

Arbeitsanleitung / Manual

*Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal /
For professional use only*

IDK[®] Osteoprotegerin ELISA

***Zur in-vitro-Bestimmung von OPG
in humanem Serum und Plasma***

***For the in vitro determination of OPG
in human serum and plasma***

Gültig ab / Valid from 2023-09-01

REF K 1017

Σ
96

+8°C
+2°C

IVD

CE



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	2
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
<i>Vorbereitung der Standards</i>	4
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	5
<i>Probennahme und Probenlagerung</i>	5
<i>Probenverdünnung</i>	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	8
9. EINSCHRÄNKUNGEN	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	9
<i>Referenzwerte</i>	9
11. TESTCHARAKTERISTIKA	10
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	10
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	11
<i>Linearität</i>	12
<i>Analytische Sensitivität</i>	12
12. ENTSORGUNG	13
13. VORSICHTSMASSNAHMEN	13
14. TECHNISCHE MERKMALE	14
15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	14
16. LITERATUR	15

1. VERWENDUNGSZWECK

Der IDK® Osteoprotegerin ist ein Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) für den quantitativen Nachweis von Osteoprotegerin aus humanem Serum und Plasma. Der Assay kann manuell oder mit einer automatisierten Plattform verwendet werden. Dieser Assay ist ein *in-vitro*-Diagnostikum und für die Verwendung durch professionelles Fachpersonal in Laborumgebung bestimmt.

2. EINLEITUNG

Osteoprotegerin (OPG) oder Osteoclast inhibitory factor (OCIF) ist ein Glykoprotein der TNF-Rezeptor-Superfamilie 11b (Gen Name TNFRSF11B - <http://www.uniprot.org/uniprot/O00300>). OPG wird als Monomer von 380 Aminosäuren synthetisiert, als Homodimer in der Zelle zusammengesetzt, und dann hauptsächlich als Disulfid-verknüpftes Homodimer in den extrazellulären Raum sekretiert. OPG wird von vielen verschiedenen Geweben und Zelltypen, einschließlich Osteoblasten, produziert.

OPG ist ein negativer Regulator der Knochenresorption, indem es als Decoy-Rezeptor für RANKL fungiert und damit dessen Funktion in der Osteoklastogenese neutralisiert. Dieses Glykoprotein ist auch an der Regulation der Gefäßverkalkung beteiligt.

Indikationen

- Osteoporose ^{1,2}
- Krankheiten mit lokal induzierter Knochenresorptionsaktivität ³⁻⁶
- Arthritis ^{7,8}
- Therapieüberwachung ⁹⁻¹¹
- Kardiovaskuläre Krankheiten ¹²⁻¹⁷

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 1017	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml
K 1017	AB	Detektionsantikörper, gebrauchsfertig	1 x 11 ml

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 1017	CONJ	Konjugatkonzentrat, gebrauchsfertig; peroxidase markiert	1 x 11 ml
K 1017	STD	Standard, lyophilisiert (Konzentrationen der Produktspezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 1017	CTRL1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Produktspezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 1017	CTRL2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Produktspezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 1017	SAMDIL	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser (Leitfähigkeit $\leq 0,055 \mu\text{S}/\text{cm}$ bei 25°C , Partikelgröße $\leq 0,2 \mu\text{m}$)
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von $10\text{--}1\,000 \mu\text{l}$
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Zum Waschen wird ein Washer für Mikrotiterplatten empfohlen, alternativ Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer,
- Mikrotiterplattenschüttler (z.B. Modell Shake ID2 erhältlich bei Immunodiagnostik AG)
- Zentrifuge, $3\,000\text{g}$
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz an zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Das bei **2–8°C** gelagerte **WASHBUF** kann bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8°C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Der **lyophilisierte Standard (STD)** und die **lyophilisierten Kontrollen (CTRL)** sind, bei **2–8°C** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. STD und CTRL werden mit **500 µl Reinstwasser** rekonstituiert und kurz geschwenkt, um eine vollständige Rekonstitution zu gewährleisten. Sie werden zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. **Standards und Kontrollen** (rekonstituierte STD und CTRL) **sind nicht stabil und können nicht gelagert werden**.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8°C** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

Vorbereitung der Standards

1.	Standard 6: OPG (rekonstituierter STD)
2.	Standard 5: 200 µl Standard 6 zu 400 µl SAMDIL pipettieren, gut mischen
3.	Standard 4: 200 µl Standard 5 zu 400 µl SAMDIL pipettieren, gut mischen
4.	Standard 3: 200 µl Standard 4 zu 400 µl SAMDIL pipettieren, gut mischen
5.	Standard 2: 200 µl Standard 3 zu 400 µl SAMDIL pipettieren, gut mischen
6.	Standard 1: SAMDIL

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Probennahme und Probenlagerung

- Venöse Blutproben unter Verwendung von standardisierten Blutentnahmeröhrchen für Serum oder Plasma entnehmen. Wir empfehlen die Probenauftrennung durch Zentrifugation so schnell wie möglich durchzuführen (z. B. 20 min bei 2000 g, vorzugsweise bei 4 °C (2–8 °C). Falls dies nicht möglich ist, die Proben vor der Zentrifugation bei 4 °C (2–8 °C) lagern (bis zu einem Tag).
- Die gewonnenen Serum-/Plasmaproben sollten so bald wie möglich gemessen werden. Sie können bis zu 8 Stunden bei 2–8 °C gelagert werden. Für eine längere Lagerung die Proben aliquotieren und bei **-20 °C** oder niedriger für bis zu **4 Monate** lagern. Die Proben sind mindestens 4 Gefrier-Auftau-Zyklen lang stabil. Lipämische oder hämolysierte Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Die Proben sollten vor der Analyse gut gemischt werden.

Probenverdünnung

Serum und Plasma

EDTA-Plasma- oder Serumproben werden vor dem Einsatz im Test **1:10** verdünnt, z. B. **25 µl** Probe + **225 µl** Probenverdünnungspuffer (SAMDIL), gut mischen. **100 µl** der Verdünnung werden pro Vertiefung im Test eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von Osteoprotegerin (OPG).

Der Assay verwendet die „Sandwich-Technik“ mit spezifischen Antikörper gegen OPG. In diesem Assay wird OPG aus den Standards bzw. den Proben an den monoklonalen Maus-anti-OPG Antikörper gebunden, mit dem die Mikrotiterplatte beschichtet ist. Danach wird ein biotinylierter polyklonaler OPG-Antikörper zugegeben.

Im nächsten Schritt folgt die Zugabe von Streptavidin-Peroxidase-Konjugat, sodass sich ein „Sandwich“ mit folgendem Aufbau bildet:

Antikörper – OPG – biotinyliertem Antikörper – Streptavidin-Peroxidase-Konjugat

Tetramethylbenzidin (TMB) wird als Peroxidase-Substrat genutzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist proportional zur Konzentration des gemessenen Analyten.

Anhand der hergestellten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

Vor Gebrauch **alle Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (15–30°C) bringen, gut mischen.

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8°C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	100 µl Standards/Kontrollen/verdünnte Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
2.	Streifen abdecken und 1 Stunden bei Raumtemperatur (15–30°C) auf dem Mikrotiterplattenschüttler inkubieren.
3.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
4.	100 µl Detektionsantikörper (AB) in jede Vertiefung pipettieren.
5.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30°C) auf dem Mikrotiterplattenschüttler inkubieren.

6.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
7.	100 µl Konjugat (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
8.	Streifen abdecken und 30 min bei Raumtemperatur (15–30°C) auf dem Mikrotiterplattenschüttler inkubieren.
9.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
10.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
11.	10–20 min* bei Raumtemperatur (15–30°C) im Dunkeln inkubieren.
12.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
13	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

* Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen, den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Bei automatisierter Abarbeitung dürfen unter Wahrung der jeweiligen Verdünnungen die Volumina von Proben und Verdünnern skaliert werden. Gerätespezifische Minimal- und Maximalvolumina sind zu beachten. Die Homogenität der resultierenden Verdünnung ist zu gewährleisten.

Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0,001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Serum und Plasma

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 10** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

$$\frac{\text{höchste Konzentration der Standardkurve} \times \text{anzuwendender Probenverdünnungsfaktor}}{\text{Probenverdünnungsfaktor}}$$

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

$$\text{LoB} \times \text{anzuwendender Probenverdünnungsfaktor}$$

LoB siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren und dabei den Probentyp nicht zu ändern.

Anhand einer laborinternen Studie, mit Proben von augenscheinlich Gesunden, wurden folgende Werte ermittelt:

Plasma (n = 82): 6,135 pmol/l

Serum (n = 82): 4,710 pmol/l

Männlich

Alter	OPG (Mittelwert ± SD)		OPG (Median, Bereich)		n
	Plasma [pmol/L]	Serum [pmol/L]	Plasma [pmol/L]	Serum [pmol/L]	
< 30	4,70 ± 1,003	3.30 ± 0.828	4,79 ± 1,003	3,54 ± 0,828	10
31–40	4,93 ± 1,603	3.68 ± 0.872	4,90 ± 1,603	3,44 ± 0,872	11
41–50	5,05 ± 2,184	4.64 ± 1.617	4,69 ± 2,184	5,03 ± 1,617	10
51–60	5,66 ± 1,752	4.05 ± 1.146	5,82 ± 1,752	4,36 ± 1,146	11

Weiblich

Alter	OPG (Mittelwert ± SD)		OPG (Median, Bereich)		n
	Plasma [pmol/L]	Serum [pmol/L]	Plasma [pmol/L]	Serum [pmol/L]	
< 30	6,62 ± 2,895	5,63 ± 2,511	5,49 ± 2,895	4,97 ± 2,511	14
31–40	9,35 ± 4,043	5,05 ± 0,645	7,85 ± 4,043	4,80 ± 0,645	4
41–50	7,48 ± 2,655	5,10 ± 2,100	7,28 ± 2,655	4,46 ± 2,100	13
51–60	6,67 ± 1,97	6,10 ± 2,392	6,48 ± 1,97	6,73 ± 2,392	9

Umrechnungsfaktor (MW: 19,9 kDa)

1 pg/ml = 0,05 pmol/l

11. TESTCHARAKTERISTIKA*Genauigkeit – Präzision***Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 42**

Die Wiederholbarkeit wurde mit 2 Proben unter **gleichbleibenden** Bedingungen (Bediener, Messgerät, Tag, Kitcharge identisch) bestimmt.

Probe	Mittelwert [pmol/l]	VK [%]
1	6,14	8,6
2	4,72	8,3

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 48

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 4 Proben unter **variablen** Bedingungen (Bediener, Messgeräte, Tage, Kitchargen unterschiedlich) bestimmt.

Probe	Mittelwert [pmol/l]	VK [%]
1	0,90	4,1
2	1,61	3,1
3	2,30	3,0
4	3,61	5,2

Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. Je 2 Seren und Plasmen wurden dafür mit bekannten Osteoprotegerin-Konzentrationen versetzt und gemessen.

Probe	Spike [pmol/l]	Erwartet [pmol/l]	Gemessen [pmol/l]	Wiederfindung [%]
Serum 1	0	0,81	0,81	100
	0,03	0,84	0,78	92,1
	0,09	0,91	0,95	104,7
	0,30	1,11	1,07	96,1
	2,70	3,51	2,73	77,9
Serum 2	0	0,57	0,57	100,0
	0,03	0,61	0,55	90,5
	0,09	0,67	0,59	88,1
	0,30	0,87	0,70	80,0
	2,70	3,27	4,01	122,6
Plasma 1	0	1,21	1,21	100
	0,03	1,24	1,11	89,1
	0,09	1,31	1,27	96,9
	0,3	1,51	1,45	96,1
	0,9	2,11	1,96	92,7
	2,7	3,91	3,48	89,1
	8,1	9,31	7,71	82,8
Plasma 2	0	1,02	1,02	100
	0,03	1,06	1,05	99,4
	0,09	1,12	1,23	109,8
	0,3	1,32	1,39	105,3
	0,9	1,92	1,95	101,4
	2,7	3,72	3,47	93,1
	8,1	9,12	7,84	85,9

Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern.

Für OPG wurde ein lineares Verhalten im Bereich von 0,455 bis 8,414 pmol/l nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als $\pm 20\%$.

Probe	Verdünnung	Erwartet [pmol/l]	Gemessen [pmol/l]	Wiederfindung [%]
A	1:4	8,41	8,41	100,0
	1:8	4,21	4,32	102,6
	1:16	2,10	2,48	117,9
	1:32	1,05	1,47	139,6
	1:64	0,53	0,84	160,2
	1:128	0,26	0,46	173,0
B	1:5	9,31	9,31	100,0
	1:10	4,66	4,36	93,6
	1:20	2,33	2,54	109,0
	1:40	1,16	1,50	129,2
	1:80	0,58	0,84	144,1
	1:160	0,29	0,43	149,3
C	1:4	4,86	4,86	100,0
	1:8	2,43	2,22	91,4
	1:16	1,21	1,16	95,9
	1:32	0,61	0,62	102,8
	1:64	0,30	0,31	103,1
	1:128	0,15	0,13	83,0

Analytische Sensitivität

Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Leerwert (<i>limit of blank</i> , LoB)	0,100 pmol/l
Nachweisgrenze (<i>limit of detection</i> , LoD)	0,175 pmol/l
Bestimmungsgrenze (<i>limit of quantitation</i> , LoQ)	0,175 pmol/l

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP17-A2 durchgeführt. Das festgelegte Präzisionsziel für die Bestimmungsgrenze lag bei 20% VK.

12. ENTSORGUNG

Flüssige Testbestandteile, Mikrotiterplatten und Gefäße sind, falls nicht anders angegeben, wie gewöhnlicher Laborabfall zu behandeln. Proben und andere potenziell infektiöse Materialien müssen entsprechend den behördlichen Vorschriften entsorgt werden.

13. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind gesundheitsgefährdend und umweltschädlich. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen können zu Haut- und/oder Atemwegsreizungen führen. Jeder Kontakt mit den Substanzen ist zu vermeiden. Weiterführende Sicherheitsinformationen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen, welches Sie auf Anfrage bei der Immundiagnostik AG erhalten.
- Das 10x Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können.

Achtung: Verursacht schwere Augenreizung. **BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN:** Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

14. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST













- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- *IDK®* ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

16. LITERATUR

1. Szulc, P. et al., 2011. Cortical bone status is associated with serum osteoprotegerin concentration in men: the STRAMBO study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **96**(7), pp.2216–26.
2. Samelson, E.J. et al., 2008. Increased plasma osteoprotegerin concentrations are associated with indices of bone strength of the hip. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **93**(5), pp.1789–95.
3. Terpos, E. et al., 2009. The clinical significance of serum markers of bone turnover in NSCLC patients: surveillance, management and prognostic implications. *Anti-cancer research*, **29**(5), pp.1651–7.
4. Madarász, E. et al., 2009. Osteoprotegerin levels in women with prior gestational diabetes mellitus. *Diabetes care*, **32**(1), p.e5.
5. Kearns, A.E., Khosla, S. & Kostenuik, P.J., 2008. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocrine reviews*, **29**(2), pp.155–92.
6. Pepene, C.E. et al., 2011. Circulating osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor κ B ligand in polycystic ovary syndrome: relationships to insulin resistance and endothelial dysfunction. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, **164**(1), pp.61–8.
7. Van Tuyl, L.H.D. et al., 2010. Baseline RANKL:OPG ratio and markers of bone and cartilage degradation predict annual radiological progression over 11 years in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, **69**(9), pp.1623–8.
8. Anastasilakis, A.D. et al., 2008. Acute changes in serum osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor-kappaB ligand levels in women with established osteoporosis treated with teriparatide. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, **158**(3), pp.411–5.
9. Faienza, M.F. et al., 2009. Osteoclastogenesis in children with 21-hydroxylase deficiency on long-term glucocorticoid therapy: the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand/osteoprotegerin imbalance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **94**(7), pp.2269–76.
10. Park, J.S. et al., 2011. Effect of pioglitazone on serum concentrations of osteoprotegerin in patients with type 2 diabetes mellitus. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, **164**(1), pp.69–74.
11. Nybo, M. et al., 2011. Rosiglitazone decreases plasma levels of osteoprotegerin in a randomized clinical trial with type 2 diabetes patients. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, **109**(6), pp.481–5.

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

Verwendete Symbole:

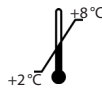
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Reizend

IDK[®] Osteoprotegerin ELISA

*For the in vitro determination of OPG
in human serum and plasma*

Valid from 2023-09-01

REF K 1017



IVD



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	20
2. INTRODUCTION	20
3. MATERIAL SUPPLIED	20
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	21
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	21
<i>Preparation of standards</i>	22
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	22
<i>Sample collection and sample storage</i>	22
<i>Dilution of samples</i>	23
7. ASSAY PROCEDURE	23
<i>Principle of the test</i>	23
<i>Test procedure</i>	24
8. RESULTS	25
9. LIMITATIONS	26
10. QUALITY CONTROL	26
<i>Reference range</i>	26
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	27
<i>Accuracy – Precision</i>	27
<i>Accuracy – Trueness</i>	28
<i>Linearity</i>	29
<i>Analytical Sensitivity</i>	30
12. DISPOSAL	30
13. PRECAUTIONS	31
14. TECHNICAL HINTS	31
15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	32
16. REFERENCES	32

1. INTENDED USE

IDK® Osteoprotegerin is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantitative determination of osteoprotegerin in human serum and plasma. The assay is an *in vitro* diagnostic medical device and intended to be used by professional users in a laboratory environment. It can be performed manually or using an automated platform. The assay serves for detection of osteoprotegerin.

2. INTRODUCTION

Osteoprotegerin (OPG) or osteoclast inhibitory factor (OCIF) is a glycoprotein of the TNF receptor superfamily 11b (gene name TNFRSF11B - <http://www.uniprot.org/uniprot/O00300>). OPG is synthesised 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 neutralising its function in osteoclastogenesis. This glycoprotein is also involved in the regulation of vascular calcification.

Indications:

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

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 1017	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml
K 1017	AB	Detection antibody, ready-to-use	1 x 11 ml
K 1017	CONJ	Conjugate, ready-to-use, peroxidase-labelled	1 x 11 ml

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 1017	STD	Standard, lyophilised (see specification data sheet for concentrations)	4 x 1 vial
K 1017	CTRL1	Control, lyophilised (see specification data sheet for range)	4 x 1 vial
K 1017	CTRL2	Control, lyophilised (see specification data sheet for range)	4 x 1 vial
K 1017	SAMDIL	Sample dilution buffer, ready-to-use	1 x 100 ml
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water (Conductivity $\leq 0.055 \mu\text{S}/\text{cm}$ at 25°C , particle size $\leq 0.2 \mu\text{m}$)
- Precision pipettes and pipette tips for single use with variable volumes from 10–1 000 μl
- Plate washer is recommended for washing, alternatively multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3 000 g
- Vortex
- Horizontal microtiter plate shaker (for example model Shake ID2 available at Immundiagnostik AG)
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** 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.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37°C. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 1 month**.
- The **lyophilised standard (STD)** and **controls (CTRL)** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2–8 °C**. Before use, the STD and CTRL have to be reconstituted with **500 µl of ultrapure water** and mixed by gentle inversion to ensure complete reconstitution. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and then mix thoroughly. **Standards and controls** (reconstituted STD and CTRL) **are not stable and cannot be stored**.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents can be used until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C**.

Preparation of standards

1.	Standard 6: reconstituted STD
2.	Standard 5: add 200 µl standard 6 to 400 µl SAMDIL, mix well
3.	Standard 4: add 200 µl of standard 5 to 400 µl SAMDIL, mix well
4.	Standard 3: add 200 µl of standard 4 to 400 µl SAMDIL, mix well
5.	Standard 2: add 200 µl of standard 3 to 400 µl SAMDIL, mix well
6.	Standard 1: SAMDIL

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Sample collection and sample storage

- Collect venous blood samples by using standardised blood collection tubes for serum or plasma. We recommend performing sample separation by centrifugation as soon as possible (e.g. 20 min at 2000 *g*, preferably at 4°C (2–8°C)). If this is not possible, store the samples at 4°C (2–8°C) prior to centrifugation (up to one day).

- The acquired serum/plasma samples should be measured as soon as possible. Samples can be stored at 2–8 °C for up to 8 hours. For longer storage aliquot samples and store at -20 °C or lower for up to 4 months. 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.

Dilution of samples

Serum and plasma

Plasma or serum samples must be diluted 1:10 before performing the assay,

e.g. **25 µl** sample + **225 µl** sample dilution buffer (SAMDIL), mix well.

For analysis, pipet **100 µl** of **dilution** per well.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of osteoprotegerin (OPG): The assay utilises the “sandwich” technique with specific antibodies against OPG. Standards, controls and samples which are assayed for OPG are added into the wells of a microtiterplate coated with monoclonal mouse-anti-OPG-antibody. During the first incubation step, OPG is bound by the immobilised primary antibody. Then a biotinylated polyclonal OPG-antibody is added into each microtiter well. In the next step, the streptavidin-peroxidase-conjugate is added and a “sandwich” of 1st antibody – OPG - biotinylated antibody – streptavidin-peroxidase-conjugate is formed.

Tetramethylbenzidine is used as peroxidase substrate. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The colour changes from blue to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the concentration of OPG.

A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. standard concentration is generated, using the values obtained from the standard. OPG, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

Test procedure

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

Mark the positions of standards/controls/samples on a protocol sheet.

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

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Add each 100 µl standards/controls/diluted samples into the respective wells.
2.	Cover the strips and incubate for 1 hours at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker.
3.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
4.	Add 100 µl detection antibody (AB) into each well.
5.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker.
6.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
7.	Add 100 µl conjugate (diluted CONJ) into each well.
8.	Cover the strips and incubate for 30 minutes at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker.
9.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
10.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
11.	Incubate for 10–15 min* at room temperature (15–30 °C) in the dark .

12.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.
13.	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 (or 690 nm) as a reference.

* The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour change and stopping the reaction upon good differentiation.

In the case of automated processing of the test, automation-specific adaptations of the procedure may be necessary in order to meet the respective technical conditions. In the case of automated processing, the volumes of samples and diluents may be scaled while maintaining the respective dilutions. Instrument-specific minimum and maximum volumes must be observed. The homogeneity of the resulting dilution must be ensured.

For support and queries please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the "4 parameter algorithm".

1. 4 parameter algorithm

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

2. Point-to-point calculation

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

3. Spline algorithm

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

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

Serum and plasma samples

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 10** to get the actual concentrations.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result by the dilution factor used.

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) can be further diluted and re-assayed. Please consider this higher dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range (see definition below) cannot be clearly quantified.

The upper limit of the measurement range can be calculated as:

highest concentration of the standard curve × sample dilution factor to be used

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

LoB × sample dilution factor to be used

LoB see chapter "Performance Characteristics".

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

Reference range

We recommend that each laboratory establish its own reference range and do not change the sample type.

From internal laboratory study, with samples from apparently healthy individuals, the following values were determined:

Plasma (n = 82):	6.135 pmol/l
Serum (n = 82):	4.710 pmol/l

Male

Age	OPG (mean ± SD)		OPG (median, Bereich)		n
	Plasma [pmol/L]	Serum [pmol/L]	Plasma [pmol/L]	Serum [pmol/L]	
< 30	4.70 ± 1.003	3.30 ± 0.828	4.79 ± 1.003	3.54 ± 0.828	10
31–40	4.93 ± 1.603	3.68 ± 0.872	4.90 ± 1.603	3.44 ± 0.872	11
41–50	5.05 ± 2.184	4.64 ± 1.617	4.69 ± 2.184	5.03 ± 1.617	10
51–60	5.66 ± 1.752	4.05 ± 1.146	5.82 ± 1.752	4.36 ± 1.146	11

Female

Age	OPG (mean ± SD)		OPG (median, Bereich)		n
	Plasma [pmol/L]	Serum [pmol/L]	Plasma [pmol/L]	Serum [pmol/L]	
< 30	6.62 ± 2.895	5.63 ± 2.511	5.49 ± 2.895	4.97 ± 2.511	14
31–40	9.35 ± 4.043	5.05 ± 0.645	7.85 ± 4.043	4.80 ± 0.645	4
41–50	7.48 ± 2.655	5.10 ± 2.100	7.28 ± 2.655	4.46 ± 2.100	13
51–60	6.67 ± 1.97	6.10 ± 2.392	6.48 ± 1.97	6.73 ± 2.392	9

Conversion factor (MW: 19.9 kDa)

1 pg/ml = 0.05 pmol/l

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS*Accuracy – Precision***Repeatability (Intra-Assay); n = 42**

The repeatability was assessed with 2 samples under **constant** parameters (same operator, instrument, day and kit lot).

Sample	Mean value [pmol/l]	CV [%]
1	6.14	8.6
2	4.72	8.3

Reproducibility (Inter-Assay); n = 48

The reproducibility was assessed with 4 samples under **varying** parameters (different operators, instruments, days and kit lots).

Sample	Mean value [pmol/l]	CV [%]
1	0.90	4.1
2	1.61	3.1
3	2.30	3.0
4	3.61	5.2

Accuracy – Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, osteoprotegerin spikes with known concentrations were added to each of 2 different serum and plasma samples.

Sample	Spike [pmol/l]	Expected [pmol/l]	Obtained [pmol/l]	Recovery [%]
Serum 1	0	0.81	0.81	100.0
	0.03	0.84	0.78	92.1
	0.09	0.91	0.95	104.7
	0.30	1.11	1.07	96.1
	2.70	3.51	2.73	77.9
Serum 2	0	0.57	0.57	100.0
	0.03	0.61	0.55	90.5
	0.09	0.67	0.59	88.1
	0.30	0.87	0.70	80.0
	2.70	3.27	4.01	122.6

Sample	Spike [pmol/l]	Expected [pmol/l]	Obtained [pmol/l]	Recovery [%]
Plasma 1	0	1.21	1.21	100.0
	0.03	1.24	1.11	89.1
	0.09	1.31	1.27	96.9
	0.3	1.51	1.45	96.1
	0.9	2.11	1.96	92.7
	2.7	3.91	3.48	89.1
	8.1	9.31	7.71	82.8
Plasma 2	0	1.02	1.02	100.0
	0.03	1.06	1.05	99.4
	0.09	1.12	1.23	109.8
	0.3	1.32	1.39	105.3
	0.9	1.92	1.95	101.4
	2.7	3.72	3.47	93.1
	8.1	9.12	7.84	85.9

Linearity

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range.

For OPG, the method has been demonstrated to be linear from 0.455 to 8.414 pmol/l, showing a non-linear behaviour of less than $\pm 20\%$ in this interval.

Sample	Dilution	Expected [pmol/l]	Obtained [pmol/l]	Recovery [%]
A	1:4	8.41	8.41	100.0
	1:8	4.21	4.32	102.6
	1:16	2.10	2.48	117.9
	1:32	1.05	1.47	139.6
	1:64	0.53	0.84	160.2
	1:128	0.26	0.46	173.0
B	1:5	9.31	9.31	100.0
	1:10	4.66	4.36	93.6
	1:20	2.33	2.54	109.0
	1:40	1.16	1.50	129.2
	1:80	0.58	0.84	144.1
	1:160	0.29	0.43	149.3
C	1:4	4.86	4.86	100.0
	1:8	2.43	2.22	91.4
	1:16	1.21	1.16	95.9
	1:32	0.61	0.62	102.8
	1:64	0.30	0.31	103.1
	1:128	0.15	0.13	83.0

Analytical Sensitivity

Limit of blank, LoB 0.100 pmol/l

Limit of detection, LoD 0.175 pmol/l

Limit of quantitation, LoQ 0.175 pmol/l

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP17-A2. The specified accuracy goal for the LoQ was 20% CV.

12. DISPOSAL

Liquid test components, microtiter plates and vials should be treated as ordinary laboratory waste unless otherwise stated. Specimens and other potentially infectious materials must be disposed of in accordance with regulatory requirements.

13. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide or ProClin are hazardous to health and the environment. Substrates for enzymatic colour reactions may also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances must be avoided. Further safety information can be found in the safety data sheet, which is available from Immundiagnostik AG on request.
- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact.

Warning: Causes serious eye irritation. **IF IN EYES:** Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: get medical Advice/attention.

- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

14. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- *IDK*[®] is a trademark of Immundiagnostik AG.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.













16. REFERENCES

1. Szulc, P. et al., 2011. Cortical bone status is associated with serum osteoprotegerin concentration in men: the STRAMBO study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **96**(7), pp.2216–26.
2. Samelson, E.J. et al., 2008. Increased plasma osteoprotegerin concentrations are associated with indices of bone strength of the hip. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **93**(5), pp.1789–95.
3. Terpos, E. et al., 2009. The clinical significance of serum markers of bone turnover in NSCLC patients: surveillance, management and prognostic implications. *Anti-cancer research*, **29**(5), pp.1651–7.
4. Madarász, E. et al., 2009. Osteoprotegerin levels in women with prior gestational diabetes mellitus. *Diabetes care*, **32**(1), p.e5.
5. Kearns, A.E., Khosla, S. & Kostenuik, P.J., 2008. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocrine reviews*, **29**(2), pp.155–92.

6. Pepene, C.E. et al., 2011. Circulating osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor κ B ligand in polycystic ovary syndrome: relationships to insulin resistance and endothelial dysfunction. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, **164**(1), pp.61–8.
7. Van Tuyl, L.H.D. et al., 2010. Baseline RANKL:OPG ratio and markers of bone and cartilage degradation predict annual radiological progression over 11 years in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, **69**(9), pp.1623–8.
8. Anastasilakis, A.D. et al., 2008. Acute changes in serum osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor- κ B ligand levels in women with established osteoporosis treated with teriparatide. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, **158**(3), pp.411–5.
9. Faienza, M.F. et al., 2009. Osteoclastogenesis in children with 21-hydroxylase deficiency on long-term glucocorticoid therapy: the role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand/osteoprotegerin imbalance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **94**(7), pp.2269–76.
10. Park, J.S. et al., 2011. Effect of pioglitazone on serum concentrations of osteoprotegerin in patients with type 2 diabetes mellitus. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, **164**(1), pp.69–74.
11. Nybo, M. et al., 2011. Rosiglitazone decreases plasma levels of osteoprotegerin in a randomized clinical trial with type 2 diabetes patients. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, **109**(6), pp.481–5.
12. Semb, A.G. et al., 2009. Osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and risk for coronary events: a nested case-control approach in the prospective EPIC-Norfolk population study 1993-2003. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **29**(6), pp.975–80.
13. Svensson, M. et al., 2012. Osteoprotegerin as a predictor of renal and cardiovascular outcomes in renal transplant recipients: follow-up data from the ALERT study. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, **27**(6), pp.2571–5.

14. Stavroulopoulos, A. et al., 2011. Evolution of coronary artery calcification in patients with chronic kidney disease Stages 3 and 4, with and without diabetes. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, **26**(8), pp.2582–9.
15. Lieb, W. et al., 2010. Biomarkers of the osteoprotegerin pathway: clinical correlates, subclinical disease, incident cardiovascular disease, and mortality. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **30**(9), pp.1849–54.
16. Ueland, T. et al., 2011. Osteoprotegerin predicts progression of chronic heart failure: results from CORONA. *Circulation. Heart failure*, **4**(2), pp.145–52.
17. Jiang, J.-Q. et al., 2011. Serum osteoprotegerin measurement for early diagnosis of chronic kidney disease-mineral and bone disorder. *Nephrology (Carlton, Vic.)*, **16**(6), pp.588–94.
18. Kudlacek, S. et al., 2003. Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population. *Bone*, **32**(6), pp.681–6.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Irritant

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

