

total sRANKL (human) ELISA

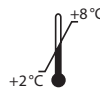
*Zur in-vitro-Bestimmung des total sRANKL (human)
in Serum und Plasma*

total sRANKL (human) ELISA

*For the in vitro determination of total sRANKL (human)
in serum and plasma*

Gültig ab / Valid from 2022-08-08

REF K 1016



IVD



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

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	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	8
9. EINSCHRÄNKUNGEN	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	9
<i>Referenzwerte</i>	9
11. TESTCHARAKTERISTIKA	9
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	9
<i>Spike-Wiederfindung</i>	10
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	10
<i>Analytische Sensitivität</i>	10
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	11
13. TECHNISCHE MERKMALE	11
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12
15. LITERATUR	12
<i>Allgemeine Literatur</i>	12
<i>Literatur mit K 1016</i>	13

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene ELISA ist für die quantitative Bestimmung von total sRANKL (human) aus Serum und Plasma geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

Der Assay erkennt sowohl das freie als auch das im Komplex mit OPG gebundene sRANKL in Serum und Plasma. Freies sRANKL kann mathematisch ermittelt werden, indem der Assay einmal mit einem Überschuss (freies und OPG gebundenes sRANKL werden bestimmt) und einmal ohne OPG-Zugabe durchgeführt wird (nur die bereits in der Probe vorliegenden OPG-sRANKL-Komplexe werden bestimmt).

2. EINLEITUNG

RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand, auch als Osteoprotegerin-Ligand, OPGL, bekannt), sein zellulärer Rezeptor RANK und sein Fängerrezeptor, das Osteoprotegerin (OPG), wurden als Schlüsselkomponenten im körpereigenen Regelkreis des Knochenwiederaufbaus identifiziert. RANKL, ein Mitglied der TNF- (Tumor Necrosis Factor) Familie, ist das Hauptstimulanz für die Reifung von Osteoklasten und ist für ihr Überleben ausschlaggebend. Daher führt ein Anstieg der Expression von RANKL zu Knochenresorption und -verlust. RANKL wird von Zellen der Osteoblastlinie und aktivierten T-Lymphozyten produziert und aktiviert seinen spezifischen Rezeptor, RANK, welcher sich auf Osteoklasten und dendritischen Zellen befindet.

Die Wirkung von RANKL wird von OPG gesteuert, das in verschiedenen Geweben sezerniert wird und als löslicher endogener Rezeptorantagonist wirkt.

Die Pathogenese der Paget-Krankheit, gut- und bösartige Knochentumore, postmenopausale Osteoporose, rheumatische Arthritis, Knochenmetastasen und Hyperkalzämie wurden in Verbindung mit einem gestörten RANKL/OPG-Gleichgewicht gebracht. Am Tiermodell konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß von Störungen dieser Art durch ein Einstellen des RANKL/OPG-Gleichgewichts mittels Zugabe von OPG gemindert werden konnte.

Es wurde gezeigt, dass RANKL bei murinen Osteoblasten oder Stromazellen als membranboundenes Protein exprimiert und von einer Metalloprotease in seine lösliche Form (sRANKL) abgespalten wird. Stimulation der Osteoklastogenese, beispielsweise durch IL-1b, IL-6, IL-11, IL 17 und TNF α , fördern auch die Expression von RANKL und inhibieren die Expression von OPG in Osteoblasten oder Stromazellen. Zytokine wie IL-13, INF-g und TNF- α 1, die die Osteoklastogenese inhibieren, unterdrücken die Expression von RANKL und stimulieren die Expression von OPG.

Molekulare Struktur

sRANKL ist ein Vertreter der TNF-Klasse und weist eine hohe Ähnlichkeit mit anderen Vertretern dieser Proteingruppe auf (SwissProt-Nr. O14788). Zwei Isoformen entstehen durch alternative Fusionsvorgänge: ein Membranprotein vom Typ II (Isoform 1, 317 AS, 35,5 kD) und ein sezerniertes Molekül (Isoform 2, 244 AS, 27,7 kD), dem die Domänen für das Zytoplasma und Transmembranen fehlen. Obwohl beide Isoformen bioaktiv sind, scheint das membrangebundene Protein die homöostatische Form zu sein, während die Expression des löslichen sRANKL einen pathologischen Zustand anzeigt.

Indikationen

- Postmenopausale und senile Osteoporose
- Krankheiten mit lokal erhöhter Knochenresorption
- Paget-Krankheit
- Erkrankungen der Zahnwurzelhaut
- Entzündliche Krankheiten
- Immunologische Störungen
- Arthritis
- Onkologie

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 1016	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 1016	SOL	OPG-Lösung, gebrauchsfertig	5,5 ml
K 1016	STD	Standardkonzentrat (Konzentration siehe Spezifikation oder Etikett)	1 vial
K 1016	CTRL1	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 vial
K 1016	CTRL2	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 vial
K 1016	CONJ	Konjugat, Streptavidin, peroxidase-markiert	1 vial
K 1016	AB	Detektionsantikörper, biotinyliert	1 vial
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	15 ml

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

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1 000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3 000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 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.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** (Waschpuffer) ist bei **2–8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

- Das **Konjugat-Konzentrat** (CONJ) wird **1:1 001 in Waschpuffer** (10 µl CONJ in 10 ml Waschpuffer) verdünnt. Die unverdünnte Lösung ist bei 2–8 °C bis zum angegebenen Datum haltbar. **Verdünnte Konjugat-Lösung kann nicht gelagert werden.**
- **Vorbereitung des Detektionsantikörpers:** Das **Detektionsantikörper-Konzentrat (AB)** wird vor Gebrauch **1:1001 in Waschpuffer** verdünnt (10 µl biotinylierter Antikörper in 10 ml Waschpuffer). Das **AB** ist, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. **Detektionsantikörper (1:1001 verdünntes AB) ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Das **Standardkonzentrat (STD)** und die **Kontrollen** (CTRL1, CTRL2) sind bei 2–8 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar.
Die Lösungen für die **Standardkurve** werden aus dem total-sRANKL-Standardkonzentrat (S6) mit Waschpuffer in 1:3 Verdünnungsschritten wie folgt hergestellt.
S6 (Standardkonzentrat)
100 µl S6 + 200 µl Waschpuffer = S5
100 µl S5 + 200 µl Waschpuffer = S4
100 µl S4 + 200 µl Waschpuffer = S3
100 µl S3 + 200 µl Waschpuffer = S2
Als Standard S1 (0 pg/ml) wird Waschpuffer verwendet.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Probenlagerung

Frisch abgenommenes EDTA-Plasma bzw. Serum sollte innerhalb einer Stunde abzentrifugiert werden. Es kann entweder 1 Tag bei Raumtemperatur (15–30 °C) gelagert werden. Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei -20 °C zu lagern. Lipämische oder hämolysierte Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Vor dem Einsatz im Test sollten die Proben gut gemischt werden. Wir empfehlen, alle Proben in Doppelbestimmungen zu analysieren.

EDTA-Plasma- oder Serumproben werden vor dem Einsatz im Test **1:10** verdünnt.

z. B. 50 µl Probe + 450 µl Waschpuffer.

50 µl der Verdünnung werden pro Vertiefung im Test eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der Sandwich-ELISA-Technik. Es werden zwei ausgewählte Antikörper, die humanes sRANKL und OPG erkennen, verwendet.

Teststandards, Kontrollen, verdünnte Patientenproben, die sRANKL enthalten, und die OPG-Lösung werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem hochaffinen polyklonalen anti-human-OPG-Antikörper beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das sRANKL aus der Probe an das OPG gebunden und von dem gekoppelten Fängerantikörper an die Mikrotiterplatte gebunden. Dann wird der Detektionsantikörper (ein biotinmarkierter monoklonaler anti-sRANKL-Antikörper) zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper – humanes OPG – sRANKL – Detektionsantikörper. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugats, das spezifisch an Biotin bindet. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. 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 dem total sRANKL-Gehalt direkt proportional. Anhand einer mitgeführten 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 können abgeklebt 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. | Die Vertiefungen vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. |
|----|--|

2.	50 µl Standards/Kontrollen/verdünnte Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	50 µl SOL (OPG-Lösung) in die Vertiefungen pipettieren.
4.	Streifen abdecken und 16–24 Stunden bei 2–8 °C inkubieren.
5.	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.
6.	100 µl Detektionsantikörper (verdünnter AB) in alle Vertiefungen pipettieren.
7.	Streifen abdecken und 2 Stunden bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubieren.
8.	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.
9.	100 µl Konjugat (verdünntes CONJ) in alle Vertiefungen pipettieren.
10.	Streifen abdecken und 1 Stunde 2–8 °C inkubieren.
11.	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.
12.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
13.	20–30 min* bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
14.	50 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
15.	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.

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-/Plasmaproben

Um die total-sRANKL-Konzentration im Serum/Plasma zu berechnen, wird die ermittelte Konzentration mit **10** multipliziert.

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 müssen stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Standardkurve × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

Analytische Sensitivität × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik 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 die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

Umrechnungsfaktor von pg/ml zu pmol/l

$$1 \text{ pg/ml} = 0.016 \text{ pmol/l}$$

Molmasse: sRANKL wird in der Literatur als Trimer beschrieben – 60 kD; Monomer: 20 kD¹.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 20)

Probe	total sRANKL [pg/ml]	VK [%]
1	618	0,9
2	2 346	3,5

Inter-Assay (n = 20)

Probe	total sRANKL [pg/ml]	VK [%]
1	618	9,3
2	2 346	7,1

Spike-Wiederfindung

Zwei Proben wurden mit unterschiedlichen total sRANKL-Mengen versetzt und gemessen (n = 2).

Probe	Ungespikete Probe [pg/ml]	Spike [pg/ml]	total sRANKL erwartet [pg/ml]	total sRANKL gemessen [pg/ml]
A	104	1 800	1 904	1 961
		1 200	1 304	1 334
		800	904	835
B	151	1 800	1 951	1 943
		1 200	1 351	1 259
		800	951	922

Wiederfindung in der Verdünnung

Zwei Patientenproben wurden verdünnt und im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt (n = 2)

Probe	Verdünnung	total sRANKL erwartet [pg/ml]	total sRANKL gemessen [pg/ml]
A	1:100	1 537	1 537
	1:150	1 025	1 021
	1:200	768	701
B	1:100	1 477	1 477
	1:150	984	1 083
	1:200	731	754

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 20-mal der Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 1,56 pg/ml.

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- 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.

13. 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 den 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 beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. 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.
- 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 Immunodiagnostik 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 Immunodiagnostik AG, zurückzusenden.

15. LITERATUR

Allgemeine Literatur

1. Lacey D.L, et al., Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* (1998), **93**:165-176.
2. Kong Y.Y. et al., OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* (1999), **397**: 315-323.
3. Hsu H. et al., Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci* (1999), **96**:3540-3545.













4. Josien R, et al, TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo. *J Exp Med* (2000), **191**: 495-502.
5. Fuller K. et al., TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med* (1998), **188**: 997-1001.
6. Nakashima T , et. al., Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* (2000), **275**(3):768-75.
7. Kong Y.Y. et al., Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* (1999), **402**: 304-309.
8. Hofbauer L.C. & A.E. Heufelder, Role of receptor activator of nuclear factor-KB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* (2001), **79**: 243-253.
9. Hofbauer L.C. & A.E. Heufelder, The Role of Osteoprotegerin and Receptor Activator of Nuclear Factor KB Ligand in the Pathogenesis and Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* (2001), **44**:253-259.
10. Hofbauer LC, et al., The role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. *J Clin Endocrinol Metab* (2000), **85**: 2355-2363.
11. Teitelbaum S.L., Bone resorption by osteoclasts. *Science* (2000), **289**: 1504-1508.

Literatur mit K 1016

12. Boumans, M.J.H. et al., 2012. Rituximab abrogates joint destruction in rheumatoid arthritis by inhibiting osteoclastogenesis. *Annals of the rheumatic diseases*, **71**(1), pp.108–13.
13. Dovic, A. et al., 2008. Circulating osteoprotegerin and soluble RANK ligand in systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology*, **35**(11), pp.2206–13.
14. Dovic, A. et al., 2007. Increased osteoprotegerin levels in Cushing's syndrome are associated with an adverse cardiovascular risk profile. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **92**(5), pp.1803–8.
15. Findlay, D. et al., 2008. Circulating RANKL is inversely related to RANKL mRNA levels in bone in osteoarthritic males. *Arthritis research & therapy*, **10**(1), p.R2.
16. González-Alvaro, I. et al., 2007. Baseline serum RANKL levels may serve to predict remission in rheumatoid arthritis patients treated with TNF antagonists. *Annals of the rheumatic diseases*, **66**(12), pp.1675–8.

17. Hein, G. et al., 2000. Vergleich der Serum- und Synovia-Spiegel von sRANKL und OPG bei rheumatoider Arthritis und nicht erosiven Arthritiden. Poster beim *Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie*. Dresden.
18. Hein, G.E. et al., 2008. sRANKL and OPG in serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis in comparison to non-destructive chronic arthritis. *Rheumatology international*, **28**(8), pp.765–9.
19. Hofbauer, L.C. et al., 2004. Effects of oral contraceptives on circulating osteoprotegerin and soluble RANK ligand serum levels in healthy young women. *Clinical endocrinology*, **60**(2), pp.214–9.
20. Kamiya, N. et al., 2011. Significance of serum osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor κ B ligand in Japanese prostate cancer patients with bone metastasis. *International journal of clinical oncology*, **16**(4), pp.366–72.
21. Kerschán-Schindl, K. et al., 2008. Serum levels of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) in healthy women and men. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, **116**(8), pp.491–5.
22. Li, E.K. et al., 2009. High prevalence of asymptomatic vertebral fractures in Chinese women with systemic lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology*, **36**(8), pp.1646–52.
23. Nielen, M. et al., 2004. Markers of bone formation and resorption in preclinical rheumatoid arthritis are associated with radiographic progression. Poster beim *American College of Rheumatology Meeting*. San Diego.
24. Oelzner, P. et al., 2009. Beziehung zwischen löslichen Komponenten des IL-6-Systems und des RANKL-OPG-Systems bei postmenopausalen Frauen mit Rheumatoider Arthritis. Poster bei *Osteologie*. Frankfurt.
25. Oelzner, P. et al., 2006. RANKL , Osteoprotegerin und IL-6-System bei Rheumatoider Arthritis – Einfluß von Alter , Erkrankungsdauer , Menopause und entzündlicher Aktivität. Poster bei *Osteologie*. Köln.
26. Schederl, J. et al., 2005. P148 - Osteoprotegerin, RANK-Ligand und 5b-b TRAP bei Patienten mit Morbus Crohn. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, **43**, p.812.
27. Secchiero, P. et al., 2006. An increased osteoprotegerin serum release characterizes the early onset of diabetes mellitus and may contribute to endothelial cell dysfunction. *The American journal of pathology*, **169**(6), pp.2236–44.

Verwendete Symbole:

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

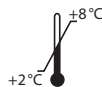
Manual

total sRANKL (human) ELISA

*For the in vitro determination of total sRANKL (human)
in serum and plasma*

Valid from 2022-08-08

REF K 1016



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

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

Table of Contents

1. INTENDED USE	19
2. INTRODUCTION	19
3. MATERIAL SUPPLIED	20
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	21
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	21
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	22
7. ASSAY PROCEDURE	22
<i>Principle of the test</i>	22
<i>Test procedure</i>	23
8. RESULTS	24
9. LIMITATIONS	25
10. QUALITY CONTROL	25
<i>Reference range</i>	25
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	26
<i>Precision and reproducibility</i>	26
<i>Spiking Recovery</i>	26
<i>Dilution recovery</i>	27
<i>Analytical Sensitivity</i>	27
12. PRECAUTIONS	27
13. TECHNICAL HINTS	28
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	28
15. REFERENCES	29
<i>General literature</i>	29
<i>Literature using K1016</i>	30

1. INTENDED USE

The described ELISA is intended for the quantitative determination of total sRANKL (human) in serum and plasma. It is for *in vitro* diagnostic use only.

The assay detects free as well as OPG-bound sRANKL in serum and plasma. Free sRANKL can be mathematically estimated when the assay is performed once with an excess of OPG (free and OPG-bound sRANKL are determined), and then without any addition of OPG (only OPG-sRANKL-complexes already present in the sample are determined).

2. INTRODUCTION

RANKL (receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B ligand; also: osteoprotegerin ligand, OPGL), its cellular receptor, receptor activator of NF- κ B (RANK), and the decoy receptor, osteoprotegerin (OPG), have been identified as the key molecular regulation system for bone remodelling. RANKL, a member of the tumor necrosis factor (TNF) family, is the main stimulatory factor for the formation of mature osteoclasts and is essential for their survival. Therefore, an increase in RANKL expression leads to bone resorption and bone loss. RANKL is produced by osteoblastic lineage cells and activated T lymphocytes. It activates its specific receptor RANK which is located on osteoclasts and dendritic cells.

The effects of RANKL are counteracted by OPG which is secreted by various tissues and acts as an endogenous soluble receptor antagonist.

Imbalances of the RANKL/OPG system have been related to the pathogenesis of Paget's disease, benign and malignant bone tumors, postmenopausal osteoporosis, rheumatoid arthritis, bone metastases and hypercalcemia. It was shown in several studies that in animal models restoring of the RANKL/OPG balance (e.g. by administering OPG) reduces the severity of these disorders.

It has been shown, that RANKL is produced as a membrane-bound protein on murine osteoblasts/stromal cells, and cleaved into a soluble form by a metalloprotease. Stimulators of the osteoclastogenesis such as IL-1 β , IL-6, IL-11, IL-17, and TNF- α , increase the expression of RANKL and decrease OPG expression in osteoblasts/stromal cells. Cytokines inhibiting the osteoclastogenesis such as IL-13, INF- γ , and TGF- β 1, suppress the expression of RANKL and stimulated OPG expression.

Molecular structure:

sRANKL is a part of the TNF superfamily with high similarity to other members of that protein species. (SwissProt No. O14788). Two isoforms are produced by alternate splicing, a type II membrane protein (Isoform 1, 317 AA, MW 35.5 kD), and a secreted molecule (Isoform 2, 244 AA, MW 27.7 kD), lacking the cytoplasmic and transmemb-

rane domain. Although both forms are bioactive, the membrane bound protein seems to be the homeostatic form, while the production of soluble RANKL signals pathological conditions.

Indications

- Postmenopausal and senile osteoporosis
- Diseases with locally increased bone resorption activity
- Paget's disease
- Periodontal disease
- Inflammatory diseases
- Immunological disorders
- Arthritis
- Oncology

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 1016	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 1016	SOL	OPG solution, ready-to-use	5.5 ml
K 1016	STD	Standard, concentrate (concentration see specification or label)	1 vial
K 1016	CTRL1	Control, ready-to-use (for range see specification)	1 vial
K 1016	CTRL2	Control, ready-to-use (for range see specification)	1 vial
K 1016	AB	Detection antibody, biotinylated	1 vial
K 1016	CONJ	Conjugate, streptavidin peroxidase-labelled	1 vial
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	15 ml
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	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*
- Calibrated precision pipettors and 10–1 000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3 000 g
- Vortex
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. STORAGE AND PREPARATION 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** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2–8 °C**. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 1 month**.
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:1001** in **wash buffer** (10 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The **CONJ** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2–8 °C**. **Conjugate** (1:1001 diluted CONJ) **is not stable and cannot be stored**.
- **Preparation of the detection antibody:** detection antibody concentrate (AB) must be diluted **1:1 001** in **wash buffer** (10 µl AB + 10 ml wash buffer). an be used until the expiry date stated on the label when stored at **2–8 °C**. **detection antibody** (1:1001 diluted AB) **is not stable and cannot be stored**.

- The standard concentrate (STD) and the controls (CTRL1, CTRL2) are stable at 2–8 °C until the expiry date stated on the label.

Prepare the solutions for the **standard curve** from the total sRANKL standard concentrate (S6) in 1:3 dilution steps by adding wash buffer as follows:

S6 (standard concentrate)

100 µl S6 + 200 µl wash buffer = S5

100 µl S5 + 200 µl wash buffer = S4

100 µl S4 + 200 µl wash buffer = S3

100 µl S3 + 200 µl wash buffer = S2

Wash buffer is used as standard **S1, 0 pg/ml**.

- 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.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Sample storage

Freshly collected EDTA plasma or serum should be centrifuged within one hour. Samples can be stored for 1 day at room temperature (15–30 °C) or for longer storage at -20 °C.

Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results. Samples should be mixed well before assaying. We recommend duplicate analyses for each sample.

Dilute serum/plasma samples **1:10** with wash buffer prior to analyses.

EDTA plasma or serum samples must be diluted **1:10** before performing the assay,

e.g. 50 µl sample + 450 µl wash buffer., mix well.

50 µl of the dilution are used in the test.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

The assay utilizes the two-site sandwich technique with two selected antibodies that bind to human sRANKL and OPG.

Assay standards, controls, prediluted patient samples containing human sRANKL and the OPG solution are added to wells of microplate coated with a high affinity polyclonal anti-human OPG antibody. After the first incubation period, sRANKL is bound to the OPG and the antibody immobilized on the wall of microtiter wells. Then

a biotinylated monoclonal anti-human sRANKL antibody is added to each microtiter well and a sandwich of capture antibody – human OPG – sRANKL – streptavidin (peroxidase-labeled) is formed. For quantification, a streptavidin horseradish-peroxidase conjugate is added, which specifically binds to biotin. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as a substrate for peroxidase. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The color changes from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of total sRANKL. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. total sRANKL 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 kit. Store unused strips covered 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.	Before use , wash the wells 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add 50 µl of standards/controls/diluted samples into the respective wells.
3.	Add 50 µl of SOL (OPG solution) into the respective wells.
4.	Cover the strips and incubate for 16–24 hours at 2–8 °C .
5.	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.
6.	Add 100 µl detection antibody (diluted AB) in each well.
7.	Cover the strips and incubate for 2 hours at room temperature (15–30 °C).

8.	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.
9.	Add 100 µl conjugate (diluted CONJ) in each well.
10.	Cover the strips and incubate for 1 hour at 2–8 °C.
11.	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.
12.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
13.	Incubate for 20–30 minutes* at room temperature (15–30 °C) in the dark.
14.	Add 50 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.
15.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

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

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/Plasma samples

For the calculation of the total sRANKL concentration in plasma/serum, the result must be multiplied by **10**.

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 must be further diluted and re-assayed. Please consider this greater dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range 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:

analytical sensitivity × sample dilution factor to be used

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 patient 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

Conversion factor for pg/ml to pmol/l

1 pg/ml = 0.016 pmol/l (60 kDa)

Relative molecular mass: sRANKL molecular mass is described in the literature as a trimer molecule of 60 kD; monomer - 20 kDa¹.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 20)

Sample	total sRANKL [pg/ml]	CV [%]
1	618	0.9
2	2 346	3.5

Inter-Assay (n = 20)

Sample	total sRANKL [pg/ml]	CV [%]
1	618	9.3
2	2 346	7.1

Spiking Recovery

Two samples were spiked with different total sRANKL concentrations and measured using this assay (n = 2).

Sample	Unspiked Sample [pg/ml]	Spike [pg/ml]	total sRANKL expected [pg/ml]	total sRANKL measured [pg/ml]
A	104	1 800	1 904	1 961
		1 200	1 304	1 334
		800	904	835
B	151	1 800	1 951	1 943
		1 200	1 351	1 259
		800	951	922

Dilution recovery

Two patient samples were diluted and analyzed. The results are shown below (n = 2):

Sample	Dilution	total sRANKL expected [pg/ml]]	total sRANKL measured [pg/ml]
A	1:100	1 537	1 537
	1:150	1 025	1 021
	1:200	768	701
B	1:100	1 477	1 477
	1:150	984	1 083
	1:200	731	754

Analytical Sensitivity

The Zero-standard was measured 20 times. The detection limit was set as $B_0 + 2 \text{ SD}$ and estimated to be 1,56 pg/ml.

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are harmful to health and the environment. Substrates for enzymatic color reactions can also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances should be avoided. Further safety information can be found in the safety data sheet, which is available from Immunodiagnostik 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.

13. 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 analyzed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on 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 the enclosed manual.

14. 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.
- 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 send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

General literature













1. Lacey D.L, et al., Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* (1998), **93**:165-176.
2. Kong Y.Y. et al., OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* (1999), **397**: 315-323.
3. Hsu H. et al., Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci* (1999), **96**:3540-3545.
4. Josien R, et al, TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo. *J Exp Med* (2000), **191**: 495-502.
5. Fuller K. et al., TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med* (1998), **188**: 997-1001.
6. Nakashima T , et. al., Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* (2000), **275**(3):768-75.
7. Kong Y.Y. et al., Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* (1999), **402**: 304-309.
8. Hofbauer L.C. & A.E. Heufelder, Role of receptor activator of nuclear factor-KB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* (2001), **79**: 243-253.
9. Hofbauer L.C. & A.E. Heufelder, The Role of Osteoprotegerin and Receptor Activator of Nuclear Factor KB Ligand in the Pathogenesis and Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* (2001), **44**:253-259.
10. Hofbauer LC, et al., The role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. *J Clin Endocrinol Metab* (2000), **85**: 2355-2363.
11. Teitelbaum S.L., Bone resorption by osteoclasts. *Science* (2000), **289**: 1504-1508.

Literature using K1016

12. Boumans, M.J.H. et al., 2012. Rituximab abrogates joint destruction in rheumatoid arthritis by inhibiting osteoclastogenesis. *Annals of the rheumatic diseases*, **71**(1), pp.108–13.
13. Dovio, A. et al., 2008. Circulating osteoprotegerin and soluble RANK ligand in systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology*, **35**(11), pp.2206–13.
14. Dovio, A. et al., 2007. Increased osteoprotegerin levels in Cushing's syndrome are associated with an adverse cardiovascular risk profile. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **92**(5), pp.1803–8.
15. Findlay, D. et al., 2008. Circulating RANKL is inversely related to RANKL mRNA levels in bone in osteoarthritic males. *Arthritis research & therapy*, **10**(1), p.R2.
16. González-Alvaro, I. et al., 2007. Baseline serum RANKL levels may serve to predict remission in rheumatoid arthritis patients treated with TNF antagonists. *Annals of the rheumatic diseases*, **66**(12), pp.1675–8.
17. Hein, G. et al., 2000. Vergleich der Serum- und Synovia-Spiegel von sRANKL und OPG bei rheumatoider Arthritis und nicht erosiven Arthritiden. Poster at *Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie*. Dresden.
18. Hein, G.E. et al., 2008. sRANKL and OPG in serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis in comparison to non-destructive chronic arthritis. *Rheumatology international*, **28**(8), pp.765–9.
19. Hofbauer, L.C. et al., 2004. Effects of oral contraceptives on circulating osteoprotegerin and soluble RANK ligand serum levels in healthy young women. *Clinical endocrinology*, **60**(2), pp.214–9.
20. Kamiya, N. et al., 2011. Significance of serum osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor κ B ligand in Japanese prostate cancer patients with bone metastasis. *International journal of clinical oncology*, **16**(4), pp.366–72.
21. Kerschán-Schindl, K. et al., 2008. Serum levels of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) in healthy women and men. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, **116**(8), pp.491–5.
22. Li, E.K. et al., 2009. High prevalence of asymptomatic vertebral fractures in Chinese women with systemic lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology*, **36**(8), pp.1646–52.

23. Nielen, M. et al., 2004. Markers of bone formation and resorption in preclinical rheumatoid arthritis are associated with radiographic progression. Poster at *American College of Rheumatology Meeting*. San Diego.
24. Oelzner, P. et al., 2009. Beziehung zwischen löslichen Komponenten des IL-6-Systems und des RANKL-OPG-Systems bei postmenopausalen Frauen mit Rheumatoider Arthritis. Poster at *Osteologie*. Frankfurt.
25. Oelzner, P. et al., 2006. RANKL , Osteoprotegerin und IL-6-System bei Rheumatoider Arthritis – Einfluß von Alter , Erkrankungsdauer , Menopause und entzündlicher Aktivität. Poster at *Osteologie*. Köln.
26. Schederl, J. et al., 2005. P148 - Osteoprotegerin, RANK-Ligand und 5b-b TRAP bei Patienten mit Morbus Crohn. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, **43**, p.812.
27. Secchiero, P. et al., 2006. An increased osteoprotegerin serum release characterizes the early onset of diabetes mellitus and may contribute to endothelial cell dysfunction. *The American journal of pathology*, **169**(6), pp.2236–44.

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