

Osteoprotegerin (human) ELISA Kit

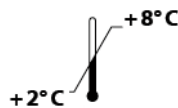
*Zur in vitro Bestimmung des OPG (human) in Serum,
Plasma, Urin und Zellkulturüberständen*

*For the in vitro determination of OPG (human) in serum,
plasma, urine and cell culture supernatant*

Gültig ab / Valid from 06.01.2011



KB 1011



Immundiagnostik AG



Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. TESTPRINZIP	3
4. INHALT DER TESTPACKUNG	3
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	4
7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	5
8. PROBENVORBEREITUNG	5
9. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Hinweise</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	6
10. ERGEBNISSE	7
11. EINSCHRÄNKUNGEN	7
12. QUALITÄTSKONTROLLE	7
<i>Erwartete Ergebnisse</i>	7
13. TESTCHARAKTERISTIKA	9
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	9
<i>Sensitivität</i>	9
14. LITERATUR	10
15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von **Osteoprotegerin** (human) aus Serum, Plasma, Urin und Zellkulturüberständen geeignet. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Osteoprotegerin (Synonym: Osteoclastogenesis inhibitory factor = OCIF) ist ein Glykoprotein mit inhibitorischer Wirkung auf Osteoklasten. RANK (Receptor activator of NF- κ B) wird an der Oberfläche von Osteoklasten Vorläuferzellen, der entsprechende Ligand RANKL (Synonym Osteoclast differentiation factor = ODF; Osteoprotegerin ligand = OPGL) an der Oberfläche von Präosteoblasten exprimiert. Durch Interaktion dieser beiden Moleküle wird die Osteoklastengnese induziert; auch für die Fusion zu mehrkernigen Zellen und die folgende Aktivierung der Osteoklasten ist eine Bindung von RANKL an RANK erforderlich. Osteoprotegerin ist ein löslicher Rezeptor, der von verschiedenen Geweben gebildet wird. Als „decoy receptor“ blockiert Osteoprotegerin die Interaktion zwischen RANK und RANKL und damit die Schritte der Rekrutierung, Proliferation und Aktivierung der Osteoklasten.

Transgene Mäuse, die OPG überexprimieren, zeigend daher eine schwere Osteopetrose.

Indikation

- Postmenopausale und senile Osteoporose
- Glukocorticoid induzierte Osteoporose
- Therapie Monitoring nach OPG Behandlung
- Krankheiten mit lokal erhöhter Resorptionsaktivität
- Arthritis
- Onkologie

3. TESTPRINZIP

Es werden zwei spezifische Antikörper gegen Osteoprotegerin verwendet: der Bindeantikörper ist an die Mikrotiterplatte immobilisiert, während der zweite mit Biotin markiert ist und als Detektionsantikörper dient.

Im ersten Schritt wird die Probe und der biotinylierte anti-Osteoprotegerin Antikörper in die Mikrotiterplatte überführt. Es bildet sich ein „sandwich“ aus Bindeantikörper - Osteoprotegerin – Detektionsantikörper. Nach einem Waschvorgang, der unspezifisch gebundenes Material entfernt, wird das OPG über ein Streptavidin-Peroxidase/TMB-System quantifiziert. Nach Stoppen der Enzymreaktion 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. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) vs. Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
KB1011MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	96
KB1011WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 20x	50 ml
KB1011AP	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	25 ml
KB1011ST	STD	Standards, gebrauchsfertig (0; 0.37; 1.1; 3.3; 10; 30 pmol/l)	6 x 500 µl
KB1011ST	STDKONZ	Stocklösung (500 pmol/l)	500 µl
KB1011KO	CTRL	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich siehe Datenblatt)	500 µl
KB1011A2	AB	2. Antikörper (anti-OPG, biotinyliert), gebrauchsfertig	7 ml
KB1011K	CONJ	Konjugat, (Streptavidin Peroxidase- markiert), gebrauchsfertig	22 ml
KB1011TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	22 ml
KB1011AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	7 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes oder deionisiertes Wasser
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenreader mit Filter 450 nm

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 als 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:20** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (50 ml Konzentrat + 950 ml aqua bidest.), 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 **WASHBUF** 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.
- **Zellkulturüberstände**

Die **STDKONZ** (OPG-Stocklösung; 500 pmol/l = 10 000 pg/ml) wird mit Zellkulturmedium 1:20 vorverdünnt S1 (50µl Stocklösung + 950 µl Zellkulturmedium). Die Standardkurve wird wie folgt in **1:2 Verdünnungsschritten** hergestellt.

		S1	(25.0 pmol/l = 500 pg/ml)
200 µl S1	+	200 µl Medium	= S2 (12.5 pmol/l = 250 pg/ml)
200 µl S2	+	200 µl Medium	= S3 (6.25 pmol/l = 125 pg/ml)
200 µl S3	+	200 µl Medium	= S4 (3.13 pmol/l = 62.6 pg/ml)

Als Standard 0 pg/ml wird Zellkulturmedium verwendet.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- 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 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- Plasmaproben und Urin

Serum-/Plasma- und Urinproben werden **unverdünnt** eingesetzt.

Serum muss nach der Abnahme innerhalb von 90 min zentrifugiert, aliquotiert und bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

Lipton et al. (2002) Serum Osteoprotegerin Levels in Healthy Controls and Cancer Patients. Cancer Res. 8:2306-2310

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumen 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 Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.	
1.	100 µl ASYBUF (Assaypuffer) in jede Vertiefung pipettieren.
2.	50 µl STD (Standard), CTRL (Kontrolle) und Proben in Doppelwerten pipettieren.
3.	50 µl AB (2. Antikörper) in jede Vertiefung pipettieren. Vorsichtig mischen.
4.	Über Nacht (18 - 24 h) bei 2-8 °C inkubieren.
5.	Den Inhalt der Platte verwerfen und 5 x mit je 300 µl Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
6.	200 µl CONJ (Konjugat) in jede Vertiefung pipettieren.
7.	1 Stunde bei Raumtemperatur (18 - 26 °C) inkubieren.
8.	Den Inhalt der Platte verwerfen und 5 x mit je 300 µl Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
9.	200 µl SUB (TMB-Substratlösung) pro Vertiefung pipettieren.
10.	15-20 Minuten (entsprechend der Farbdifferenzierung) bei Raumtemperatur inkubieren.
11.	50 µl STOP (Stopplösung) pro Vertiefung zusetzen und kurz mischen.
12.	Die 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 (690 nm) messen.

10. ERGEBNISSE

Zur Auswertung des Testes empfehlen wir die 4-Parameter-Funktion. Alternativ kann auch eine Punkt-zu-Punkt-Auswertung oder eine gewichtete Spline-Funktion gewählt werden. Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte diese der Operator durchführen.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer OPG Konzentration größer als der höchste Standard sollten mit Waschpuffer weiter verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden.

12. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen die Kontrollen oder Serum/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

Referenzwerte

OPG-Konzentration im Serum gesunder Erwachsener:

1,69 - 3,60 pmol/l (n=142, Frauen und Männer im Alter von 21 - 70 Jahren)*

* Aus: **Jung K et al. (2002)** Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) in the serum of healthy adults. Int J Biol Markers. Jul-Sep;17(3):177-81

Seren gemessen mit unserem OPG-ELISA ergaben die in der Tabelle (auf Seite 8) aufgelisteten Werte.

Tabelle (Kudlacek S et al., 2003):

OPG Referenzwerte (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

Umrechnungsfaktor: 1 pg/ml = 0.05 pmol/l

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

13. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Es wird die Reproduzierbarkeit von zwei Proben innerhalb einer Meßserie geprüft. Zwei Proben wurden 16 mal in einem OPG ELISA von einer Person angesetzt.

Tabelle1: **Intra-Assay** VK (n= 16)

Probe	OPG [pmol/l]	Intra-Assay Vk [%]
1	4.5	10
2	19.5	8

Zwei Proben wurden an verschiedenen Tagen und von verschiedenen Personen im OPG ELISA gemessen.

Tabelle2: **Inter-Assay** VK (n= 16)

Probe	OPG [pmol/l]	Intra-Assay Vk [%]
1	4.5	< 10
2	19.5	< 10

Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 3 \text{ SD}$. Gemessen wurde 16 mal der Standard Null von einer Person im OPG ELISA. Nachweisgrenze: 0.14 pmol/l

14. LITERATUR

Publikationen basierend auf dem Immundiagnostik AG Osteoprotegerin ELISA:

- Oelzner P et al. (2006) RANKL, Osteoprotegerin und IL-6-System bei Rheumatoider Arthritis - Einfluß von Alter, Erkrankungsdauer, Menopause und entzündlicher Aktivität. Poster vorgestellt bei der Osteologietagung, 8.-11. März 2006, Köln
- Hein G et al. (2005) Vergleich der Serum- und Synovia-Spiegel von sRANKL und OPG bei rheumatoider Arthritis und nicht erosiven Arthritiden. Poster, vorgestellt beim 33. Kongress der D. Ges. für Rheumatologie, September 2005, Dresden
- Simonini G et al. (2005) Osteoprotegerin serum levels in Kawasaki disease: an additional potential marker in predicting children with coronary artery involvement. J Rheumatol 32(11):2233-38
- Franck H et al. (2004) Evaluation of bone mineral density, hormones, biochemical markers of bone metabolism, and osteoprotegerin serum levels in patients with ankylosing spondylitis. J Rheumatol 31(11):2236-41
- Hofbauer LC et al. (2004) Effects of oral contraceptives on circulating osteoprotegerin and soluble RANK ligand serum levels in healthy young women. Clin Endocrinol (Oxf) 60(2):214-19
- Schoppet M et al. (2003) Increased osteoprotegerin serum levels in men with coronary artery disease. J Clin Endocrinol Metab. 88(3):1024-28
- Avbersek-Luznik I et al. (2002) Increased levels of osteoprotegerin in hemodialysis patients. Clin Chem Lab Med 40(10):1019-23
- Coen G et al. (2002) Serum osteoprotegerin and renal osteodystrophy. Nephrol Dial Transplant 17(2):233-38
- **Jung K et al. (2002)** Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) in the serum of healthy adults. Int J Biol Markers 17(3):177-81
- Liegibel UM et al. (2002) Concerted action of androgens and mechanical strain shifts bone metabolism from high turnover into an osteoanabolic mode. J Exp Med 196(10):1387-92
- Lipton et al. (2002) Serum Osteoprotegerin Levels in Healthy Controls and Cancer Patients. Cancer Res. 8:2306-2310
- Sattler AM et al. (2002) Osteoprotegerin in patients with coronary artery disease. Abstract (Poster 002) of XIII Lipid Meeting, Leipzig
- Viereck V et al. (2002) Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. Biochem Biophys Res Commun 291(3):680-86
- Viereck V et al. (2002) Phytoestrogen genistein stimulates the production of osteoprotegerin by human trabecular osteoblasts. J Cell Biochem 84(4):725-35
- Burguera B et al. (2001) Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. Endocrinology 142(8):3546-53

- Jung K et al. (2001) Osteoprotegerin in serum as a novel marker of bone metastatic spread in prostate cancer. Clin Chem 47(11):2061-63
- Szulc P et al. (2001) Osteoprotegerin serum levels in men: correlation with age, estrogen, and testosterone status. J Clin Endocrinol Metab 86(7):3162-65
- Kudlacek S et al. (2003), Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population. Bone 32: 681-686

Osteoprotegerin allgemein

- Hofbauer LC (1999), Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology and bone metabolism. European Journal of Endocrinology 141: 195-210
- Aubin JE et al. (2000) Osteoprotegerin and its Ligand: A New Paradigm for Regulation of Osteoclastogenesis and Bone Resorption. Medscape Women Health 5(2)
- Simonet WS et al. (1997) Osteoprotegerin, a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell 89: 309-319
- Bucay N et al. (1998) Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. Genes and Development 12: 1260- 1268
- Bekker PJ et al. (1999) Osteoprotegerin (OPG) has Potent and Sustained Anti-Resorptive Activity in Postmenopausal Women. 21st Annual Meeting of the ASBMR Abstract No. 1190
- Makhluף HA et al. (2000) Age-Related Decline in Osteoprotegerin Expression by Human Bone Marrow Cells Cultured in Three-Dimensional Collagen Sponges. Biochemical and Biophysical Research Communications 268: 669-672
- Honore P et al. (2000), Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord. Nature Medicine 6(5): 521-528

15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur in vitro Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkom-

ponenten 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 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.
- Reagenzien nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller - der Immundiagnostik - zurück zu senden.

Dieser Assay ist eine Gemeinschaftsentwicklung der Firmen
Immundiagnostik, Bensheim und **Biomedica**, Wien.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

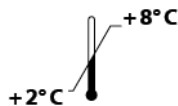
Osteoprotegerin (human) ELISA Kit

*For the in vitro determination of OPG (human) in serum,
plasma, urine and cell culture supernatant*

Valid from 06.01.2011



KB 1011



Immundiagnostik AG



Content

1. INTENDED USE	15
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	15
3. PRINCIPLE OF THE TEST	15
4. MATERIAL SUPPLIED	16
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	17
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	17
7. PRECAUTIONS	18
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	18
9. ASSAY PROCEDURE	18
<i>Procedural notes</i>	18
<i>Test procedure</i>	19
10. RESULTS	20
11. LIMITATIONS	20
12. QUALITY CONTROL	20
<i>Expected values</i>	20
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	22
<i>Precision and reproducibility</i>	22
<i>Sensitivity</i>	22
14. REFERENCES	23
15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	25

1. INTENDED USE

The Immundiagnostik assay is a sandwich ELISA intended for the quantitative determination of Osteoprotegerin in serum, plasma, urine and cell culture supernatants. It is for *in vitro* diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Osteoprotegerin (OPG) or **Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF)** is a dimeric glycoprotein of the TNF receptor family with a molecular weight of 60 kD resp. 120 kD which shows an inhibitory effect on osteoclasts and osteoclast precursor cells.

Osteoprotegerin is a soluble "decoy"-receptor and is produced in different tissues, e.g. bone, skin, liver, stomach, intestine and lung. As a so-called "decoy receptor" OPG inhibits the binding of RANK to RANKL (OPG-L, osteoclast differentiation factor, ODF) and thus inhibits the recruitment, proliferation and activation of osteoclasts.

OPG shows an inhibitory effect on osteoclasts. Osteoclast formation activity may be determined principally by the relative concentration of OPG-L/osteoclast differentiation factor (ODF) to OPG/OCIF in the bone marrow microenvironment. Alterations of this ratio may be the major cause of bone loss in many imbalances in bone metabolism such as osteoporosis, osteopetrosis, metastatic osteolytic lesions and rheumatic bone degradation.

Indication

- Postmenopausal and senile osteoporosis
- Glucocorticoid-induced osteoporosis
- Diseases with locally increased resorption activity
- Therapy monitoring after treatment with OPG
- Arthritis
- Oncology

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This sandwich-type ELISA is an assay for the direct determination of OPG in serum, plasma and urine. In this assay two highly specific antibodies against OPG are used. The binding antibody is attached to the wells of the microtiterplate, the detection antibody is labeled with biotin.

In a first incubation step the samples and the biotinylated antibody against OPG react simultaneously with the pre-coated antibody on the microtiterplate. A sandwich-type complex is found consisting of the binding antibody on the plate, OPG and the biotinylated detec-

tion antibody. To remove all unspecific bound substances a washing step is carried out. In a second step streptavidin – peroxidase is added which reacts with the detection antibody. After another washing step the solid phase is incubated with the substrate, TMB. An acidic stopping solution is subsequently added. The blue colour changes to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the concentration of OPG in the sample.

A dose - response curve of the absorbance units (at 450 nm) versus concentration is generated. OPG, present in the samples, is determined directly from this calibration curve.

4. MATERIAL SUPPLIED

Catalogue no.	Content	Kit Components	Quantity
KB1011MTP	PLATE	Pre-coated microtiterplate, 12 x 8 strips	96
KB1011WP	WASHBUF	ELISA washing buffer concentrate (20x)	50 ml
KB1011AP	ASYBUF	Assay buffer, ready-to-use	25 ml
KB1011ST	STD	Calibrators, ready-to-use (0; 0.37; 1.1; 3.3; 10; 30 pmol/l)	6 x 500 µl
KB1011ST	STDKONZ	Stock solution (500 pmol/l)	500 µl
KB1011KO	CTRL	Control, ready-to-use	500 µl
KB1011A2	AB	2 nd antibody (anti-OPG, biotinylated), ready-to-use	7 ml
KB1011K	CONJ	Conjugate, (streptavidin-HRP-labeled), ready-to-use	22 ml
KB1011TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	22 ml
KB1011AC	STOP	ELISA stop solution, ready-to-use	7 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- 1,5 ml reaction vials (Eppendorf)
- Precision pipettes calibrated to deliver 10 -1000 µl and disposable tips.
- Centrifuge capable of 3000 x g
- ELISA reader
- Vortex-mixer
- Bidistilled or deionized water

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run 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 **ELISA WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with aqua bidist. **1:20** before use (50 ml concentrate + 950 ml aqua bidist.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be re-dissolved at room temperature or at 37°C before dilution. The **WASHBUF** 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.**

- **Cell culture**

The **STDKONZ** (OPG calibrator concentrate, 500 pmol/l = 10 000 pg/ml) must be diluted **1:20** with medium (50 µl Calibrator + 950 µl Medium) to obtain **S1**. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. Standard curve solutions must be prepared from **S1** in **1:2** dilution steps by adding dilution medium as follows:

		S1	(25.0 pmol/l = 500 pg/ml)
200 µl S1	+	200 µl medium	= S2 (12.5 pmol/l = 250 pg/ml)
200 µl S2	+	200 µl medium	= S3 (6.25 pmol/l = 125 pg/ml)
200 µl S3	+	200 µl medium	= S4 (3.13 pmol/l = 62.6 pg/ml)

Cell culture medium is used as Standard 0.

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.
- 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 and urine samples:

Serum, plasma and urine samples can be used **without any dilution**.

Serum must be centrifuged and aliquoted within 90 min after collection and stored at –20 °C until use.

Lipton et al. (2002) Serum Osteoprotegerin Levels in Healthy Controls and Cancer Patients.
Cancer Res. 8:2306-2310

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- 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 wrong use.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Test procedure

It is recommended to carry out the assay in duplicate and to cover the microtiter plate during the incubation steps.

1. Add **100 µl ASYBUF** (assay buffer) into each well..
2. Add **50 µl STD** (standard), **CTRL** (control) or **samples** into each microtiter well in duplicate.
3. Add **50 µl AB** (2nd antibody) into each well. Mix gently.
4. Incubate **over night** (18 – 24 h) at 2-8 °C.
5. Aspirate and wash the wells **5 x with 300 µl** ELISA wash buffer.
6. Add **200 µl CONJ** (conjugate) into each well.
7. Incubate for **1 hour** at room temperature (18 – 26 °C).
8. Aspirate and wash the wells **5 x with 300 µl** ELISA wash buffer.
9. Add **200 µl SUB** (TMB substrate solution) into each well.
10. Incubate for **15 – 20 min** at room temperature in the dark.
11. Add **50 µl STOP** (stop solution) into each well and mix shortly.
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.

10. RESULTS

A calibration curve is constructed from the standards. Commercially available software can be used as well as graph paper. Results of the samples are calculated from this calibration curve.

THE CALIBRATION CURVE IS NOT LINEAR, therefore a 4PL- algorithm or spline is recommended.

11. LIMITATIONS

Samples with OPG levels greater than the highest standard value should be further diluted with wash buffer and re-assayed.

12. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends to use 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 are located outside the acceptable limits, the results for the patient sample may not be valid.

Expected values

Reference values

OPG-concentration in the serum of healthy adults:

1,69 - 3,60 pmol/l (n=142, women and men, aged 21 - 70 years)*

* From: **Jung K et al. (2002)** Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) in the serum of healthy adults. Int J Biol Markers. Jul-Sep;17(3):177-81

Normal sera measured with our OPG-ELISA gave the values listed in the table (see next page):

Table (Kudlacek S et al., 2003):

OPG Reference data (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)

Age	OPG (mean ± SD)		OPG (median, range)		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

Conversion factor: 1 pg/ml = 0.05 pmol/l

We recommend each laboratory to establish its own norm concentration range.

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

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

Table1: **Intra-Assay** CV (n= 16)

Sample	OPG [pmol/l]	Intra-Assay CV [%]
1	4.5	10
2	19.5	8

The total precision (inter-assay variation) was calculated from data on 2 samples obtained in 16 different assays by three technicians on two different lots of reagents over a period of three months.

Table 2: **Inter-Assay** CV (n= 16)

Sample	OPG [pmol/l]	Inter-Assay CV [%]
1	4.5	< 10
2	19.5	< 10

Sensitivity

The detection limit (0 pg/ml + 3 SD): 0.14 pmol/l

14. REFERENCES

Publications based on Immundiagnostik's Osteoprotegerin ELISA:

- Simonini G et al. (2005) Osteoprotegerin serum levels in Kawasaki disease: an additional potential marker in predicting children with coronary artery involvement. *J Rheumatol* 32(11):2233-38
- Franck H et al. (2004) Evaluation of bone mineral density, hormones, biochemical markers of bone metabolism, and osteoprotegerin serum levels in patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 31(11):2236-41
- Hofbauer LC et al. (2004) Effects of oral contraceptives on circulating osteoprotegerin and soluble RANK ligand serum levels in healthy young women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60(2):214-19
- Schoppet M et al. (2003) Increased osteoprotegerin serum levels in men with coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 88(3):1024-28
- Avbersek-Luznik I et al. (2002) Increased levels of osteoprotegerin in hemodialysis patients. *Clin Chem Lab Med* 40(10):1019-23
- Coen G et al. (2002) Serum osteoprotegerin and renal osteodystrophy. *Nephrol Dial Transplant* 17(2):233-38
- **Jung K et al. (2002)** Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) in the serum of healthy adults. *Int J Biol Markers* 17(3):177-81
- Liegibel UM et al. (2002) Concerted action of androgens and mechanical strain shifts bone metabolism from high turnover into an osteoanabolic mode. *J Exp Med* 196(10):1387-92
- Lipton et al. (2002) Serum Osteoprotegerin Levels in Healthy Controls and Cancer Patients. *Cancer Res.* 8:2306-2310
- Sattler AM et al. (2002) Osteoprotegerin in patients with coronary artery disease. Abstract (Poster 002) of XIII Lipid Meeting, Leipzig
- Viereck V et al. (2002) Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 291(3):680-86
- Viereck V et al. (2002) Phytoestrogen genistein stimulates the production of osteoprotegerin by human trabecular osteoblasts. *J Cell Biochem* 84(4):725-35
- Burguera B et al. (2001) Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. *Endocrinology* 142(8):3546-53
- Jung K et al. (2001) Osteoprotegerin in serum as a novel marker of bone metastatic spread in prostate cancer. *Clin Chem* 47(11):2061-63

- Szulc P et al. (2001) Osteoprotegerin serum levels in men: correlation with age, estrogen, and testosterone status. *J Clin Endocrinol Metab* 86(7):3162-65
- Kudlacek S et al. (2003), Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population. *Bone* 32: 681-686

Osteoprotegerin general:

- Hofbauer LC (1999), Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology and bone metabolism. *European Journal of Endocrinology* 141: 195-210
- Aubin JE et al. (2000) Osteoprotegerin and its Ligand: A New Paradigm for Regulation of Osteoclastogenesis and Bone Resorption. *Medscape Women Health* 5(2)
- Simonet WS et al. (1997) Osteoprotegerin, a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89: 309-319
- Bucay N et al. (1998) Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes and Development* 12: 1260- 1268
- Bekker PJ et al. (1999) Osteoprotegerin (OPG) has Potent and Sustained Anti-Resorptive Activity in Postmenopausal Women. 21st Annual Meeting of the ASBMR Abstract No. 1190
- Makhluף HA et al. (2000) Age-Related Decline in Osteoprotegerin Expression by Human Bone Marrow Cells Cultured in Three-Dimensional Collagen Sponges. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 268: 669-672
- Honore P et al. (2000), Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord. *Nature Medicine* 6(5): 521-528

15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for in vitro diagnostic use only.
- Guidelines for medical laboratories should be followed.
- 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.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- 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 wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of 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.

This Assay was developed by
Immundiagnostik, Bensheim and **Biomedica**, Wien.

Used Symbols:



Store at



Catalog Number



In Vitro Diagnostic Device



No. of tests



Manufacturer



Use by



Lot number



Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
D-64625 Bensheim

Tel.: +49 (0) 62 51/70 19 00

Fax: +49 (0) 62 51/84 94 30

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com