

OSTEOPROTEGERIN

(EN) ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF
OSTEOPROTEGERIN IN EDTA PLASMA, HEPARIN PLASMA, SERUM OR CELL
CULTURE SUPERNATANTS
CAT. NO. BI-20402 . 12 X 8 TESTS

(DE) ENZYM IMMUNOASSAY ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON
OSTEOPROTEGERIN IN EDTA PLASMA, HEPARIN PLASMA, SERUM ODER
ZELLKULTURÜBERSTAND
KAT. NR. BI-20402 . 12 X 8 TESTS

(FR) ESSAI IMMUNOENZYMATIQUE POUR LA DETERMINATION QUANTITATIVE DE
L'OSTEOPROTEGERIN DANS LE PLASMA EDTA, LE PLASMA HEPARIN, LE SERUM
OU LES SURNAGEANTS DE CULTURE CELLULAIRE
CAT. NO. BI-20402 . 12 X 8 TESTS

(IT) ENZYME IMMUNOASSAY PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DEL
OSTEOPROTEGERIN NEL PLASMA EDTA O NEL PLASMA HEPARINA, NEL SIERO O
NEL SURNATANTE DE COLTURA CELLULARE.
CODICE: BI-20402 . 12 X 8 DETERMINAZIONI

(ES) ENZIMOINMUNOENSAYO PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE
OSTEOPROTEGERINA EN PLASMA EDTA, PLASMA HEPARINIZADO, SUERO O
SOBRENADANTE DE CULTIVOS CELULARES
CAT. NO. BI-20402 . 12 X 8 TESTS

rev.no. 100131 (replacing 080401)

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.at



BIOMEDICA
BIOMEDICA
GRUPPE 
www.bmgrp.com

CONTENT / INHALT / SOMMAIRE / CONTENUTO / CONTENIDO

ENGLISH	Page 3
DEUTSCH	Seite 9
FRANCAIS	Page 13
ITALIANO	Pagina 17
ESPANIOL	Pagina 21

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 dimeric glycoprotein of the TNF receptor family with a molecular weight of 60 kD and 120 kD respectively. OPG acts as a soluble secreted receptor for RANKL. OPG prevents the binding of RANKL to RANK and thus inhibits RANK activation (osteoclast differentiation and activation receptor, ODAR) on the osteoclast surface. OPG is an inhibitor of osteoclast development.

Indications:

- Osteoporosis (1, 2)
- Diseases with locally increased resorption activity (3- 5)
- Arthritis (6)
- Oncology (7-10)
- Therapy monitoring (11, 12)
- Cardiovascular Disease (13-16)

2) CONTENT OF THE KIT

CONT	KIT COMPONENTS	QUANTITY
PLATE	Mouse monoclonal anti OPG antibody, pre-coated microtiter strips in a strip holder	12 x 8 tests
WASHBUF	Wash buffer concentrate 20x, natural cap	1 x 50 ml
AB	Goat polyclonal anti OPG antibody – biotin labelled, natural cap, yellow dye, ready to use	1 x 7 ml
STD	Standards 1-6, (0; 0.37; 1.1; 3.3; 10; 30 pmol/l), white caps, ready to use Only for use with plasma or serum samples	6 x 500 µl
CTRL	Control, yellow cap, ready to use (exact concentration on the label) Only for use with plasma or serum samples	1 x 500 µl
ASYBUF	Assay Buffer, red cap, ready to use	1 x 25 ml
CONJ	Conjugate, (streptavidin-HRPO), amber bottle, amber cap, ready to use	1 x 22 ml
SUB	Substrate (TMB solution), amber bottle, blue cap, ready to use	1 x 22 ml
STOP	Stop solution, white cap, ready to use	1 x 7 ml
OPG-STOCK	Osteoprotegerin stock solution, red cap, (500 pmol/l) Only for use with cell culture samples, (see chapter 5) reagents and sample preparation	1 x 500 µl

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

- 1.5 ml reaction vials
- Precision pipettes calibrated to deliver 50 µl, 100 µl, 200 µl, 250 µl, 300 µl, 1000 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 -20°C or at -70°C. All samples should undergo only 4 freeze-thaw cycles. Lipemic or haemolysed samples may give erroneous results. Samples should be mixed well before assaying.

For further information on sample stability please visit our website www.bmgrp.com/products/assay_characteristics/sample_stability or contact our customer service by e-mail export@bmgrp.at or by phone +43/ 1/ 29107-45.

Reconstitute as follows:

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.

Measurement of Cell culture samples: OPG STOCK (OPG stock solution)

Only for measurement of OPG in Cell Culture Samples. Do not use serum standards 1-6 (white caps) and control (yellow cap)!

- Dilute the OPG-STOCK with cell culture medium 1:20 (1+19) for STD1 (50 µl OPG-STOCK + 950 µl medium)
- Dilute the standard for the standard curve 1:2 (1+1) as it is shown in the scheme:

STD1 (25 pmol/l)

250 µl STD1 + 250 µl cell culture medium = STD2 (12.5 pmol/l)

250 µl STD2 + 250 µl cell culture medium = STD3 (6.25 pmol/l)

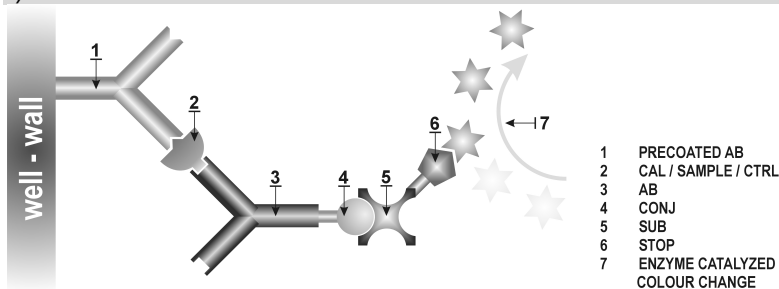
250 µl STD3 + 250 µl cell culture medium = STD4 (3.13 pmol/l)

Use cell culture medium as STD0 (Standard 0)

Diluted OPG STOCK is stable at -20°C for one month. Avoid freeze-thaw cycles.

The range of standards depends from the quantity of produced OPG in the cell line. If necessary dilute the supernatant of the cell culture with cell culture medium.

6) PRINCIPLE OF THE ASSAY



7) ASSAY PROTOCOL

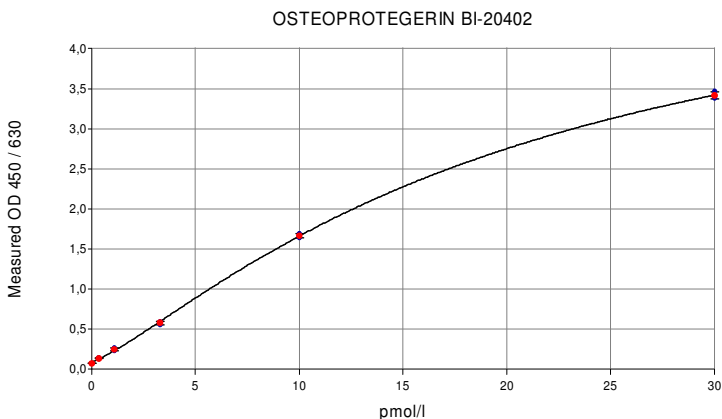
All reagents and samples must be at room temperature (18-26°C) before use in the assay
Mark position for BLANK/STD/SAMPLE/CTRL (Blank/Standard/Sample/Control) on the protocol sheet
Take microtiter strips out of the alu bag, take a minimum of one well as Blank. Store unused strips with desiccant at 4°C (2-8°C) in the alu bag. Strips are stable until expiry date stated on the label

- 1) Pipette 100 µl ASYBUF (Assay Buffer, red cap) into each well. Pipette additional 100 µl into well marked as blank
- 2) Add 50 µl STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) in duplicate into respective well, except blank
- 3) Add 50 µl AB (biotinylated anti OPG antibody, natural cap) into each well, except blank, swirl gently
- 4) **Cover tightly and incubate over night (18-24h) at 4°C (2-8°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 (18-26°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 20 min at room temperature (18-26°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. For cell culture samples use the standards prepared from the OPG-STOCK, see chapter 5) reagents and sample preparation. 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.

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

Normal range:	Median = 1.8 pmol/l (n = 1134; age 19-96) It is recommended to establish the normal range for each laboratory.
Standard range:	0 to 30 pmol/l
Conversion factor pg/ml to pmol/l:	1 pg/ml = 0.05 pmol/l (MW: 19.9 kD)
Sample volume:	50 µl human EDTA plasma, Heparin plasma, serum, cell culture supernatant
Detection Limit:	(0 pmol/l + 3 SD): 0.14 pmol/l
Incubation time:	18-24 h / 1 h / 20 min

For further information on assay characteristics please visit our website www.bmgrp.com/products/assay_characteristics or contact our customer service by e-mail export@bmgrp.at or by phone +43/ 1/ 29107-45.

10) PRECISION

Intra-Assay: 2 samples of known concentrations were tested 16 times to assess intra-assay precision

Inter-Assay: 2 samples of known concentrations were tested in 10 assays to assess inter-assay precision

Intra-Assay (n=16)	Sample 1	Sample 2
Mean (pmol/l)	4.59	10.76
SD	0.46	0.41
CV%	10%	4%

Inter-Assay (n=10)	Sample 1	Sample 2
Mean (pmol/l)	5.53	10.1
SD	0.38	0.76
CV%	7%	8%

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 with 3rd generation tests against HIV-Ab and HBsAg, and were found negative. Nevertheless, they should be handled and disposed as if they were infectious.

All liquid reagents contain 0.01% 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) 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.
- 2) Marini H et al.: OPG and sRANKL Serum Concentrations in Osteopenic, Postmenopausal Women after 2-year Genistein Administration. *JBMR* (2008), 23, 5: 715-720.
- 3) Kastritis E et al.: Increased Osteoprotegerin Levels in Response to Increased Bone Resorption in Amyloidosis: Comparisons with Bone Remodeling of Multiple Myeloma. *Blood* (2007), 110: 3528.
- 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) 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
- 7) Corey E et al.: Osteoprotegerin in Prostate Cancer Bone Metastasis. *Cancer Res* (2005), 65: 1710-1718.
- 8) Zojer N et al.: Bisphosphonate Treatment does not Affect Serum Levels of Osteoprotegerin and RANKL in Hypercalcemic Cancer Patients. *Anticancer Res* (2005), 25: 3607-3612.
- 9) 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.
- 10) Rogers A et al. (Eastele): Circulating Osteoprotegerin and Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand: Clinical Utility in Metabolic Bone Disease Assessment. *J Clin Endocrinol Metab* (2005), 90: 6323-6331.
- 11) Felicia Faienza M 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.
- 12) Woo JH et al.: Changes of Clinical Response and Bone Biochemical Markers in Patients with Ankylosing Spondylitis taking Etanercept. *J Rheumatol* (2007), 34: 1753 - 1759.
- 13) 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.
- 14) Schroff RC et al.: The Circulating Calcification Inhibitors, Fetuin-A and Osteoprotegerin, but not Matrix Gla protein, are Associated with Vascular Stiffness and Calcification in Children on Dialysis. *Nephrol Dial Transplant* (2008), 23: 3263-3271
- 15) Morena M et al.: Cut-off value of Plasma Osteoprotegerin Level May Predict the Presence of Coronary Artery Calcifications in Chronic Kidney Disease Patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* (2009), 10.1093/ndt/gfp301.
- 16) Omland T et al.: Circulating Osteoprotegerin Levels and Long-Term Prognosis in Patients With Acute Coronary Syndromes. *J Am Coll Cardiol* (2008), 51:627-633.

1) EINLEITUNG

Osteoprotegerin (OPG) oder Osteoclast inhibitory factor (OCIF) ist ein dimeres Glycoprotein der TNF Rezeptor Familie, mit einem Molekulargewicht von 60kD respektive 120 kD. OPG verhindert die Bindung von RANK und RANKL und hemmt dadurch die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten und somit den osteolytischen Prozess.

Indikationen:

- Osteoporose (1, 2)
- Krankheiten mit lokal induzierter Knochenresorptionsaktivität (3- 5)
- Arthritis (6)
- Onkologie (7-10)
- Therapieüberwachung (11, 12)
- Kardiovaskuläre Krankheiten (13-16)

2) INHALT DES KITS

CONT	KIT KOMPONENTEN	MENGE
PLATE	Maus monoklonaler anti OPG Antikörper, beschichtet auf Mikrotiterplattenstreifen im Streifenhalter. Verpackt im Alu Säckchen mit Trockenmittel	12 x 8 Tests
WASHBUF	Waschpuffer, 20fach Konzentrat, durchsichtiger Schraubverschluss	1 x 50 ml
AB	Ziege polyklonaler anti OPG Antikörper - biotinyliert, durchsichtiger Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 7 ml
STD	Standards 1-6, (0; 0,37; 1,1; 3,3; 10; 30 pmol/l), weißer Schraubverschluss, gebrauchsfertig Nur zur Verwendung mit Serum oder Plasma-Proben	6 x 500 µl
CTRL	Kontrolle, gelber Schraubverschluss, gebrauchsfertig (genaue Konzentration siehe Etikett) Nur zur Verwendung mit Serum oder Plasma-Proben	1 x 500 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
OPG-STOCK	Osteoprotegerin Konzentrat, roter Schraubverschluss, (500 pmol/l) Nur zur Verwendung mit Zellkulturproben, siehe Kapitel 5) Reagenzien und Probenvorbereitung	1 x 500 µl

3) ZUSÄTZLICHES MATERIAL IM KIT

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

4) ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL UND GERÄTE

- Reaktionsgefäß 1,5 ml
- Kalibrierte Präzisionspipetten für 50µl, 100µl, 200µl, 300µl, 1000µl, inkl. Pipettenspitzen
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Mikrotiterplatten Wascher wird empfohlen, Alternativen: Mehrkanalpipetten oder Dispenser
- Kühlschrank mit 4°C (2-8°C)
- Mikrotiterplattenphotometer mit 450 nm Filter (630 nm Referenz)
- Millimeterpapier oder Software

5) REAGENZIEN UND PROBENVORBEREITUNG

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

Probenvorbereitung:

Abnahme von venösem Blut mittels standardisierter Blutabnahmeröhrchen zur Gewinnung von Serum oder Plasma. Wir empfehlen die Zentrifugation des Blutes für 20 Minuten bei 2000g, bevorzugt bei 4°C (2-8°C), so schnell wie möglich. Das Blut kann vor der Zentrifugation bei 4°C (2-8°C) bis zu 24 Stunden gelagert werden. Das gewonnene Serum oder Plasma soll so schnell wie möglich gemessen werden. Für eine eventuelle Lagerung sollen die Proben aliquotiert und bei -20°C oder bei -70°C 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.

Nähere Informationen zur Probenstabilität finden sie auf unserer Website unter www.bmgrp.com/products/assay_characteristics/sample_stability oder sie kontaktieren unser Kundenservice, Email unter export@bmgrp.at, Tel. unter +43/ 1/ 29107- 45.

Rekonstitution:

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.

Messung von Zellkulturproben: OPG STOCK (Osteoprotegerin-Konzentrat):

Nur zur Verwendung mit Zellkulturproben. Für die Bestimmung von Zellkulturproben dürfen STD 1-6 (weißer Schraubverschluss) und CTRL (gelber Schraubverschluss) nicht verwendet werden!

- Verdünnen Sie den OPG-STOCK (Osteoprotegerin Konzentrat) mit Zellkulturmedium 1:20 (1+19) für STD1 (50 µl OPG-STOCK + 950 µl Medium).
- Die weiteren Standards für die Standardkurve sind 1:2 (1+1) zu verdünnen:

STD1 (25 pmol/l)

250 µl STD1 + 250 µl Zellkulturmedium = STD2 (12,5 pmol/l)

250 µl STD2 + 250 µl Zellkulturmedium = STD3 (6,25 pmol/l)

250 µl STD3 + 250 µl Zellkulturmedium = STD4 (3,13 pmol/l)

Verwenden Sie das Zellkulturmedium als STD0 (Standard 0)

Die Wahl des Standardbereiches hängt von der Menge des produzierten OPG der jeweiligen Zelllinie ab. Falls notwendig ist der Zellkulturüberstand mit Zellkulturmedium zu verdünnen.

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 (18-26°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 Alu Säckchen. Mindestens 1 Well für den Leerwert reservieren. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können mit Trockenmittel im Alu Säckchen auf 4°C (2-8°C) bis zum angegebenen Ablaufdatum gelagert werden.

- 1) Pipettieren Sie 100 µl ASYBUF (Verdünnungspuffer, roter Schraubverschluss) in alle Wells. Pipettieren Sie zusätzlich 100 µl in das Well für den Leerwert.
- 2) Pipettieren Sie 50 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, durchsichtiger Schraubverschluss) in alle Wells, mit Ausnahme des Leerwertes, mischen.
- 4) Streifen abdecken und über Nacht (18-24 Stunden) bei 4°C (2-8°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 (18-26°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) 20 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°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 450nm Filter (Referenz 630nm). 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. Für Zellkulturproben verwenden Sie die Standards welche aus dem OPG-STOCK hergestellt wurden siehe Kapitel 5) Reagenzien und Probenvorbereitung. Das Testsystem wurde evaluiert mit einem 4 Parameter Algorithmus. Andere Auswerte Algorithmen müssen vom Verwender evaluiert werden. Die Konzentration der Proben wird aus der Standardkurve abgelesen.

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

Normawerte:	Median = 1,8 pmol/l (n = 1134; Alter 19-96) Jeder Verwender sollte den Normalbereich für seine Proben evaluieren.
Standardbereich:	0 bis 30 pmol/l
Umrechnungsfaktor pg/ml zu pmol/l:	1 pg/ml = 0,05 pmol/l (MW: 19,9 kD)
Probenvolumen:	50 µl human EDTA Plasma, Heparin Plasma, Serum oder Zellkulturüberstand
Detektionsgrenze:	(0 pmol/l + 3 SD): 0,14 pmol/l
Inkubationszeiten:	18-24 h / 1h / 20 min

Nähere Informationen zu den Testmerkmalen finden sie auf unserer Website unter www.bmgrp.com/products/assay_characteristics oder sie kontaktieren unser Kundenservice, Email unter export@bmgrp.at, Tel. unter +43/ 1/ 29107-45

10) PRÄZISION

Intra-Assay: 2 Proben wurden 16 mal in Doppelbestimmung in einem Test getestet.

Inter-Assay: 2 Proben wurden in Doppelbestimmung in 10 Tests getestet.

Intra-Assay (n=16)		
Durchschnitt (pmol/l)	4,59	10,76
SD	0,46	0,41
VK%	10%	4%

Inter-Assay (n=10)		
Durchschnitt (pmol/l)	5,53	10,1
SD	0,38	0,76
VK%	7%	8%

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 mit Tests der 3. Generation auf HIV Ak und HBsAg getestet und negativ gefunden. Trotzdem sollten die Reagenzien als potentiell infektiös behandelt werden.

Alle flüssigen Reagenzien enthalten 0,01% 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, Augengläser 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 dimérique de la famille des récepteurs TNF avec une masse moléculaire de 60 kD ou 120 kD respectivement. L'OPG empêche la liaison RANKL-RANK inhibant ainsi la différenciation et l'activation des ostéoclastes, et donc le processus ostéolytique.

Indications:

- Ostéoporose (1,2)
- Maladies entraînant une activité accrue de résorption osseuse locale (3-5)
- Arthrite (6)
- Oncologie (7-10)
- Suivi thérapeutique (11,12)
- Maladies cardio-vasculaires (13-16)

2.) CONTENU DE LA TROUSSE

CONT	Plaques de barrettes de microtitration revêtues d'anticorps monoclonal anti-OPG de souris, avec support pour barrettes. Conditionnées en sachets alu avec dessicatif	QUANTITE
PLATE	Tampon de lavage, concentré 20x, bouchon transparent	12 x 8 tests
WASHBUF	Anticorps polyclonal biotinylé anti-OPG de chèvre, bouchon à visser transparent, prêt à l'emploi	1 x 50 ml
AB	Etalons 1-6, (0; 0,37; 1,1; 3,3; 10; 30 pmol/l), bouchon à visser blanc, prêts à l'emploi A utiliser uniquement avec des échantillons de sérum ou de plasma	1 x 7 ml
STD	Contrôle, bouchon à visser jaune, prêt à l'emploi (pour la concentration exacte, voir étiquette) A utiliser uniquement avec des échantillons de sérum ou de plasma	6 x 500 µl
CTRL	Tampon de dosage, bouchon à visser rouge, prêt à l'emploi	1 x 500 µl
ASYBUF	Conjugué, (streptavidine-HRPO), flacon marron, bouchon à visser marron, prêt à l'emploi	1 x 25 ml
CONJ	Substrat (solution TMB), flacon marron, bouchon à visser bleu, prêt à l'emploi	1 x 22 ml
SUB	Solution d'arrêt, bouchon à visser blanc, prête à l'emploi	1 x 22 ml
STOP	Solution stock d'ostéoprotégérine, bouchon à visser rouge, (500 pmol/l) A utiliser uniquement avec des échantillons de culture cellulaire, (voir au chapitre 5), Préparation des réactifs et des échantillons	1 x 7 ml
OPG-STOCK	Plaques de barrettes de microtitration revêtues d'anticorps monoclonal anti-OPG de souris, avec support pour barrettes. Conditionnées en sachets alu avec dessicatif	1 x 500 µl

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

- Flacons de réaction 1,5 ml
- Micropipettes de précision calibrées pour 50µl, 100µl, 200µl, 300 µl, 1000µl, 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 logiciél

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 fractionnés et conservés à -20°C, ou à -70°C. 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.

Vous trouverez de plus amples informations sur la stabilité des échantillons en consultant notre site web à l'adresse www.bmgrp.com/products/assay_characteristics/sample_stability ou contactez notre service clientèle à l'adresse email export@gmbrp.at, 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.

Mesure des échantillons de culture cellulaire: stock OPG (concentré d'ostéoprotégérine):

A utiliser uniquement avec des échantillons de culture cellulaire.

- Diluer l'OPG-STOCK (solution stock d'ostéoprotégérine) avec le milieu de culture cellulaire 1:20 (1+19) pour constituer le STD1 (50 µl d'OPG-STOCK + 950 µl de milieu).
- Constituer les autres étalons de la courbe d'étalonnage en diluant au 1:2 (1+1) comme suit:

STD1 (25 pmol/l)

250 µl STD1 + 250 µl milieu de culture cellulaire = STD2 (12,5 pmol/l)

250 µl STD2 + 250 µl milieu de culture cellulaire = STD3 (6,25 pmol/l)

250 µl STD3 + 250 µl milieu de culture cellulaire = STD4 (3,13 pmol/l)

Utiliser le milieu de culture cellulaire comme STD0 (Standard 0)

Pour déterminer les échantillons de culture cellulaire, ne pas utiliser STD 1-6 (capuchons blancs) et CTRL (capuchon jaune).

Le choix de la plage standard dépend de la quantité d'OPG produite dans la ligne cellulaire concernée. Si nécessaire, diluer le surageant de culture cellulaire dans le milieu de culture cellulaire.

6) PRINCIPE DU DOSAGE

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

7) PROTOCOLE DU DOSAGE

Tous les réactifs et échantillons doivent être à température ambiante (18-26°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 100 µl de ASYBUF (Tampon de dosage) dans chaque puits. Distribuer 100 µl de plus dans le puits pour le blanc.
2. Distribuer 50 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 polyclonal biotinylé anti-OPG) dans chaque puits, sauf le blanc, agiter.
- 4. Sceller la plaque et incuber pendant la nuit (18 à 24 heures) à 4°C (2-8°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. Sceller la plaque et incuber pendant une heure à 18-26°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 20 min à température ambiante (18-26°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 620 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. Pour les échantillons de culture cellulaire, utiliser les étalons établis à partir de l'OPG-STOCK, voir chapitre 5) Préparation des réactifs et des échantillons.

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.

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 = 1,8 pmol/l (n = 1134; age 19-96) Nous recommandons à chaque laboratoire d'établir sa propre gamme de valeurs normales.
gamme d'étalonnage:	0 à 30 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:	50 µl plasma EDTA humain, plasma héparin, sérum, surnageant de culture cellulaire
Limite de détection:	(0 pmol/l + 3 SD): 0,14 pmol/l
Temps d'incubation :	18-24 h / 1 h / 20 min

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

10) PRECISION

Précision intra-série : 2 échantillons ont été testés 16 fois en double lors d'un essai

Précision inter-séries : 2 échantillons ont été testés 10 fois en double pendant 10 essais

Intra-série (n=16)			Inter-séries (n=10)		
Moyenne (pmol/l)	4,59	10,76	Moyenne (pmol/l)	5,53	10,1
SD	0,46	0,41	SD	0,38	0,76
CV%	10%	4%	CV%	7%	8%

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 avec les essais de troisième génération 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.

Tous les réactifs liquides contiennent 0,01% de Procline 300 comme conservateur. 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) or Osteoclast Inhibitory Factor (OCIF) è una proteina dimerica appartenente alla famiglia dei recettori del TNF; ha un peso molecolare di 60 kD o di 120 kD per il dimero. Agisce come recettore solubile del RANKL; la sua secrezione interferisce con il legame del RANKL al RANK (Osteoclast Differentiation and Activation Receptor, ODAR) presente sulla superficie degli osteoclasti e la sua attivazione, inibendo così lo sviluppo degli osteoclasti.

Indicazioni del dosaggio

- Osteoporosi (1,2)
- Malattie con aumento locale di riassorbimento osseo (3-5)
- Artrite (6)
- Oncologia (7-10)
- Monitoraggio degli effetti della terapia (11,12)
- Malattie cardiovascolari (13-16)

2.) CONTENUTO DEL KIT

CONT	REATTIVI	QUANTITA
PLATE	Anticorpo monoclonale anti-OPG da topo, legato alla superficie di pozzetti.in strip su telaietto	12 x 8 determinazioni
WASHBUF	Tampone per il lavaggio, concentrato 20x, tappo non colorato	1 x 50 mL
AB	Anticorpo policlonale anti OPG da capra biotinilato, tappo non colorato, pronto per l'uso	1 x 7 mL
STD	Standard 1-6, (0; 0.37; 1.1; 3.3; 10; 30 pmol/L), tappo bianco, pronti per l'uso. Da utilizzare solo per campioni di siero o plasma.	6 x 500 µL
CTRL	Controllo, tappo giallo, pronto per l'uso (l'esatta concentrazione è riportata sull'etichetta)	1 x 500 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
OPG-STOCK	Soluzione madre di osteoprotegerina, tappo rosso, (500 pmol/L). Utilizzare solo per surmatanti di colture cellulari, (vedi cap.5, preparazione dei reattivi e dei campioni)	1 x 500 µL

3) MATERIALE AGGIUNTIVO CONTENUTO NEL KIT

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

4) MATERIALE RICHIESTO MA NON TORNTO

- Provette da 1,5 mL
- Micropipette con puntali monouso per dispensare 50 µL, 100 µL, 200 µL, 250 µL, 300 µL e 1000 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

Raccogliere campioni sangue venoso con le modalità standard in provette per siero o plasma. Separare il siero o il plasma dalla parte corpuscolata centrifugando prima possibile i campioni 20 min. a 2000 x g preferibilmente a 4° (2-8°). Se non è possibile centrifugare immediatamente i campioni, conservarli a 4° (2-8°). A questa temperatura i campioni sono stabili fino a 24 ore. Il siero e il plasma devono essere analizzati prima possibile. Per una stabilità prolungata nel tempo, conservare i campioni, suddivisi in aliquote, a -20°C o -70°C. E' possibile congelare-scongelare i campioni fino ad un massimo di 4 volte. Campioni lipemici o emolizzati possono dare risultati non corretti. Prima del dosaggio agitare su vortex i campioni scongelati.

Conservare i campioni a -20°C, o a -70°C per una migliore stabilità nel tempo. I campioni possono essere congelati-scongelati per un massimo di 4 volte. Non utilizzare campioni lipemici o emolizzati. Agitare su vortex i campioni prima dell'uso.

Per ulteriori informazioni sulla stabilità dei campioni si prega di visitare il sito web www.bmgrp.com/products/assay_characteristics/sample_stability 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 2-8°C fino alla data riportata sull'etichetta del flacone. Nel dosaggio usare esclusivamente WASHBUF (tampone per il lavaggio) diluito.

Determinazione di OPG su surnatanti di colture cellulari: OPG STOCK (soluzione madre di OPG)

Solo per la determinazione di OPG su surnatanti di colture cellulari. Non utilizzare gli standard 1-6 per le determinazioni su siero o plasma (tappo bianco) e il controllo (tappo giallo)!

- Diluire il reattivo OPG-STOCK con il terreno di coltura 1:20 (1+19) per preparare lo STD1 (50 µL OPG-STOCK + 950 µL di terreno).
- Preparare la curva standard con diluizioni seriali in base 2, nel modo seguente:

STD1 (25 pmol/L)

250 µL STD1 + 250 µL di terreno = STD2 (12,5 pmol/L)

250 µL STD2 + 250 µL di terreno = STD3 (6,25 pmol/L)

250 µL STD3 + 250 µL di terreno = STD4 (3,13 pmol/L)

Utilizzare il terreno di coltura come STD0 (Standard 0)

Il range della curva standard riflette la concentrazione di OPG prodotta dalla linea cellulare studiata. Se necessario, diluire i surnatanti con il terreno di coltura utilizzato.

6) PRINCIPIO DEL METOD

Vedi capitolo 6 delle istruzioni in lingua inglese.

7) PROTOCOLLO DEL DOSAGGIO

Portare tutti i reattivi a temperatura ambiente (18-26°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 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 100 µL di ASYBUF (Tampone) in tutti i pozzetti. Aggiungere altri 100 µL di ASYBUF nel bianco.
2. Aggiungere 50 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 copripietra e incubare 18-24 ore a 4°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 micropietra capovolta su un foglio di carta assorbente.
6. Aggiungere 200 µL di CONJ (Coniugato) in ciascun pozzetto.
7. Coprire con il copripietra e incubare 1 ora a temperatura ambiente (18-26°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 micropietra capovolta su un foglio di carta assorbente.
9. Aggiungere 200 µL di SUB (Substrato) in ciascun pozzetto.
10. Incubare 20 min a temperatura ambiente (18-26°C) al buio.
11. Aggiungere 50 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

Sottrarre l'assorbanza del bianco da quella di standard, campioni e controllo. Costruire la curva standard ponendo in ordinata le assorbanze corrette degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni. E' possibile utilizzare un programma computerizzato per l'elaborazione dei dati. Utilizzare l'interpolazione a 4 parametri. Sistemi di interpolazione differenti devono essere convalidati dagli utilizzatori. Moltiplicare i risultati ottenuti per il rispettivo fattore di diluizione.

Typical STD-curve:

Vedi capitolo 8 CALCOLO DEL RISULTATI 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 normali:	Mediana = 1,8 pmol/L (n = 1134; età 19-96) Si raccomanda ad ogni laboratorio di stabilire i propri limiti di normalità.
Curva standard:	0 - 30 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:	50 µL di campione umano, plasma da EDTA o da eparina, siero, surnatante di coltura cellulare.
Sensibilità:	(0 pmol/L + 3 SD): 0,14 pmol/L
Tempo di incubazione:	18- 24 h / 1 h / 20 min

Per ulteriori informazioni sulla caratteristiche del dosaggio si prega di visitare il sito web www.bmgrp.com/products/assay_characteristics/sample_stability o il distributore autorizzato locale.

10) PRECISIONE

Intra-Saggio: 2 campioni a concentrazioni note di osteoprotegerina sono stati dosati 16 volte per valutare la precisione intra-saggio.

Inter-Saggio: 2 campioni a concentrazioni note di osteoprotegerina sono stati dosati in 10 esperimenti diversi per valutare la precisione inter-saggio.

Intra-Saggio (n=16)		
Media (pmol/L)	4,59	10,76
SD	0,46	0,41
CV%	10%	4%

Inter-Saggio (n=10)		
Media (pmol/L)	5,53	10,1
SD	0,38	0,76
CV%	7%	8%

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 con metodi di terza generazione 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.

Tutti i reattivi liquidi contengono Proclin 300 0,01% 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 delle istruzioni in lingua inglese.

1) INTRODUCCION

La Osteoprotegerina (OPG) ó Factor inhibidor de Osteoclastos (OCIF) es una glicoproteína dimérica de la familia del receptor del TNF con un peso molecular de 60 kD y 120 kD, respectivamente. La OPG actúa como un receptor soluble liberado para el RANKL. El OPG evita la unión del RANKL al RANK y así inhibe la activación del RANK (receptor para la diferenciación y la activación de los osteoclastos, ODAR) en la superficie de los osteoclastos. El OPG es un inhibidor del desarrollo de los osteoclastos.

Indicaciones

- Osteoporosis (1,2)
- Enfermedades con actividad de resorción localmente aumentada (3-5)
- Artritis (6)
- Oncología (7-10)
- Monitorización de la terapia (11,12)
- Enfermedad cardiovascular (13-16)

2.) CONTENIDO DEL KIT

CONT	COMPONENTES DEL KIT	CANTIDAD
PLACA	Tiras de micropocillos recubiertas de Anticuerpo Monoclonal anti-OPG de ratón incluídas en su soporte	12 x 8 tests
WASHBUF	Tampón de lavado concentrado 20x, tapón transparente	1 x 50 ml
AB	Anticuerpo policlonal de cabra biotinilado anti OPG, tapón transparente, color amarillo, listo para usar	1 x 7 ml
STD	Estándares 1-6, (0; 0.37; 1.1; 3.3; 10; 30 pmol/l), tapón blanco, listos para usar: Únicamente para usar con muestras de suero y plasma.	6 x 500 µl
CTRL	Control, tapón amarillo, listo para usar (concentración exacta en el vial). Únicamente para usar con muestras de suero y plasma.	1 x 500 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
OPG-STOCK	Solución stock de Osteoprotegerina, tapón rojo, (500 pmol/l). Únicamente para usar con muestras de cultivo celular, (ver capítulo 5) reactivos y preparación de muestras.	1 x 500 µl

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

- Viales de reacción 1,5 ml
- Pipetas de precisión calibradas para dispensar 50 µl, 100 µl, 200 µl, 250 µl, 300 µl, 1000 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:

Recoger las muestras de sangre venosa utilizando tubos estandarizados para la recolección de sangre en suero ó plasma. Se recomienda que se realice la separación del suero o plasma por centrifugación tan pronto como sea posible (e.g. 20 min at 2000 x g, 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 recogidas de suero y plasma se deben de medir tan pronto como sea posible.

Para periodos prolongados alicuotar las muestras y almacenarlas a -20°C ó a -70°C. Las muestras únicamente pueden tener hasta 4 ciclos de congelación-descongelación. Las muestras lipémicas o hemolizadas pueden conducir a resultados erróneos. Las muestras deben ser homogeneizadas antes de procesarse.

Para información adicional sobre estabilidad de la muestra por favor visite nuestra página web www.bmgrp.com/products/assaycharacteristics/sample stability o contacte con nuestro Servicio al cliente por e-mail export@bmgrp.at 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.

Medida de muestras en cultivos celulares: OPG Stock (OPG Solución de stock)

Únicamente para medida de OPG en muestras de cultivo celular . No usar estándares de suero (1-6) (tapón blanco) y control (tapón amarillo)!

Diluir la solución OPG-STOCK (solución stock de Osteoprotegerina) con el medio de cultivo celular 1:20 (1+19) para el STD1 (50 µl OPG-STOCK + 950 µl Medio).

Diluir el Standard para la curva standard 1:2 (1+1) como se muestra en el siguiente esquema:

STD1 (25 pmol/l)

250 µl STD1 + 250 µl medio de cultivo celular = STD2 (12.5 pmol/l)

250 µl STD2 + 250 µl medio de cultivo celular = STD3 (6.25 pmol/l)

250 µl STD3 + 250 µl medio de cultivo celular = STD4 (3.13 pmol/l)

emplear el medio de cultivo celular como estándar cero STD0 (Standard0)

El OPG Stock diluido es estable a -20°C durante 1 mes. Evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación. El rango de los estándares depende de la cantidad de OPG producida en la línea celular. Si se requiere diluir el sobrenadante del cultivo celular con medio de cultivo celular.

6) PRINCIPIO DEL ENSAYO

Ver capítulo 6) principios del ensayo 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 (18-26°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 2-8°C. Las tiras son estables hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta.

1. Añadir 100 µl de ASYBUF (tampón de ensayo) en cada pocillo. Añadir 100 µl adicionalmente en cada blanco.
2. Añadir 50 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 durante la noche (18-24h) a 4°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 (18-26°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 20 minutos a temperatura ambiente (18-26°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 los estándares. Para las muestras de cultivo celular utilizar los estándares preparados a partir del OPG-Stock, ver capítulo 5) preparación de reactivos y muestras. Utilizar un programa informático comercial 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 métodos de ajuste de curvas empleados deben ser evaluados por el usuario.

Typical STD-curve:

Ver capítulo 8) calculo de resultados del ensayo 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 a 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) CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Rango Normal:	Mediana = 1,8 pmol/l (n = 1134; age 19-96) Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango de normalidad.
Rango estandar	0 a 30 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:	50 µl plasma EDTA humano, plasma heparinizado, suero, sobrenadante de cultivo celular
Limite de Detección	(0 pmol/l + 3 SD): 0.14 pmol/l
Tiempo de Incubación:	18-24 h / 1 h / 20 min

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

10) PRECISION

Intra-Ensayo: Para valorar la precisión intra-ensayo se analizaron 16 replicados de 2 muestras de concentraciones conocidas

Inter-Ensayo: Para valorar la precisión inter-ensayo se analizaron 2 muestras de concentraciones conocidas en 10 ensayos

Intra-Ensayo (n=16)		
Media (pmol/l)	4,59	10,76
SD	0,46	0,41
CV%	10%	4%

Inter-Ensayo (n=10)		
Media (pmol/l)	5,53	10,1
SD	0,38	0,76
CV%	7%	8%

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 con ensayos de 3ª generación 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.

Todos los reactivos líquidos contienen Proclina 300 al 0,01% 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 tiene lugar un contacto, enjuagar con abundante agua.

13) LITERATURA

Ver capítulo 13) referencias bibliográficas 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 / Katalógové 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-20402 OSTEOPROTEGERIN

ASSAY PROTOCOL AND CHECKLIST

PREPARATION OF REAGENTS:

- Bring all reagents to room temperature (18-26°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 alu bag and mark positions on the protocol sheet.

TEST PROCEDURE:

- Step 1) Pipette 100 µl ASYBUF (Assay buffer, red cap) into each well. Pipette additional 100 µl into well marked as blank.
- Step 2) Add 50 µl STD/SAMPLE/CTRL (standard/sample/control) into all wells except blank.
- Step 3) Add 50 µl AB (biotinylated anti OPG ab, natural cap) into each well, except blank, swirl gently.
- Step 4) Cover tightly and incubate over night (18-24 hours) at 4°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 (18-26°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 20 minutes at room temperature (18-26°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.