water if contact occurs!

13) LITERATURE

1. Szulc P et al.: Cortical Bone Status Is Associated with Serum Osteoprotegerin Concentration in Men: The STRAMBO Study. *J Clin Endocrinol Metab* (2011), 96: 2216-2226.
2. Samelson EJ et al.: Increased Plasma Osteoprotegerin Concentrations are Associated with Indices of Bone Strength of the Hip. *J Clin Endocrinol Metab* (2008), 93: 1789-1795.
3. Terpos E et al.: The Clinical Significance of Serum Markers of Bone Turnover in NSCLC Patients: Surveillance, Management and Prognostic Implications. *Anticancer Res* (2009), 29: 1651-1657.
4. Madarász E et al.: Osteoprotegerin Levels in Women With Prior Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* (2009), 32: e5.
5. Kearns AE et al.: Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand and Osteoprotegerin Regulation of Bone Remodeling in Health and Disease. *Endocr Rev* (2008), 29: 155-192.
6. Pepene C et al.: Circulating osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor B ligand in polycystic ovary syndrome: relationships to insulin resistance and endothelial dysfunction. *Eur J Endocrinol* (2011), 164: 61-68.
7. Tuyl van L.: Baseline RANKL:OPG ratio and markers of bone and cartilage degradation predict annual radiological progression over 11 years in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* (2010), 69: 1623-1628.
8. Anastasilakis AD et al.: Evaluation of Bone Mineral Density, Bone Metabolism, Osteoprotegerin and Receptor Activator of the NF κ B Ligand Serum Levels During Treatment with Infliximab in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Eur J Endocrinol* (2008), 158: 411-415.
9. Faienza F et al.: Osteoclastogenesis in Children with 21-Hydroxylase Deficiency on Long-Term Glucocorticoid Therapy: The Role of Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand/Osteoprotegerin Imbalance. *J Clin Endocrinol Metab* (2009), 94: 2269-2276.
10. Park JS et al.: Effect of pioglitazone on serum concentrations of osteoprotegerin in patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* (2011), 164: 69-74.
11. Nybo M et al.: Rosiglitazone decreases plasma levels of osteoprotegerin in a randomized clinical trial with type 2 diabetes patients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* (2011), 109(6): 481-485.
12. Semb A et al.: Osteoprotegerin and Soluble Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand and Risk for Coronary Events. A Nested Case-Control Approach in the Prospective EPIC-Norfolk Population Study. 1993-2003. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2009), 29: 975-980.
13. Svensson M et al.: Osteoprotegerin as a predictor of renal and cardiovascular outcomes in renal transplant recipients: follow-up data from the ALERT study. *Nephrol Dial Transplant* (2011), 10.1093/ndt/gfr694.
14. Stavroulopoulos A et al.: Evolution of coronary artery calcification in patients with chronic kidney disease Stages 3 and 4, with and without diabetes. *Nephrol Dial Transplant* (2011), 26: 2582-2589.
15. Lieb W et al.: Biomarkers of the Osteoprotegerin Pathway: Clinical Correlates, Subclinical Disease, Incident Cardiovascular Disease, and Mortality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2010): 30: 1849-1854.
16. Ueland T et al.: Osteoprotegerin Predicts Progression of Chronic Heart Failure: Results From CORONA. *Circ Heart Fail* (2011): 4: 145-152.
17. Jiang JQ et al.: Serum osteoprotegerin measurement for early diagnosis of chronic kidney disease-mineral and bone disorder. *Nephrology* (2011), 16(6): 588-594.

1) 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 und 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 seine Funktion in der Osteoklastogenese neutralisiert. Dieses Glykoprotein ist auch an der Regulation der Gefäßverkalkung beteiligt.

Interessensgebiete:

- Osteoporose (1, 2)
- Krankheiten mit lokal induzierter Knochenresorptionsaktivität (3-6)
- Arthritis (7, 8)
- Therapieüberwachung (9, 10, 11)
- Kardiovaskuläre Krankheiten (12-17)

2) INHALT DES KITS

CONT	KIT KOMPONENTEN	MENGE
PLATE	polyklonaler Ziege anti OPG Antikörper, beschichtet auf Mikrotiterplattenstreifen im Streifenhalter. Verpackt im Aluminium Beutel mit Trockenmittel	12 x 8 Tests
WASHBUF	Waschpuffer, 20fach Konzentrat, durchsichtiger Schraubverschluss	1 x 50 ml
AB	Monoklonaler Maus anti OPG Antikörper - biotinyliert, grüner Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 7 ml
STD	Standards 1-6, (0; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 pmol/l), weißer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	6 x 300 µl
CTRL	Kontrollen A und B, gelber Schraubverschluss, gebrauchsfertig (genaue Konzentration siehe Etikett)	2 x 300 µl
ASYBUF	Verdünnungspuffer, roter Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 25 ml
CONJ	Konjugat (Streptavidin- HRPO), braune Flasche, brauner Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
SUB	Substrat (TMB Lösung), braune Flasche, blauer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
STOP	Stopp Lösung, weißer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 7 ml

3) ZUSÄTZLICHES MATERIAL IM KIT

- 2 selbstklebende Abdeckfolien
- QC Protokoll
- Protokoll Blatt
- Arbeitsanleitung (Beipacktext)

4) ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL UND GERÄTE

- Kalibrierte Präzisionspipetten für 20 µl, 50 µl, 150 µl, 200 µl, 300 µl inkl. Pipettenspitzen
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Mikrotiterplatten Wascher wird empfohlen, Alternativen: Mehrkanalpipetten oder Dispenser
- Kühlschrank mit 4°C (2-8°C)
- Mikrotiterplattenphotometer mit 450 nm Filter (630 nm Referenz)
- Millimeterpapier oder Software

5) REAGENZIEN UND PROBENVORBEREITUNG

Alle Reagenzien des Kits sind bei 4°C (2-8°C) bis zum Ablaufdatum (siehe Etikett des Reagenz) stabil.

Probenvorbereitung:

Abnahme von venösem Blut mittels standardisierter Blutabnahmeröhrchen zur Gewinnung von Serum oder Plasma. Wir empfehlen die Zentrifugation des Blutes für 20 Minuten bei 2000g, bevorzugt bei 4°C (2-8°C), so schnell wie möglich. Das Blut kann vor der Zentrifugation bei 4°C (2-8°C) bis zu 24 Stunden gelagert werden. Das gewonnene Serum oder Plasma soll so schnell wie möglich gemessen werden. Für eine eventuelle Lagerung sollen die Proben aliquotiert und bei -25°C oder tiefer gelagert werden. Bis zu vier Frier-Tau-Zyklen verändern die Messwerte nicht. Lipämische und hämolytische Proben können falsche Ergebnisse liefern. Proben vor Verwendung gut mischen. Proben mit Werten über dem höchsten STD (STD6) können mit STD1 oder OPG negativem human Serum verdünnt werden.

Nähere Informationen zur Probenstabilität finden Sie auf unserer Website www.bmgrp.com (s. Validation Data) oder kontaktieren Sie unseren Kundenservice, Email unter info@bmgrp.com, Tel. unter +43/ 1/ 29107-45.

Rekonstitution/Handhabung:

WASHBUF (Waschpuffer): Salzkristalle im Pufferkonzentrat sind normal. Lösen Sie die Salzkristalle bei Raumtemperatur auf und verdünnen Sie das Pufferkonzentrat mit destilliertem oder deionisiertem Wasser 1:20 (zB. 50 ml WASHBUF + 950 ml destilliertes Wasser). Unverdünnter Waschpuffer ist bei 4°C (2-8°C) bis zum Ablaufdatum (s. Etikett) haltbar. Der verdünnte Waschpuffer ist bei 4°C (2-8°C) bis zu einem Monat haltbar. Im Testsystem darf nur verdünnter WASHBUF (Waschpuffer) verwendet werden.

6) TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der Methode eines Sandwich ELISA und dient zur quantitativen Bestimmung von OPG in humanen Serum und Plasmaproben.

Zuerst werden Assaypuffer, STD/Probe/CTRL und Detektionsantikörper (monoklonaler Maus-anti-human-OPG-Biotin) in die entsprechenden Vertiefungen, welche mit polyklonalem Ziege-anti-human-OPG-Antikörper beschichtet sind, pipettiert. Das in den STD/Proben/CTRL vorhandene OPG bildet mit beiden Antikörpern einen stabilen Komplex. Durch Waschen werden die unspezifischen und nicht gebundenen Anteile entfernt. Nach Zugabe von Konjugat (Streptavidin-HRP), das mit dem Detektionsantikörper reagiert, und einem weiteren Waschschritt, wird mit Substrat (TMB Tetramethylbenzidine) inkubiert. Die dadurch enzymatisch bedingte Farbentwicklung ist direkt proportional mit der OPG Konzentration in den Proben und kann mittels eines Mikrotiterplatten ELISA Reader gemessen werden. Aus dem jeweiligen Farbsignal und den Konzentrationen der STD wird eine Kalibrationskurve erstellt, von der die OPG Konzentration der Proben direkt ablesbar ist.

Grafik siehe Kapitel 6) *PRINCIPLE OF THE ASSAY* im englischen Teil des Beipacktextes.

7) TESTPROTOKOLL

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-24°C) aufweisen.

Markieren Sie die Positionen für STD/PROBE/CTRL (Standard/Probe/Kontrolle) am Protokoll Blatt.

Nehmen Sie die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Aluminium Beutel. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können mit Trockenmittel im Aluminium Beutel auf 4°C (2-8°C) bis zum angegebenen Ablaufdatum gelagert werden.

1) Pipettieren Sie 150 µl ASYBUF (Verdünnungspuffer, roter Schraubverschluss) in alle Wells.
2) Pipettieren Sie 20 µl STD /PROBE/CTRL (Standard/Probe/Kontrolle) in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen, gut mischen.
3) Pipettieren Sie 50 µl AB (biotinylierter anti OPG Antikörper, grüner Schraubverschluss) in alle Wells, gut mischen.
4) Streifen abdecken und 4 Stunden bei Raumtemperatur (18-24°C) inkubieren.
5) Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
6) Pipettieren Sie 200 µl CONJ (Konjugat, brauner Schraubverschluss) in alle Wells.
7) Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-24°C) inkubieren.
8) Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
9) Pipettieren Sie 200 µl SUB (Substrat, blauer Schraubverschluss) in alle Wells.
10) 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-24°C) im Dunkeln inkubieren.
11) Pipettieren Sie 50 µl STOP (Stopplösung, weißer Schraubverschluss) in alle Wells, gut mischen.
12) Extinktion unmittelbar bei 450 nm messen, mit 630 nm als Referenz, falls möglich.

8) BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Messen Sie die optische Dichte (OD) von allen Wells mit einem Mikrotiterplattenphotometer mit einem 450 nm Filter (Referenz 630 nm). Konstruieren Sie eine Standardkurve aus den OD Werten der STD unter Verwendung von kommerziell erhältlichem Millimeterpapier oder einer geeigneten Software. Das Testsystem wurde mit einem 4 Parameter Algorithmus evaluiert. Andere Auswerte Algorithmen müssen vom Verwender evaluiert werden. Die Konzentration der Proben wird aus der Standardkurve abgelesen. Eventuelle weitere Verdünnungen müssen berücksichtigt werden.

Typische STD-Kurve:

Siehe Kapitel 8) *CALCULATION OF RESULTS* im englischen Teil des Beipacktextes.

Auf dem beige packten QC Protokoll sind die Resultate bei der QC Freigabe des Kits vermerkt. Vom Verwender erhaltene Daten der OD können abweichend sein, bedingt durch verschiedene Einflüsse und/oder dem normalen Signalverlust des Kits während der Laufzeit. Dieser mögliche Signalverlust hat keinen Einfluss auf die Gültigkeit der Resultate, so lange die OD des höchsten Standards den Wert 1,50 oder höher erreicht und die Werte der CTRL im jeweilig gültigen Bereich sind (Bereiche siehe Etiketten).

9) TESTMERKMALE

Methode:	Sandwich ELISA, HRP/TMB, 12x8-well Streifen
Probentyp:	Serum, EDTA Plasma, Heparin Plasma und Citrat Plasma
Standardbereich:	0 bis 20 pmol/l (6 Standards und 2 Kontrollen in humaner Serum-Matrix)
Umrechnungsfaktor:	1 pg/ml = 0,05 pmol/l (MW: 19,9 kD)
Probenvolumen:	20 µl / Vertiefung
Inkubationszeiten:	4 h / 1 h / 30 min
Sensitivität:	LOD: (0 pmol/l + 3 SD): 0,07 pmol/l; LLOQ: 0,08 pmol/l
Spezifität:	Der ELISA erkennt humanes endogenes und rekombinantes OPG. Der OPG ELISA misst OPG Monomere und Dimere wie auch OPG-RANKL Komplexe. Maus- und Rattenproben können in diesem Test nicht gemessen werden.
Präzision:	Intra-assay (n=5) ≤ 3%, Inter-assay (n=12) ≤ 5%

Wiederfindung (durchschnittliche Wiederfindung von endogenem OPG):	Serum (n=3): 98%	Heparin Plasma (n=3): 89%
	EDTA Plasma (n=3): 100%	Citrat Plasma (n=3): 95%
Verdünnungslinearität (durchschnittliche OPG Werte nach 1+1; 1+3; 1+7 Verdünnung):	Verdünnung:	
	1 + 1	Serum (n=3) 98%
	1 + 3	90%
	1 + 7	87%
Werte von anscheinend gesunden Spendern:	Median Serum (n=60): 2,7 pmol/l Median EDTA Plasma (n=6): 2,2 pmol/l Median Heparin Plasma (n=7): 2,3 pmol/l Median Citrat Plasma (n=5): 2,3 pmol/l Jedes Labor sollte den Normalbereich für seine Proben evaluieren. Wechseln Sie nicht die Probenmatrix innerhalb einer Studie.	

Nähere Informationen zu den Testmerkmalen finden Sie auf unserer Website unter www.bmgrp.com (s. Validation Data) oder kontaktieren Sie unseren Kundenservice, Email unter info@bmgrp.com, Tel. unter +43/ 1/ 29107-45.

10) PRÄZISION

Intra-assay: 2 Proben wurden 5 Mal in Doppelbestimmung in einem Test getestet.

Inter-assay: 2 Proben wurden 12 Mal in 2 verschiedenen Lots von 3 verschiedenen Operatoren getestet.

Intra-assay (n=5)	Probe 1	Probe 2
Durchschnitt (pmol/l)	3,2	10,1
SD (pmol/l)	0,05	0,34
VK (%)	2	3

Inter-assay (n=12)	Probe 1	Probe 2
Durchschnitt (pmol/l)	3,2	9,9
SD (pmol/l)	0,10	0,50
VK (%)	3	5

11) TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien von verschiedenen Lots oder Tests dürfen nicht gemischt werden.
- Stöpsel und Verschlüsse von verschiedenen Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Abgelaufene Reagenzien dürfen nicht verwendet werden.
- Reagenzien sind vor direktem Sonnenlicht zu schützen.
- Substratlösung muss vor Verwendung farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen bei den Inkubationen mit Abdeckfolie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.

12) VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Bestandteile humanen Ursprunges wurden auf HIV-Ak, HCV-Ak und HBsAg getestet und negativ gefunden. Trotzdem sollten die Reagenzien als potentiell infektiös behandelt werden.

Die flüssigen Reagenzien enthalten $\leq 0,1\%$ Proclin 950 als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie Kontakt mit Augen, Haut und Schleimhaut. Proclin 950 ist in der verwendeten Konzentration nicht toxisch. Allergische Reaktionen sind möglich.

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Nicht Rauchen, Essen, Trinken oder Kosmetika benutzen während der Verwendung der Testreagenzien.
- Verwenden Sie Handschuhe, Schutzbrille und Laborkleidung während der Testdurchführung.
- Schwefelsäure reizt Augen und Haut. Bei Berührung gründlich mit Wasser spülen.

13) LITERATUR

Siehe Kapitel 13) LITERATURE im englischen Teil des Beipacktextes.

NOTES:

NOTES:

NOTES:

SYMBOLS



Expiry date / Verfallsdatum / Date de péremption / Data di scadenza / Fecha de caducidad / Data de validade / Uiterste gebruiksdatum / Udløbsdato / Utgångsdatum / Termin Ważności / Lejárati idő / Doba expirácie / Doba expirace



Consider instructions for use / Bitte Gebrauchsanweisung beachten / Consultez la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las instrucciones de utilización / Consulte as instruções de utilização / Raadpleeg de gebruiksaanwijzing / Se brugsanvisningen / Läs anvisningarna före användning / Proszę przeczytać instrukcję wykonania / Vegyük figyelembe a használati utasításban foglaltakat / Postupujte podľa pokynov na použitie / Postupujte dle návodu k použití



In vitro Diagnostic Medical Device (for in Vitro Diagnostic Use) / In vitro Diagnostikum (zur In-vitro-Diagnostik) / Dispositif médical de diagnostic in vitro (Pour usage diagnostique in vitro) / Dispositivo medico per diagnostica in vitro (per uso diagnostico in vitro) / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (para uso diagnóstico in vitro) / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro (Para utilização de diagnóstico "in vitro") / Medisch hulpmiddel voor diagnostiek in vitro (Voor diagnostisch gebruik in vitro) / Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik (Udelukkende til in vitro diagnostisk anvendelse) / Medicinteknisk produkt avsedd för in vitro-diagnostik (För in vitro-diagnostiskt bruk) / Wyrób medyczny do Diagnostyki In Vitro / In vitro orvosdiagnosztikai termék / In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určené pre diagnostiku „in vitro“) / In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro“)



Lot-Batch Number / Charge-Chargennummer / Lot-Code du lot / Lotto-Numero di lotto / Lote-Código de lote / Lote-Código do lote / Lot-Partijnummer / Lot-Batchkode / Lot-Satskod / Numer serii / Lot-Batch szám / Číslo šarže / Číslo šarže



Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por / Vervaardigd door / Fabrikation af / Tillverkad av / Wyprodukowane pr / Gyártotta / Vyrobené / Vyrobeno



Catalogue Number / Bestellnummer / Numéro de référence / Numero di riferimento / Número de referencia / Número de referência / Referentienummer / Referencenummer / Katalognummer / Numer katalogowy / Katalógusszám / Katalógové číslo / Katalogové číslo



Store at between / Lagerung bei zwischen / Conserver à entre / Conservare a tra / Conservar a temp. entre / Armazene a entre / Bewaar bij tussen / Opbevaars mellem / Förvaras vid / Przechowywać w / Tároljuk között / Skladujte v rozsahu / Skladujte v mezii



Contains sufficient for x tests / Inhalt ausreichend für x Tests / Contient suffisant pour x tests / Contenido suficiente per x test / Contiene suficiente para x pruebas / Contém suficiente para x testes / Bevat voldoende voor x bepalingen / Ineholder tilstrækkeligt til x prøver / Innehållet räcker till x analyser / Zawartość na x testów / Tartalma X teszt elvégzésére elegendő / Obsahuje materiál pre x testov / Obsahuje materiál pro x testů

BI-20403 OSTEOPROTEGERIN

ASSAY PROTOCOL AND CHECKLIST

PREPARATION OF REAGENTS:

- Bring all reagents to room temperature (18-24°C).
- Prepare reagents and samples as instructed.
- Bring unused and prepared components to the storage temperature mentioned in the package insert.
- Take microtiter strips out of the aluminium bag and mark positions on the protocol sheet.

TEST PROCEDURE:

- Step 1) Pipette 150 µl ASYBUF (Assay buffer, red cap) into each well.
- Step 2) Add 20 µl STD/SAMPLE/CTRL (standard/sample/control) into all wells, swirl gently.
- Step 3) Add 50 µl AB (biotinylated anti OPG ab, green cap) into each well, swirl gently.
- Step 4) Cover tightly and incubate for 4 h at room temperature (18-24°C).**
- Step 5) Aspirate and wash wells with 300 µl WASHBUF (Wash buffer) five times. Remove remaining buffer by hitting plate against paper towel.
- Step 6) Add 200 µl CONJ (Conjugate, amber cap) into each well.
- Step 7) Cover tightly and incubate for 1 h at room temperature (18-24°C).**
- Step 8) Aspirate and wash wells with 300 µl WASHBUF (Wash buffer) five times. Remove remaining buffer by hitting plate against paper towel.
- Step 9) Add 200 µl SUB (Substrate, blue cap) into each well.
- Step 10) Incubate for 30 minutes at room temperature (18-24°C), in the dark.**
- Step 11) Add 50 µl STOP (Stop solution, white cap) into each well, swirl gently.
- Step 12) Read Optical Density at 450 nm with reference 630 nm, if available.