

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 TESTS

(FR) ESSAI IMMUNOENZYMATIQUE POUR LA DETERMINATION QUANTITATIVE DE L'OSTEOPROTEGERINE DANS LE SERUM, LE PLASMA EDTA, LE PLASMA HEPARINE OU LE PLASMA CITRATE

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

(IT) DOSAGGIO IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DELL'OSTEOPROTEGERINA IN PLASMA EDTA, PLASMA EPARINA, PLASMA CITRATO O NEL SIERO.

CODICE: BI-20403 . 12 X 8 DETERMINAZIONI

(ES) ENZIMOINMUNOENSAYO PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE OSTEOPROTEGERINA EN PLASMA EDTA, PLASMA HEPARINIZADO, PLASMA CITRATE O SUERO

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

rev.no. 140924 (replacing 120229)



Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, A-1210 Wien, Divischgasse 4
Tel. +43/1/291 07 45, Fax +43/1/291 07 85, E-mail export@bmgrp.com

CONTENT / INHALT / SOMMAIRE / CONTENUTO / CONTENIDO

ENGLISH	Page 3
DEUTSCH	Seite 7
FRANCAIS	Page 11
ITALIANO	Pagina 15
ESPANIOL	Pagina 19

Additional information on our products is available on our website.
Zusätzliche Information zu unseren Produkten ist auf unserer Homepage erhältlich.
Pour toute information complémentaire sur nos produits, visiter notre site Internet.
Ulteriori informazioni sui nostri prodotti sono disponibili sulla nostra home page.
Encontrará información adicional sobre nuestros productos en nuestra página web.

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, 10, 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 strip holder, 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	Control, yellow cap, ready to use, (exact concentration on the label)	1 x 300 µl
ASYBUF	Assay Buffer, red cap, ready to use	1 x 25 ml
CONJ	Conjugate, (streptavidin-HRP), 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:

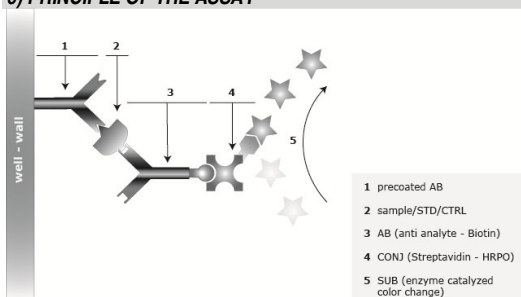
Collect venous blood samples by using standardized blood collection tubes for serum or plasma. We recommend performing plasma or serum separation by centrifugation as soon as possible, e.g. 20 min at 2000 x g, preferably at 4°C (2-8°C). If this is not possible store the samples at 4°C (2-8°C) prior to 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 could be diluted with STD1 or OPG negative human serum.

For further information on sample stability please visit our website www.bmgrp.com (see Technical File) or contact our customer service by e-mail export@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. 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



7) ASSAY PROTOCOL

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

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

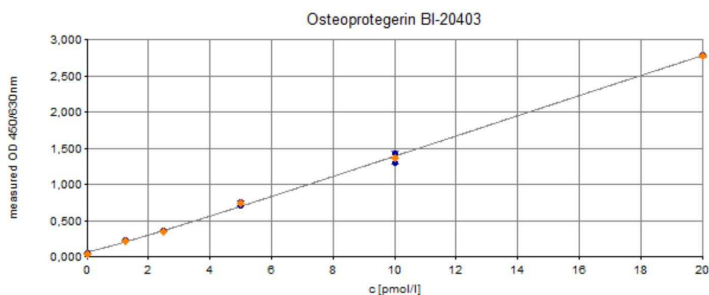
Take microtiter strips out of the aluminium bag, take a minimum of one well as Blank. Store unused strips with desiccant at 4°C (2-8°C) in the aluminium bag. Strips are stable until expiry date stated on the label.

- 1) Pipette 150 µl ASYBUF (Assay Buffer, red cap) into each well. Pipette additional 100 µl into well marked as blank.
- 2) Add 20 µl STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) in duplicate into respective wells, except blank.
- 3) Add 50 µl AB (biotinylated anti OPG antibody, green cap) into each well, except blank, swirl gently.
- 4) Cover tightly and incubate for 4h 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.
- 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). Subtract the blank OD from the values of STD, CTRL and sample. 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 STD with the highest concentration and the value of the CTRL is in range (target range see label).

9) ASSAY CHARACTERISTICS

Values from apparently healthy individuals:	Median = 2.7 pmol/l (serum, n = 60) It is recommended to establish the normal range for each laboratory.
Standard range:	0 to 20 pmol/l
Conversion factor pg/ml to pmol/l:	1 pg/ml = 0.05 pmol/l (MW: 19.9 kD)
Sample volume:	20 µl human serum, EDTA plasma, Heparin plasma, Citrate plasma
Detection limit:	(0 pmol/l + 3 SD): 0.07 pmol/l
Incubation time:	4 h / 1 h / 30 min

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

10) PRECISION

Intra-Assay: 2 samples of known concentrations were tested 5 times to assess intra-assay precision.

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

Intra-Assay (n=5)	Sample 1	Sample 2
Mean (pmol/l)	3.2	10.1
SD (pmol/l)	0.05	0.34
CV	2%	3%

Inter-Assay (n=12)	Sample 1	Sample 2
Mean (pmol/l)	3.2	9.9
SD (pmol/l)	0.10	0.50
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 and HBsAg; and were found negative. Nevertheless, they should be handled and disposed as if they were infectious.

Liquid reagents contain $\leq 0.1\%$ Proclin 300 as preservative. Avoid contact with skin and mucous membrane. Proclin 300 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 – 13.
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): 481-5.
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): 588-94.

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	Kontrolle, gelber Schraubverschluss, gebrauchsfertig (genaue Konzentration siehe Etikett)	1 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 Blutabnehmeröhrchen 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 können mit STD1 oder OPG negativem human Serum verdünnt werden.

Nähere Informationen zur Probenstabilität finden Sie auf unserer Website www.bmgrp.com (s. Technical File) oder kontaktieren Sie unseren Kundenservice, Email unter export@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). 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

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 BLANK/STD/PROBE/CTRL (Leerwert/Standard/Probe/Kontrolle) am Protokoll Blatt.

Nehmen Sie die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Aluminium Beutel. Mindestens 1 Well für den Leerwert reservieren. 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. Pipettieren Sie zusätzlich 100 µl in das Well für den Leerwert.
- 2) Pipettieren Sie 20 µl STD /PROBE/CTRL(Standard/Probe/Kontrolle) in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen, mit Ausnahme des Leerwertes, mischen.
- 3) Pipettieren Sie 50 µl AB (biotinylierter anti OPG Antikörper, grüner Schraubverschluss) in alle Wells, mit Ausnahme des Leerwertes, 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.
- 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). Die OD des Leerwertes ist von den Werten der STD, CTRL und Proben abzuziehen. 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 der Wert der CTRL im gültigen Bereich ist (Bereich siehe Etikett).

9) TESTMERKMALE

Werte von anscheinend gesunden Spendern:	Median = 2,7 pmol/l (Serum, n = 60) Jeder Verwender sollte den Normalbereich für seine Proben evaluieren.
Standardbereich:	0 bis 20 pmol/l
Umrechnungsfaktor pg/ml zu pmol/l:	1 pg/ml = 0,05 pmol/l (MW: 19,9 kD)
Probenvolumen:	20 µl human Serum, EDTA Plasma, Heparin Plasma oder Citrat Plasma
Detektionsgrenze:	(0 pmol/l + 3 SD): 0,7 pmol/l
Inkubationszeiten:	4 h / 1h / 30 min

Nähere Informationen zu den Testmerkmalen finden Sie auf unserer Website unter www.bmgrp.com (s. Technical File) oder kontaktieren Sie unseren Kundenservice, Email unter export@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 und HBsAg getestet und negativ gefunden. Trotzdem sollten die Reagenzien als potentiell infektiös behandelt werden.

Die flüssigen Reagenzien enthalten $\leq 0,1\%$ Proclin 300 als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie Kontakt mit Augen, Haut und Schleimhaut. Proclin 300 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.

1) INTRODUCTION

L'ostéoprotégérine (OPG) ou le facteur inhibiteur des ostéoclastes (OCIF) est une glycoprotéine de la superfamille des récepteursTNF 11b (gène TNFRSF11B) <http://www.uniprot.org/uniprot/O00300>. L'OPG est synthétisée sous forme de monomère de 380 acides aminés puis est assemblée dans la cellule en homodimère, puis sécrétée dans le compartiment extracellulaire essentiellement en homodimère lié par un pont disulfure. L'OPG est produite par différents tissus et divers types de cellules, dont les ostéoblastes. L'OPG est un régulateur négatif de la résorption osseuse en agissant comme récepteur "decoy" pour RANKL, neutralisant ainsi sa fonction dans l'ostéoclastogénèse. Cette glycoprotéine est également impliquée dans la régulation de la calcification vasculaire.

Indications:

- Ostéoporose (1,2)
- Maladies entraînant une activité accrue de résorption osseuse locale (3-6)
- Arthrite (7,8)
- Suivi thérapeutique (9,10,11)
- Maladies cardio-vasculaires (12-17)

2.) CONTENU DE LA TROUSSE

CONT	KIT COMPONENTS	QUANTITE
PLATE	Plaques de barrettes de microtitration revêtues d'anticorps polyclonal anti-OPG de chèvre, avec support pour barrettes. Conditionnées en sachets alu avec dessicatif	12 x 8 tests
WASHBUF	Tampon de lavage, concentré 20x, bouchon à vis transparent	1 x 50 ml
AB	Anticorps de souris- monoclonal biotinylé - bouchon à vis vert, prêt à l'emploi	1 x 7 ml
STD	Etalons 1-6, (0; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 pmol/l), bouchon à vis blanc, prêts à l'emploi A utiliser uniquement avec des échantillons de sérum ou de plasma	6 x 300 µl
CTRL	Contrôle, bouchon à vis jaune, prêt à l'emploi (pour la concentration exacte, voir étiquette) A utiliser uniquement avec des échantillons de sérum ou de plasma	1 x 300 µl
ASYBUF	Tampon de dosage, bouchon à vis rouge, prêt à l'emploi	1 x 25 ml
CONJ	Conjugué, (streptavidine-HRPO), flacon marron, bouchon à vis marron, prêt à l'emploi	1 x 22 ml
SUB	Substrat (solution TMB), flacon marron, bouchon à vis bleu, prêt à l'emploi	1 x 22 ml
STOP	Solution d'arrêt, bouchon à vis blanc, prête à l'emploi	1 x 7 ml

3) AUTRE MATERIEL INCLUS DANS LA TROUSSE

- 2 bandes de film adhésif
- Protocole de contrôle de la qualité
- Une feuille de protocole
- Notice d'utilisation

4) MATERIEL ET APPAREILS NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

- Micropipettes de précision calibrées pour 20 µl, 50 µl, 150 µl, 200 µl, 300 µl, embouts jetables compris
- Eau distillée ou déionisée
- Un laveur de microplaques est conseillé, alternatives: pipettes multicanaux, distributeurs
- Réfrigérateur à 4°C (2-8°C)
- Photomètre pour microplaques équipé d'un filtre à 450 nm (référence 630 nm)
- Papier millimétré ou logiciel

5) PREPARATION DES REACTIFS ET DES ECHANTILLONS

Tous les réactifs de la trousse restent stables à 4°C (2-8°C) jusqu'à la date de péremption (voir étiquette du réactif).

Préparation des échantillons:

Recueillir du sang veineux dans un tube de prélèvement de sang standard pour sérum ou plasma. Nous recommandons de centrifuger le sang le plus tôt possible pendant 20 minutes à 2000g, de préférence à 4°C (2-8°C). Avant la centrifugation, le sang peut être conservé pendant une durée allant jusqu'à 24 heures à 4°C (2-8°C). Le sérum ou le plasma obtenus doivent être mesurés le plus tôt possible. A des fins de conservation, les échantillons doivent être aliquotés et conservés à moins 25°C ou plus bas. Ils peuvent subir jusqu'à 4 cycles de congélation / décongélation sans modification des valeurs de mesures. Les échantillons lipémiques ou hémolysés peuvent fournir des résultats erronés. Bien mélanger les échantillons avant utilisation. Les échantillons qui donnent les valeurs plus élevées que le dernier standard doivent être dilués avec le STD1 ou un sérum négatif en OPG.

Vous trouverez de plus amples informations sur la stabilité des échantillons en consultant notre site web à www.bmgrp.com (voir Technical File) ou contactez notre service clientèle à l'adresse email export@bmgrp.com, ou en composant le numéro de téléphone +43/1/29107-45.

Reconstitution:

WASHBUF (Tampon de lavage): Des cristaux de sel dans le concentré de tampon sont normaux. Dissoudre les cristaux de sel à température ambiante et diluer le concentré de tampon avec de l'eau distillée ou déionisée à 1:20 (par exemple, 50 ml de WASHBUF + 950 ml d'eau distillée). Le tampon de lavage dilué se conserve jusqu'à un mois à une température de 4°C (2-8°C). Seul du WASHBUF (tampon de lavage) dilué devra être utilisé dans le système de dosage.

6) PRINCIPE DU DOSAGE

Voir au chapitre 6) PRINCIPE OF THE ESSAY de la version anglaise de la notice.

7) PROTOCOLE DU DOSAGE

Tous les réactifs et échantillons doivent être à température ambiante (18-24°C) avant d'être utilisés dans le dosage
Marquer les positions de BLANK/STD/SAMPLE/CTRL (Blanc/Standard/Echantillon/Contrôle) sur le protocole.
Sortir du sachet alu les barrettes de microtitration requises. Réserver au minimum un puits comme blanc. Les barrettes inutilisées peuvent être conservées dans le sachet alu avec leur dessicatif à une température de 4°C (2-8°C) jusqu'à la date de péremption indiquée.
1. Distribuer 150 µl de ASYBUF (Tampon de dosage) dans chaque puits. Distribuer 100 µl de plus dans le puits pour le blanc.
2. Distribuer 20 µl de STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Echantillon/Contrôle) en double dans les barrettes de microtitration, sauf le blanc, puis agiter.
3. Distribuer 50 µl d'AB (anticorps biotinylé anti-OPG) dans chaque puits, sauf le blanc, agiter.
4. Couvrir la plaque et incuber pendant 4 heures à température ambiante (18-24°C).
5. Aspirer le contenu des puits et les laver 5 fois avec 300 µl de WASHBUF (Tampon de lavage) dilué. Eliminer tout WASHBUF restant en tapant la plaque contre une serviette en papier après le dernier lavage.
6. Distribuer 200 µl de CONJ (Conjugué) dans chaque puits.
7. Couvrir la plaque et incuber pendant 1 heure à température ambiante (18-24°C).
8. Aspirer le contenu des puits et les laver 5 fois avec 300 µl de WASHBUF (Tampon de lavage) dilué. Eliminer tout WASHBUF restant en tapant la plaque contre une serviette en papier après le dernier lavage.
9. Distribuer 200 µl de SUB (Substrat) dans chaque puits.
10. Incuber pendant 30 min à température ambiante (18-24°C) dans le noir.
11. Distribuer 50 µl de STOP (solution stop) dans chaque puits.
12. Mesurer immédiatement l'absorbance à 450nm avec une référence à 630 nm, si possible.

8) CALCUL DES RESULTATS

Mesurez la densité optique (DO) de chaque puits avec un photomètre pour microplaques à filtre de 450 nm (Référence 630 nm). Soustraire l'absorbance du blanc des valeurs STD, CTRL et des échantillons. Construire la courbe d'étalonnage à partir des valeurs des étalons, utilisant du papier millimétré vendu couramment dans le commerce ou un logiciel prévu à cet effet.

Le système de dosage a été évalué avec un algorithme à quatre paramètres (4PL). Des algorithmes d'évaluation différents doivent être évalués par l'utilisateur. La concentration des échantillons devra être reportée sur la courbe d'étalonnage. Tenir compte des facteurs de dilution respectifs.

Courbe STD typique :

Voir au chapitre 8) CALCULATION OF RESULTS dans la version anglaise de la notice d'utilisation.

Le protocole de contrôle qualité fourni avec la trousse présente les résultats du dernier contrôle qualité de chaque trousse. Les données de densité optique obtenues par les utilisateurs peuvent être différentes suite à diverses influences et/ou à la perte de signal que l'on constate pendant la durée de vie d'une trousse. Cependant, cette perte de signal éventuelle n'a pas d'incidence sur la validité des résultats, à partir du moment où la DO de l'étalon ayant la concentration la plus élevée est au moins égale à 1,50 et que la valeur de CTRL est située dans une plage acceptable (pour la plage, voir l'étiquette).

9) CARACTERISTIQUES DU DOSAGE

Gamme des valeurs normales:	Median = 2,7 pmol/l (serum, n = 60) Nous recommandons à chaque laboratoire d'établir sa propre gamme de valeurs normales.
Gamme d'étalonnage:	0 à 20 pmol/l
Facteur de conversion pg/ml à pmol/l:	1 pg/ml = 0,05 pmol/l (MW: 19,9 kD)
Volume de l'échantillon:	20 µl plasma EDTA humain, plasma hépariné, plasma citraté, sérum
Limite de détection:	(0 pmol/l + 3 SD): 0,07 pmol/l
Temps d'incubation :	4 h / 1 h / 30 min

Vous trouverez de plus amples informations sur la stabilité des échantillons en consultant notre site web à l'adresse www.bmgrp.com (voir Technical File) ou contactez notre service clientèle à l'adresse email export@gmgrp.com, ou en composant le numéro de téléphone +43/1/29107-45.

10) PRECISION

Précision intra-série : 2 échantillons ont été testés 5 fois en double lors d'un essai

Précision inter-séries : 2 échantillons ont été testés 12 fois sur 2 lots différents par 3 différent opérateurs pour déterminer la précision inter-série.

Intra-série (n=5)	Enchantillon 1	Enchantillon 2	Inter-séries (n=12)	Enchantillon 1	Enchantillon 2
Moyenne (pmol/l)	3,2	10,1	Moyenne (pmol/l)	3,2	9,9
SD (pmol/l)	0,05	0,34	SD (pmol/l)	0,10	0,5
CV	2%	3%	CV	3%	5%

11) CONSEILS TECHNIQUES

- Ne pas mélanger les réactifs de lots ou de tests différents.
- Ne pas intervertir les embouts ou bouchons de réactifs différents.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date de péremption.
- Protéger les réactifs de la lumière directe du soleil.
- La solution substrat doit être incolore avant son utilisation.
- Les barrettes de microtitration doivent être recouvertes d'un film pendant les étapes d'incubation.
- Eviter de faire mousser les réactifs lors du mélange.

12) PRECAUTIONS D'EMPLOI

Les produits d'origine humaine utilisés dans ce test ont été testés contre le VIH-Ab et l'AgHbs et ont été trouvés négatifs. Cependant, les réactifs doivent être manipulés comme étant susceptibles de transmettre des maladies infectieuses.

Réactifs liquides contenant comme conservateur du Proclin en concentration $\leq 0,1\%$. Eviter tout contact avec les yeux, la peau et les muqueuses. La Procline 300 n'est pas toxique à la concentration utilisée. Cependant, des réactions allergiques sont possibles.

- Ne pas pipetter avec la bouche.
- Ne pas fumer, manger, boire ou appliquer des produits cosmétiques pendant la manipulation des réactifs.
- Porter des gants, des lunettes et des vêtements de laboratoire pendant l'exécution des tests.
- L'acide sulfurique irrite les yeux et la peau. Rincer abondamment à l'eau en cas de contact.

13) BIBLIOGRAPHIE

Voir au chapitre 13) LITERATURE dans la version anglaise de cette notice.

1) INTRODUZIONE

L'osteoprotegerina (OPG) o Osteoclast Inhibitory Factor (OCIF) è una glicoproteina appartenente alla famiglia dei recettori del TNF 11b (gene TNFRSF11B) <http://www.uniprot.org/uniprot/O00300>. L'OPG è sintetizzato come monomero di 380 amminoacidi, trasformato in omodimero all'interno delle cellule e poi viene secreto nel compartimento extracellulare principalmente come un omodimero legato disolfuro. L'OPG viene prodotto da molti tessuti e tipi di cellule differenti, compresi gli osteoblasti. L'OPG è un regolatore negativo del riassorbimento osseo agendo come recettore di richiamo per il RANKL, neutralizzandone quindi la funzione in osteoclastogenesi. Questa glicoproteina è anche coinvolta nella regolazione della calcificazione vascolare.

Aree di interesse

- Osteoporosi (1, 2)
- Malattie con aumento locale di riassorbimento osseo (3-6)
- Artrite (7, 8)
- Monitoraggio degli effetti della terapia (9, 10, 11)
- Malattie cardiovascolari (12-17)

2.) CONTENUTO DEL KIT

CONT	REATTIVI	QUANTITA
PLATE	Strip di pozzetti su telaietto pre-sensibilizzati con anticorpo policlonale anti-OPG da capra, in una busta di alluminio con desiccante	12 x 8 determinazioni
WASHBUF	Tampone per il lavaggio, concentrato 20x, tappo non colorato	1 x 50 mL
AB	Anticorpo monoclonale anti OPG da topo biotinilato, tappo verde, colore giallo, pronto per l'uso	1 x 7 mL
STD	Standard 1-6, (0; 1.25; 2.5; 5; 10; 20 pmol/L), tappo bianco, pronti per l'uso. Da utilizzare solo per campioni di siero o plasma.	6 x 300 µL
CTRL	Controllo, tappo giallo, pronto per l'uso (l'esatta concentrazione è riportata sull'etichetta)	1 x 300 µL
ASYBUF	Tampone, tappo rosso, pronto per l'uso	1 x 25 mL
CONJ	Coniugato (streptavidina- HRPO), flacone ambra, tappo ambra, pronto per l'uso	1 x 22 mL
SUB	Substrato (TMB in soluzione), flacone ambra, tappo blu, pronto per l'uso	1 x 22 mL
STOP	Soluzione di stop, tappo bianco, pronta per l'uso	1 x 7 mL

3) MATERIALE AGGIUNTIVO CONTENUTO NEL KIT

- 2 copripietra adesivi
- Protocollo QC
- Template
- Manuale per l'uso

4) MATERIALE RICHiesto MA NON TORNTO

- Micropipette con puntali monouso per dispensare 20 µL, 50 µL, 150 µL, 200 µL e 300 µL
- Acqua distillata o deionizzata
- Lavatore di micropiastre (consigliato) o, in alternativa, pipetta multicanale o dispensatore
- Frigorifero a 4°C (2-8°C)
- Lettore di micropiastre con filtri da 450 nm e filtro di riferimento da 630 nm
- Carta millimetrata o software dedicato per il calcolo dei risultati.

5) PREPARAZIONE DEL REATTIVI E DEL CAMPIONI

I reattivi contenuti nel kit sono stabili a 4°C (2-8°C) fino alla data riportata sull'etichetta di ciascun flacone.

Preparazione dei campioni

Prelevare i campioni di sangue venoso utilizzando provette standard per siero o plasma. Si consiglia di separare il siero o il plasma dalla parte corpuscolata centrifugando prima possibile i campioni, es. 20 min. a 2000 x g, preferibilmente a 4°C (2-8°C). Se ciò non fosse possibile, conservare i campioni a 4°C (2-8°C) prima della centrifugazione (fino ad un giorno). Per una stabilità prolungata nel tempo, conservare i campioni, suddivisi in aliquote, a -25°C o temperature inferiori. E' possibile congelare-scongelare i campioni fino ad un massimo di 4 volte. Campioni lipidici o emolizzati possono dare risultati non corretti. Prima del dosaggio agitare su vortex i campioni scongelati. Diluire i campioni con valori superiori allo standard a concentrazione più elevata con STD1 o siero umano con OPG negativo.

Per ulteriori informazioni sulla stabilità dei campioni si prega di visitare il sito web www.bmgrp.com (v. Technical File) o il distributore autorizzato locale.

Modalità di ricostituzione dei reattivi:

WASHBUF (tampone per il lavaggio): Diluire il tampone concentrato 1:20: ad es. 50 mL WASHBUF + 950 mL di acqua distillata. I cristalli eventualmente presenti nella soluzione concentrata si dissolvono a temperatura ambiente. Il tampone per il lavaggio diluito è stabile a 4°C (2-8°C) per un mese. Nel dosaggio usare esclusivamente WASHBUF (tampone per il lavaggio) diluito.

6) PRINCIPIO DEL METOD

Vedi capitolo 6) PRINCIPLE OF THE ASSAY delle istruzioni in lingua inglese.

7) PROTOCOLLO DEL DOSAGGIO

Portare tutti i reattivi a temperatura ambiente (18-24°C) prima dell'uso.
Segnare sul template la posizione per BLANK/STD/SAMPLE/CTRL (Bianco/Standard/Campioni/Controllo).
Togliere le strip dalla busta, utilizzare almeno un pozzetto per il bianco. Conservare a 4°C (2-8°C) le strip avanzate nella busta, chiusa accuratamente, con il dissecante. In queste condizioni le strip sono stabili fino alla data riportata sull'etichetta.
1. Aggiungere 150 µL di ASYBUF (Tampone) in tutti i pozzetti. Aggiungere altri 100 µL di ASYBUF nel bianco.
2. Aggiungere 20 µL di STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Campioni/Controlli) in duplicato nei rispettivi pozzetti, eccetto quelli per il bianco.
3. Aggiungere 50 µL di AB (anticorpo anti OPG biotinilato) in tutti i pozzetti, eccetto quelli per il bianco, agitare delicatamente.
4. Coprire con il copripiastra e incubare 4 ore a temperatura ambiente (18-24°C).
5. Aspirare e lavare 5 volte i pozzetti con 300 µL di WASHBUF diluito (tampone per il lavaggio), allontanare il tampone avanzato sul fondo dei pozzetti dopo l'ultimo lavaggio, picchiettando la micropiastra capovolta su un foglio di carta assorbente.
6. Aggiungere 200 µL di CONJ (Coniugato) in ciascun pozzetto.
7. Coprire con il copripiastra e incubare 1 ora a temperatura ambiente (18-24°C).
8. Aspirare e lavare 5 volte i pozzetti con 300 µL di WASHBUF diluito (tampone per il lavaggio), allontanare il tampone avanzato sul fondo dei pozzetti dopo l'ultimo lavaggio, picchiettando la micropiastra capovolta su un foglio di carta assorbente.
9. Aggiungere 200 µL di SUB (Substrato) in ciascun pozzetto.
10. Incubare 30 min a temperatura ambiente (18-24°C) al buio.
11. Aspirare e lavare 5 volte i pozzetti con 300 µL di STOP (Soluzione di stop) in ciascun pozzetto.
12. Misurare immediatamente l'assorbanza a 450nm con filtro di riferimento a 630 nm.

8) CALCOLO DEL RISULTATI

Leggere la densità ottica (OD) di tutti i pozzetti con un lettore di micropiastre utilizzando la lunghezza d'onda 450 nm (correzione con lunghezza d'onda 630 nm). Sottrarre l'OD del bianco da quella di STD, CTRL e campioni. Costruire la curva standard dai valori OD degli standard. Per l'elaborazione dei dati, utilizzare un programma computerizzato o carta millimetrata. Calcolare la concentrazione dei campioni da questa curva standard. Il test è stato valutato con l'interpolazione a 4 parametri. Sistemi di interpolazione differenti devono essere convalidati dagli utilizzatori. Tenere conto dei fattori di diluizione.

Typical STD-curve:

Vedi capitolo 8) CALCULATION OF RESULTS in lingua inglese.

Il foglio di controllo di qualità fornito insieme al kit, mostra i risultati ottenuti al rilascio finale di ogni kit dal Controllo di Qualità (QC). I valori di densità ottica ottenuti dagli utilizzatori possono essere differenti a causa di vari fattori e/o alla diminuzione nell'intensità del segnale derivata dal decadimento naturale del kit. In ogni caso, questo aspetto non incide sulla validità dei risultati purchè la densità ottica del calibratore con la concentrazione più alta, sia superiore a 1,50.

9) CARATTERISTICHE DEL DOSAGGIO

Valori da individui apparentemente sani:	Mediana = 2.7 pmol/L (siero, n = 60) Si raccomanda ad ogni laboratorio di stabilire i propri limiti di normalità.
Curva standard:	0 - 20 pmol/L
Fattore di conversione da pg/mL a pmol/L:	1 pg/mL = 0,05 pmol/L (MW: 19,9 kD)
Volume del campione:	20 µL di campione umano, siero, plasma EDTA, plasma Eparina, plasma citrato.
Sensibilità:	(0 pmol/L + 3 SD): 0.07 pmol/L
Tempo di incubazione:	4 h / 1 h / 30 min

Per ulteriori informazioni sulla caratteristiche del dosaggio si prega di visitare il sito web www.bmgrp.com technical file o il distributore autorizzato locale.

10) PRECISIONE

Intra-Saggio: 2 campioni a concentrazioni note di osteoprotegerina sono stati dosati 5 volte per valutare la precisione intra-saggio.

Inter-Saggio: per valutare la precisione inter-saggio, 2 campioni a concentrazioni note di osteoprotegerina sono stati dosati 12 volte da 3 operatori diversi con 2 kit di lotto differente.

Intra-Saggio (n=5)	Campione 1	Campione 2	Inter-Saggio (n=12)	Campione 1	Campione 2
Media (pmol/L)	3,2	10,1	Media (pmol/L)	3,2	9,9
SD (pmol/L)	0,05	0,34	SD (pmol/L)	0,1	0,5
CV	2%	3%	CV	3%	5%

11) CONSIDERAZIONI TECNICHE

- Non mescolare o sostituire i reattivi con altri da lotti o fonti diverse.
- Non scambiare i tappi di flaconi diversi e non usare reattivi da lotti differenti.
- Non usare i reattivi oltre la data di scadenza. Proteggere i reattivi dalla luce solare diretta.
- La soluzione del substrato deve rimanere incolore fino alla dispensazione nei pozzetti.
- Per avere risultati accurati è necessario chiudere ermeticamente le piastre con il copripiastre adesivo.
- Quando si agitano i reattivi evitare la formazione di schiuma.

12) PRECAUZIONI

Tutti i componenti di origine umana sono stati dosati per la determinazione di HIV-Ab e HBsAg e sono stati trovati negativi. Si raccomanda di manipolare e di eliminare i reattivi come potenzialmente infettivi.

I reagenti liquidi contengono una percentuale $\leq 0.1\%$ di Proclin 300 come conservante. Evitare il contatto con cute e mucose. Il Proclin 300 non è tossico alle concentrazioni usate in questo kit. Può usare reazioni cutanee allergiche - evitare contatti con cute o occhi.

- Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.
- Non mangiare, bere, fumare o utilizzare cosmetici quando si utilizzano reattivi per diagnostici.
- Quando si manipolano i reattivi utilizzare sempre guanti monouso.
- L'acido solforico è irritante per occhi e cute. Evitare il contatto con cute e mucose; il prodotto è irritante. In caso di contatto, lavare con abbondante acqua corrente.

13) BIBLIOGRAFIA

Vedi capitolo 13) LITERATURE delle istruzioni in lingua inglese.

1) INTRODUCCION

Osteoprotegerina (OPG) o Factor Inhibidor de Osteoclasto (OCIF) es una glicoproteína de la superfamilia del receptor de TNF11b (nombre del gen TNFRSF11B) <http://www.uniprot.org/uniprot/O00300>. El OPG se sintetiza como un monomero de 380 amino ácidos y se acopla como un homodímero dentro de la célula y después es secretado fundamentalmente como un homodímero con uniones disulfuro al compartimento extracelular. El OPG es producido por muchos tejidos diferentes y tipos de células incluido los osteoblastos. El OPG es un regulador negativo de la resorción de hueso que actúa como un receptor señuelo para el RANKL, neutralizando así su función en osteoclastogénesis. Esta glicoproteína está implicada también en la regulación de la calcificación vascular.

Áreas de interés:

- Osteoporosis (1, 2)
- Enfermedades con actividad de resorción local (3- 6)
- Artritis (7, 8)
- Monitorización de terapia (9, 10, 11)
- Enfermedad cardiovascular (12-17)

2.) CONTENIDO DEL KIT

CONT	COMPONENTES DEL KIT	CANTIDAD
PLACA	Anticuerpo policlonal de cabra antiOPG, microtiras recubiertas contenidas en un marco de tiras, embaladas en una bolsa de aluminio con desecante.	12 x 8 tests
WASHBUF	Tampón de lavado concentrado 20x, tapón transparente	1 x 50 ml
AB	Anticuerpo anti OPG monoclonal de ratón, marcado con biotina, tapón verde, solución de color amarillo, listo para su uso.	1 x 7 ml
STD	Estándares 1-6, (0; 1.25; 2.5; 5; 10; 20 pmol/l), tapón blanco, listos para usar: Únicamente para usar con muestras de suero y plasma.	6 x 300 µl
CTRL	Control, tapón amarillo, listo para usar (concentración exacta en el vial). Únicamente para usar con muestras de suero y plasma.	1 x 300 µl
ASYBUF	Tampón de ensayo, tapón rojo, listo para usar	1 x 25 ml
CONJ	Conjugado (estreptavidina- HRPO), botella ámbar, tapón ambar, listo para usar	1 x 22 ml
SUB	Substrato (solución de TMB), botella ambar, tapón azul, listo para usar	1 x 22 ml
STOP	Solución de parada, tapón blanco, lista para usar	1 x 7 ml

3) MATERIAL ADICIONAL INCLUIDO EN EL KIT

- 2 tiras adhesivas de plástico
- Protocolo de control de calidad.
- Hoja con el esquema de la placa
- Manual de instrucciones

4) MATERIAL Y EQUIPAMIENTO REQUERIDO PERO NO SUMINISTRADO

- Pipetas de precisión calibradas para dispensar 20 µl, 50 µl, 150 µl, 200 µl, 300 µl y puntas desechables
- Agua destilada y desionizada.
- Lavador de placas se recomienda para el lavado, pipeta multicanal ó un dispensador.
- Refrigerador a 4°C (2-8°C)
- Lector de ELISA capaz de medir la absorbancia a 450 nm (con corrección de lectura a 630 nm)
- Papel gráfico o software para el cálculo de los resultados.

5) PREPARACION DE LOS REACTIVOS Y DE LAS MUESTRAS

Todos los reactivos en el kit son estables a 4°C (2-8°C) hasta la fecha de caducidad establecida en la etiqueta de cada reactivo.

Preparación de las muestras:

Recoge muestras de sangre venosa utilizando tubos de recolección de sangre estandarizados para suero o plasma. Recomendamos realizar la separación del suero o plasma por centrifugación tan pronto como sea posible (ej: 20 min a 2000g, preferiblemente a 4°C (2-8°C)). Si esto no es posible almacenar las muestras a 4°C (2-8°C) antes de la centrifugación (hasta un día).

Las muestras de suero o plasma así obtenidas deberán medirse tan pronto como sea posible. Para almacenamientos más prolongados, alicuotar las muestras y almacenarlas a -25°C o más bajo. Las muestras son estables al menos durante 4 ciclos de congelación-descongelación. Muestras lipémicas o hemolizadas pueden dar lugar a resultados erróneos. Las muestras deberán ser mezcladas bien antes del ensayo. Las muestras con valores por encima del estándar más alto se pueden diluir con el STD1 o con suero humano negativo a OPG

Para información adicional sobre estabilidad de la muestra por favor visite nuestra página web www.bmgrp.com (ver Technical File) o contacte con nuestro Servicio al cliente por e-mail export@bmgrp.com o por teléfono +43/1/29107-45.

Reconstituir como se indica:

WASHBUF (Tampón de lavado): Diluir el concentrado 1:20 con agua destilada (e.g. 50 ml WASHBUF + 950 ml agua destilada). Los cristales en el tampón de concentrado pueden disolverse a temperatura ambiente. El tampón de lavado diluido es estable a 4°C (2-8°C) durante 1 mes. Únicamente usar Washbuffer diluido para el procedimiento de ensayo.

6) PRINCIPIO DEL ENSAYO

Ver capítulo 6) PRINCIPLE OF THE ASSAY de la versión inglesa del manual de instrucciones del ensayo.

7) PROTOCOLO DEL ENSAYO

Todos los reactivos y las muestras deben alcanzar la temperatura ambiente (18-24°C) antes de su utilización en el ensayo.
Marcar la posición de BLAN/STD/MUES/CTRL (Blanco/Estándar/muestra/Control) en la hoja del esquema de la placa.
Sacar las tiras de la bolsa de aluminio, emplear como mínimo un pocillo como blanco. Almacenar las tiras no utilizadas en la bolsa de aluminio con desecante a 4°C (2-8°C). Las tiras son estables hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta.
1. Añadir 150 µl de ASYBUF (tampón de ensayo) en cada pocillo. Añadir 100 µl adicionalmente en cada blanco.
2. Añadir 20 µl de STD/MUESTRA/CTRL (Estándar/Muestra/Control) en duplicado en sus pocillos correspondientes, excepto el blanco.
3. Añadir 50 µl de anticuerpo AB (biotinilado anti OPG) en cada pocillo, excepto el blanco, agitar suavemente con movimiento circular.
4. Tapar con cuidado e incubar 4 h a temperatura ambiente (18-24°C)
5. Aspirar y lavar los pocillos 5x con 300 µl de WASHBUF diluido (Tampón de lavado), eliminar el WASHBUF remanente golpeando la placa suavemente sobre papel absorbente después del último lavado.
6. Añadir 200 µl de CONJ (Conjugado) a cada pocillo.
7. Tapar con cuidado e incubar a temperatura ambiente (18-24°C) durante 1 hora.
8. Aspirar y lavar los pocillos 5x con 300 µl de WASHBUF diluido (tampón de lavado), eliminar el WASHBUF remanente golpeando la placa suavemente sobre papel absorbente después del último lavado.
9. Añadir 200 µl de SUB (Substrato) en cada pocillo.
10. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-24°C) en oscuridad.
11. Añadir 50 µl de solución de parada (Stop solution) a cada pocillo.

12. Medir la absorbancia inmediatamente a 450 nm y utilizar como referencia un filtro de 630 nm, si está disponible.

8) CALCULO DE RESULTADOS

Leer la densidad óptica (OD) de todos los pocillos en un lector de placas usando una longitud de onda de 450 nm (corrección de longitud de onda a 630 nm). Restar el valor del blanco a los valores de los STD, CTRL y muestras. Realizar una curva estándar a partir de los valores de las absorbancias de los estándares. Utilizar un programa informático o un papel de representación gráfica. Obtener el valor de la concentración de la muestra a partir de la curva estándar. El ensayo fue evaluado con un algoritmo de 4 PL. Los distintos métodos de ajuste de curvas empleados deben ser evaluados por el usuario. Se deben de considerar distintos factores de dilución.

Typical STD-curve:

Ver capítulo 8) CALCULATION OF RESULTS de la versión inglesa del manual de instrucciones del ensayo.

El certificado del control de calidad que se suministra con el kit muestra los resultados del último control de calidad para cada kit en la fecha de producción. Los datos de la densidad óptica obtenidos por los clientes pueden diferir debido a diversos factores y/o debido a una disminución normal de la intensidad de la señal lo largo de la vida media. Sin embargo, esto no afecta a la validez de los resultados siempre que se obtenga un valor de 1,5 para la densidad óptica del estándar de concentración más elevada y que el valor del CTRL se encuentre en rango (rango del valor diana se encuentra en la etiqueta).

9) CARACTERISTICAS DEL ENSAYO

Valores de individuos aparentemente sanos	Mediana = 2,7 pmol/l (suero, n = 60) Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango de normalidad.
Rango estandar	0 a 20 pmol/l
Factor de conversion de pg/ml a pmol/l:	1 pg/ml = 0.05 pmol/l (MW: 19,9 kD)
Volumen de muestra:	20 µl plasma EDTA humano, plasma heparinizado, plasma citrato, suero
Limite de detección	(0 pmol/l + 3 SD): 0.07 pmol/l
Tiempo de incubación:	4 h / 1 h / 30 min

Para más información en las características del ensayo por favor visite nuestra página web www.bmgrp.com (ver Technical File) o contacte con nuestro servicio de atención al cliente por e-mail export@bmgrp.com o por teléfono +43/1/29107-45.

10) PRECISION

Intra-Ensayo: Para valorar la precisión intra-ensayo se analizaron 5 replicados de 2 muestras de concentraciones conocidas

Inter-Ensayo: Para valorar la precisión inter-ensayo se analizaron 2 muestras de concentraciones conocidas en 12 ensayos en 2 lotes de kit diferentes por 3 operadores diferentes para evaluar la precisión inter-ensayo.

Intra-Ensayo (n=5)	Muestra 1	Muestra 2
Media (pmol/l)	3,2	10,10
SD (pmol/l)	0,05	0,34
CV	2%	3%

Inter-Ensayo (n=12)	Muestra 1	Muestra 2
Media (pmol/l)	3,2	9,9
SD (pmol/l)	0,1	0,5
CV	3%	5%

11) OBSERVACIONES TECNICAS

- No mezclar o sustituir reactivos de diferentes lotes ofabricantes.
- No mezclar los tapones de los viales de diferentes reactivos o de reactivos de diferentes lotes.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad. Proteger los reactivos de la acción directa de la luz solar.
- La solución de sustrato debería permanecer incolora hasta que se añada a la placa.
- Para asegurar unos resultados más exactos, tapar la placa con el papel adhesivo durante los pasos de incubación.
- Evitar la formación de espuma al mezclar los reactivos.

12) PRECAUCIONES

Todos los componentes de procedencia humana fueron testados frente a la presencia de anticuerpos HIV y al antígeno de superficie de la Hepatitis B; con resultado negativo. Sin embargo, deberían manipularse y eliminarse como si se tratara de material potencialmente infeccioso.

Los reactivos líquidos contienen $\leq 0.1\%$ de Proclin 300 como conservante. Evitar el contacto con la piel ó con las membranas mucosas. La Proclina 300 no es tóxica en las concentraciones empleadas en este kit. Puede provocar reacciones alérgicas en la piel, evitar el contacto con la piel ó los ojos.

- No pipetear con la boca.
- No comer o beber o aplicarse cosméticos en las zonas de manipulación de los reactivos.
- Evitar el contacto con los reactivos utilizando guantes.
- El ácido sulfúrico es irritante para los ojos y la piel. Enjuagar con abundante agua si se produce contacto. Evitar el contacto con la piel y con las membranas mucosas . Puede presentarse irritación. Si tine lugar un contacto, enjuagar con abundante agua.

13) LITERATURA

Ver capítulo 13) LITERATURE de la versión inglesa del manual de instrucciones del ensayo.

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 / Referencennummer / 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 / Opbevares mellem / Förvaras vid / Przechowywać w / Tároljuk között / Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí



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 / Indeholder 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. Pipette additional 100 µl into well marked as blank.
- Step 2) Add 20 µl STD/SAMPLE/CTRL (standard/sample/control) into all wells, except blank.
- Step 3) Add 50 µl AB (biotinylated anti OPG ab, green cap) into each well, except blank, swirl gently.
- Step 4) Cover tightly and incubate for 4h 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 hour 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.
- Step 12) Read Optical Density at 450 nm with reference 630 nm, if available.