

Adiponectin ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von

humanem Adiponektin

Deutsch

Enzyme Immunoassay for Quantitative Determination of

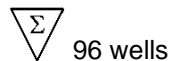
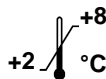
human Adiponectin

English

Europäische Union / European Union,
für In-vitro-Diagnostik / For In Vitro Diagnostic Use
IVD zum Gebrauch durch Fachpersonal! / IVD for professional use!

Alle anderen Länder / All other countries:

Nur für Forschungszwecke. Nicht für diagnostische Anwendungen geeignet.
For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.



REF E09



Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH

















: Aspenhastr. 25 • D-72770 Reutlingen / Germany
Telefon: + 49 - (0) 7121 51484-0 • Fax: + 49 - (0) 7121 51484-10
E-Mail: contact@mediagnost.de • <http://www.mediagnost.de>

EN/ DE/ FR/ IT/ ES/ PT/ NL/ DK/ SE/ PL/ HU/ SK/ CZ/ BG/ EE/ GR/ RO/ SI/ FI

Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ Symbolen/ Symboler/ Symboler/ Symbole/ Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ Символи/ Sümbolid/ Σύμβολα/ Simboluri/ Simboli/ Symbolit

DIN EN ISO 15223-1

	Expiry date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Data di scadenza/ Fecha de caducidad/ Data de validade/ Uiterste gebruiksdatum/ Udløbsdato/ Bäst före-datum/ Termin ważności/ Lejárati idő/ Čas expirácie/ Doba expirace/ Срок на годност/ Αεγυμίσκυρπäv/ Ημερομηνία λήξης/ Data de expirare/ Rok uporabe/ Viimeinen käyttöpäivä
	Consider instructions for use/ Bitte Gebrauchsanweisung beachten/ Consultez la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las instrucciones de uso/ Respeitar as instruções de utilização/ A.u.b de gebruiksaanwijzing volgen/ Se brugsanvisningen/ Läs anvisningarna före användning/ Proszę przeczytać instrukcję obsługi/ Vegye figyelembe a használati utasításban foglaltakat/ Postupujte podľa pokynov na použitie/ Dodržujte návod k použití/ Моля, спазвайте инструкцията за употреба/ Palun järgige kasutusjuhendit/ Λάβετε υπόψη σας τις οδηγίες χρήσης/ Vá rugám szárspectați instrucțiunile de utilizare/ Upoštevejte navodila za uporabo/ Lue käyttöohje huolellisesti!
	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 orvosdiagnostikai termék (in vitro diagnosztikai használatához)/ In vitro diagnostický zdravotnický materiál (určené na diagnostiku „in vitro“)/ In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro“)/ Медицинско устройство за ин-витро диагностика (за ин-витро диагностика)/ in vitro diagnostikaseade (in vitro diagnostika tegemiseks)/ In vitro διαγνωστικό (για διάγνωση in vitro)/ Dispozitiv de diagnosticare in vitro (pentru diagnosticarea in-vitro)/ In vitro diagnostika (o in vitro diagnostiki)/ in vitro-diagnostiikkakäyttö
	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/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-sarzs szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-număr lot/ Številka serije/ Erä
	Manufactured by/ Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por/ Fabricado por/ Vervaardigd door/ Fabrikation af/ Tillverkad av/ Wyprodukowane przez/ Gyártotta/ Vyrobené/ Vyrobeno v/ Производител/ Tootja/ Κατασκευάζεται από/ Produx de/ Proizvajalec/ Valmistaja
	Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/ Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referència/ Referentienummer/ Referencenummer/ Beställningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/ Katalógové číslo/ Objednací číslo/ Каталоген номер/ Tellimisnumber/ Αρ. παραγγελίας/Număr comandă/ Številka naročila/ Viite tai tilausnumero
	Store at between/ Lagerung bei zwischen/ Conserver à entre/ Conservare a tra/ Conservar a temp. entre/ Armazena entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilätada temperatuuridel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ Skladiščenje med/ Säilytys x-y Celsiusasteen lämpötilassa
	Contains sufficient for x tests/ Inhalt ausreichend für x Tests/ Contient suffisant pour x tests/ Contenuto sufficiente per x test/ Contenido suficiente para x pruebas/ Conteúdo suficiente para x testes/ Bevat voldoende voor x bepalingen/ Inholder tilstrækkeligt til x prøver/ Innehållet räcker till x analyser/ Zawartość na x testów/ Tartalma x teszt elvégzésére elegendő/ Obsahuje materiál pre x testov/ Obsah dostahuje pro x testů/ Съдържание достатъчно за x тестове/ Sisust jätkub x katse jaoks/ Το περιεχόμενο επαρκεί για x δοκίμεις/ Conținut suficient pentru x teste/ Vsebina zadostuje za x preizkusov/ Sisältö riittää x testille
	Incubation time/ Inkubationszeit/ Temps d'incubation/ Tempo d'incubazione/ Tiempo de incubación/ Tempo de incubação/ incubatietijd/ Inkubationstid/ inkubationstid/ Czas inkubacji/ Inkubációs idő/ Inkubačná lehota/ Inkubační doba/ Инкубационен период/ Inkubatsiooniaeg/ Χρόνος επώασης/ Timp de incubare/ Inkubacijska doba/ inkubaatioaika
	Incubate at/ Inkubation bei/ Incuber à/ Incubare a/ incubar a/ Incubar a/ incubatietemperatuur/ Inkubation ved/ inkubation vid/ Inkubacja przy/ Inkubáció hőmérséklete/ Inkubácia pri/ Inkubace při/ Инкубира се при/ Inkubatsioon temperatuuril/ Επώαση στους/ Incubare la/ Inkubacija pri/ Inkubaatiolämpötila
	Shaking/ Schütteln/ Mélanger/ Agitare/ Agitar/ Agitação/ Schudden/ Ryster/ Skaka/ Wstrząsanie/ Rázás/ Pretrepat/ Protferpat/ Разклатване/ Raputada/ Ανακινήστε/ Vibrare/ Stresite/ Sekoita
	Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituit en/ Reconstituir em/ Reconstituieren in/ Rekonstituér i/ Rekonstituera/ Rekonstituować w/ Helyreállítás/ Znovu pripravít za/ Znovu pripravít za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti/ Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ Rekonstituoi
	Sample/ Probe/ Echantillon/ Campione/ Muestra/ Amostra/ Monster/ Prøve/ prov/ Próbka/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probă/ Vzorec/ Näyte
	Mikrotiterplate/ Mikrotiterplatte/ plaque de microtitrage/ Piastra di microtitolazione/ Placa de microtitulación/ Placa de Microtitulação/ Microtiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ microtiterplaat/ Płytko microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiterplaat/ Τρυβλίο μικροτιτλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitriska plošča/ Mikrotitruslevy

DET	Antibody-Enzyme Conjugate/ Antikörper-Enzym Konjugat/ Anticorps conjugué-conjugué enzymatique/ Coniugato di anticorpo-enzima/ Conjugado de anticuerpos-enzimas/ Conjugado Anticorpo-Enzima/ Antilichaam-- enzymconjugaat/ Antistoffer-enzym-konjugat/ Antikropps-enzymkonjugat (antikropp-enzym, konjugat)/ Koniugat antyciał-enzymów/ Antitest-enzim páros/ Protílátkový-enzymatický konjugát/ Protílátkový-enzymatický konjugát/ Антитяло-ензим конюгат/ Antikehad-ensüümi konjugaat/ Σύμπλοκο αντισώματος-ενζύμου/ Compuși din anticorpi-enzime/ Antitelesa in konjugat encima/ Vasta-aine-entsvimi koniugaati
DIL	Dilution Buffer/ Verdünnungspuffer/ Tampon de dilution/ Tampone di diluizione/ Tampón de dilución/ / Tampão de diluição / Verdünnungspuffer/ / Fortyndingsbuffer/ Utspádningsbuffert / Bufor rozcieńcający/ / Ηγίγτό puffer/ Riediaci pufor/ Ředící pufr / Буфер за разреждане/ Lahjenduspuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης / Tampon de diluare/ Puffer za redčenje/ Laimennuspuskuri
X:X	Dilute / Verdünnen / Diluer / Diluire / Diluir / Diluir / Verdunnen / Fortyndes / Späd / Rozcieńczenie / Ηγίγτάς / Riediti / Ředit / Разреждане / Lahjendata / Αραιώστε / Diluați / Razredčiti / Laimennetaan
CAL A-E	Calibrator X/ Kalibrator X/ calibreur X/ calibreuse X/ calibrador X/ calibrador X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrátor X/ kalibrátor X/ калибратор X/ kalibraator X/ Βαθμονομητής X/ calibrator X/ kalibrator X/ kalibraattori X
CTR1 / CTR2	Control X/ Kontrolle X/ Contrôle X/ controllo X/ control X/ Controle X/ controle X/ Kontrol X/ Kontroll X/ kontrolne X/ Ellenőrző X/ Kontrolné X/ Kontrolní X/ Контролен X/ Kontroll X/ ελέγχου X/ control X/ Kontrolni X/ Kontrolli X
WB	Washing Buffer Concentrate/ Waschpufferkonzentrat/ Tampon de lavage conc./ Tampone di lavaggio concentrato/ Tampón de lavado concentrado/ Tampão de Lavagem Concentrado/ wasbuffer, geconcentreerd/ Vaskebufferkoncentrat/ Vaskebufferkoncentrat/ tvättbuffertkoncentrat/ Bufor płukania koncentrat/ Mosópuffer koncentrat/ Mosópuffer koncentrátum/ Koncentrát vymývacieho pufra/ Концентрат на промивен буфер/ Pesupuhvri kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spalare/ Koncentrat izpiralnega pufra/ Pesuliuositiiviste
WB 1:20	Washing Buffer/ Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor płukania/ Mosópuffer/ Vymývací pufer/ Vymývací pufr/ Промивен буфер/ Pesupuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spalare /Izpiralni puffer/ Pesuliuos
S	Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Szubsztrátum/ Substrát/ Substrát/ Субстрат Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraattiliuos
STP	Stop Solution/ Stopplösung/ Stop Solution/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ stopoplossing/ Stopopløsning/ Stopplösning/ Stop roztwór/ Megállító oldat/ Roztok na ukončenie/ Roztok pro ukončeni/ Стопираци разтвор/ Stopp-lahus/ Διάλυμα διακοπής/ Soluție de oprire/ Stop raztopina/ Pysäytysliuos
TAPE	Cover Plate with sealing tape/ Platte abkleben/ Recouvrir la microplaque avec bande adhésive/ Coprire la piastra con nastro adesivo/ Cubrir la placa con una cinta adhesiva/ Cobrir a Placa com fita adesiva/ plaatje met tape afdekken/ Afdækningsplade med tape/ maskera platta/ Odkleić plytkę/ Tányér leragasztása/ Oblepiti podložku lepiacou páskou/ Olepit podložku lepicí páskou/ Плака с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerikleepindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperiți placa cu o bandă adezivă/ Prelepiti ploščo/ Peitã mikrotitrauslevy oheisella teipillä
MEASURE	Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590 nm)/ Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)/ Mesure l'absorbance en l'espace de 30 min à 450 nm avec ≥590 nm longueur d'onde pour référence/ Misurazione entro 30 min. a 450 nm (filtro di riferimento ≥ 590 nm)/ Medición de la placa dentro de los siguientes 30 min a 450 nm (filtro de referencia ≥ 590nm)/ Medir a placa dentro de 30 min a 450 nm (Filtro de referência ≥ 590 nm)/ Binnen 30 minuten bij 450 nm meten (referentiefilter ≥ 590 nm)./ Mål plade i løbet af 30 min ved nm (referencefilter ≥590 nm)/ Mät inom 30 min vid 450 nm (referensfilter ≥ 590 nm)./ Pomiar w ciągu 30 min przy 450 nm (filtr odniesienia ≥ 590 nm)/ Ki mérés 30 percen belül 450 nm-nél (referenciaszűrő ≥ 590 nm)/ Merať 30 minút pri 450 nm (Referenčných filtrov ≥590 nm)/ Měřit 30 minut při 450 nm (Referenční filtr ≥ 590 nm)/ Отчитане в рамките на 30 min при 450 nm (референтен филтър ≥ 590 nm)/ Mõõtmine 30 min jooksul 450 nm korral (võrdlusfilter ≥ 590 nm)/ Μέτρηση εντός 30 min στα 450 nm (φίλτρο αναφοράς ≥ 590 nm)/ Măsurare în decurs de 30 min la 450 nm (filtru de referință ≥ 590 nm)/ Izmerite ploščico v 30 min pri 450 nm (referenčni filter ≥590nm)/ Mittaa 30 minuutin aikana 450 nm:ssä (referenssi suodatin ≥ 590 nm)
Literature	Literature/ Literatur/ Bibliographie/ Letterario/ Bibliografía/ Literatura documentação/ literatuur/ Litteratur/ litteratur/ Literatura/ Irodalom/ Literatúra/ Literatura/ Литература// Kirjandus/ Βιβλιογραφία/ Bibliografie/ literatura/ Lähdeluettelo
International Test description	International test description/ internationale Testanleitung/ description internationale de test/ Istruzioni per il test internazionali/ Descripción de ensayo internacional/ Descrição internacional do teste/ internationale testbeskrivning/ international testbeskrivning/ Opis testu międzynarodowego/ nemzetközi teszt-útmutató/ Medzinárodný návod k testu/ Mezinárodní návod k testu/ rahvusvaheline katse kirjeldus/ Διεθνείς οδηγίες για εργαστηριακές δοκιμές/ instrucțiuni internaționale pentru testare/ mednarodna navodila za preizkus/ Kansainvälinen käyttöohje
End	in all required wells/ in allen benötigten Vertiefungen/ dans tous les godets requis/ in tutti i pozzetti richiesti/ en todos los pozos requeridos/ em todos os tubos necessários/ in alle nodige putjes/ i alle nødvendige brønde/ i alla nödvändiga brunnar/ we wszystkich potrzebnych wgłębieniach/ minden szükséges forrásban/ vo všetkých potrebných miestach/ ve všech potřebných místech/ във всички необходими ямки/ kõigis vajalikes süvendites/ σε όλες τις απαραίτητες κοιλότητες/ în toate cavitățile necesare/ v vseh zahtevanih vdolbinah/ kaikkien tarvittaviin mikrotitrauslevyn syvennyksiin

INHALTSVERZEICHNIS / TABLE OF CONTENTS	4
DEUTSCH Gebrauchsanweisung	5
1 ZWECKBESTIMMUNG	5
2 EINFÜHRUNG	5
3 TESTPRINZIP	6
4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	7
5 PROBEN	8
6 MATERIALIEN	9
7 TECHNISCHE HINWEISE	10
8 TESTDURCHFÜHRUNG	11
9 QUALITÄTSKONTROLLE	12
10 AUSWERTUNG	12
11 REFERENZWERTE	14
12 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG	16
13 VERGLEICHSTUDIEN	19
14 WISSENSCHAFTLICHE ANWENDUNGEN	20
ENGLISH Instructions for use	22
15 LITERATUR / REFERENCES	38
16 RÉSUMÉ DU DOSAGE	39
17 INTERNATIONAL TEST DESCRIPTION	40

DEUTSCH Gebrauchsanweisung

Adiponektin ELISA E09	96 Bestimmungen
CE	DE/CA40/00809/18
Testprinzip	Enzyme-linked Immunoassay
Dauer (Inkubationszeit)	1,75 h
Antikörper	Monoklonale Antikörper
Puffer	Gebrauchsfertig und 20-fach Konzentrat
Kalibratoren	5 Einzelkalibratoren: 2 - 100 µg/L, natives humanes Adiponektin
Assay-Bereich	0,27 – 31000 µg/L
Kontrolle	2 Kontrollen, gefriergetrocknet
Proben	humanes Serum / Plasma
Erforderliches Probenvolumen	10 µL
Probenverdünnung	1:310
Analytische Sensitivität	$\varnothing \leq 0,27 \mu\text{g/L}$
Intra- / Interassay Varianz	$\varnothing < 10\%$
Referenzwerte	Langkamp M, Pridzun P, Böttner A, Kiess W, Thiery J, Kratzsch J, Reference Intervals for Adiponectin Levels in Human Serum. 2005 DGKL Annual Meeting Jena.

1 ZWECKBESTIMMUNG

Quantitative Messung von humanem Adiponektin in menschlichem Serum oder Plasma.

1 EINFÜHRUNG

Adiponektin ist ein 30 kDa Protein, das in hoher Konzentration im Serum vorliegt (0,01%). Die Synthese des Proteins erfolgt hauptsächlich durch Adipocyten, aber auch Muskelzellen und Leberzellen sind in der Lage Adiponektin zu synthetisieren. Es besteht aus einer Kollagen-ähnlichen N-terminalen und einer globulären C-terminalen Domäne [1]. In vivo tritt Adiponektin in unterschiedlichen Oligomeren auf. Neben dem Trimer und dem Ditrimer existieren hochmolekulare Multimere [1-3]. Zwei verschiedene Rezeptoren sind bekannt, beide Rezeptoren werden ubiquitär exprimiert, die Verteilung in den Geweben differiert jedoch. So wird der Adiponektin Rezeptor 1 (AdipoR1) besonders im Muskel- und AdipoR2 besonders im Lebergewebe synthetisiert [4].

Studien zeigen, dass Adiponektin negativ mit dem BMI korreliert ist und somit Bedeutung für den Energiestoffwechsel bspw. über die Regulation der Fettsäureoxidation besitzen könnte. Neben der Korrelation zum BMI besteht ein Zusammenhang zwischen der Adiponektinkonzentration und der Insulin-Resistenz [5-7] und damit auch eine Verknüpfung zum Typ II Diabetes. Auch stellt Adiponektin eine Verbindung zwischen Glucose- und Fettstoffwechsel dar [8, 9].

Eine besondere diagnostische Wertigkeit für die hochmolekularen Multimere, wie verschiedentlich beschrieben, konnte in einer vergleichenden Studie von drei kommerziellen Testsystemen nicht nachgewiesen werden [10]. Mittels ROC Analyse konnten Blüher et al eine „Area under the curve“ von 0,92 für die Diagnose einer Insulinresistenz ermitteln. Dies weist auf den möglichen diagnostischen Nutzen der Adiponektin Messung mit dem Mediagnost E09 hin [10].

Des Weiteren ist Adiponektin an inflammatorischen Prozessen beteiligt [11-15] und damit von Bedeutung für die Entstehung von Arteriosklerose [4, 5, 16] und Koronarenentzündungen [17, 18], so könnte die Bestimmung der Adiponektinkonzentration im Plasma dazu dienen, das Risiko von Koronarerkrankungen abzuschätzen [19, 20]. Daneben beeinflusst Adiponektin weitere physiologische Prozesse wie beispielsweise die Angiogenese [21, 22].

2 TESTPRINZIP

Der **Mediagnost ELISA** für **Adiponektin E09** ist ein sogenannter Sandwich-Assay unter Verwendung zweier spezifischer und hochaffiner Antikörper. Der an die Mikrotiterplatte gekoppelte erste Antikörper bindet das Adiponektin aus der Probe. Im nachfolgenden Schritt bindet am derart immobilisierten Adiponektin der zweite spezifische anti-Adiponektin-Antikörper. Dieser ist biotinyliert und liegt als Mischung mit einem Streptavidin-Peroxidase-Enzymkonjugat vor. In der anschließenden Substratreaktion führt eine spezifische enzymatische Reaktion zu einem Farbumschlag. Die Intensität der daraus resultierenden Färbung ist proportional zum Adiponektin-Gehalt der Proben.

3 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Mediagnost Kit ist nur zur In-vitro-Diagnostik und nicht zur inneren Anwendung bei Mensch und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur exakt wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben eingesetzt werden. Mediagnost GmbH kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht, soweit keine gesetzliche Regelung anderes besagt. Ein Sicherheitsdatenblatt ist auf Anforderung verfügbar.

VORSICHT: Dieser Kit enthält Material humanen und/oder tierischen Ursprungs. Die Bestandteile des Kits sind so zu handhaben, als ob sie infektiös wären.

Bitte verwenden Sie keine abgelaufenen, offensichtlich beschädigten, mikrobiell kontaminierten oder ausgelaufenen Reagenzien.

Angemessene Vorsichtsmaßnahmen und die Regeln der guten Laborpraxis müssen bei Lagerung, Gebrauch und Entsorgung der Bestandteile des Kits eingehalten werden. Die Entsorgung der Bestandteile des Kits muss nach den örtlichen Vorschriften erfolgen.

Menschliches Serum:

in folgenden Komponenten enthalten: **Kontrollen CTR1 und CTR2**

Das humane Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, wurde mit negativem Ergebnis auf Humanen Immundefizienz-Virus (HIV I und II), Hepatitis B-Oberflächenantigen und Hepatitis C Virus getestet. Da kein Test das Vorhandensein von infektiösen Erregern völlig ausschließen kann, sollten die Reagenzien wie potentiell infektiöses Material gehandhabt werden.

Reagenzien A-E, DET, DIL, WB

enthalten als Konservierungsmittel eine Mischung aus **5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one und 2-methyl-4-isothiazolin-3-one** (<0,015%)

H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
P272	Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
P261	Einatmen von Dampf vermeiden.
P333+P313	Bei Hautreizung oder –ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P302+P352	BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.
P501	Entsorgung des Inhalts /des Behälters gemäß den örtlichen / regionalen / nationalen / internationalen Vorschriften.

Substrat S

Das TMB-Substrat (S) enthält 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin.(<0.05%)

H315	Verursacht Hautreizungen.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H335	Kann Atemwege reizen.
P261	Einatmen von Staub/ Rauch/ Gas/ Nebel/ Dampf/ Aerosol vermeiden.
P305+P351+	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen.
P338	Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

Stopplösung STP

Die Stopplösung enthält 0,2 M Schwefelsäure (H₂SO₄)

H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
H314	Verursacht schwere Verätzung der Haut und schwere Augenschäden.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
P301+P330+	BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen.
P331	KEIN Erbrechen herbeiführen.
P305+P351+	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen.
P338	Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
P309+P310	BEI Exposition oder Unwohlsein: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

3.1 Erste-Hilfe Maßnahmen:

Nach Hautkontakt: Nach Berührung mit der Haut mindestens 15 Minuten lang mit genügend Wasser abwaschen. Kontaminierte Kleidung und Schuhe wechseln.

Nach Augenkontakt: Nach Berührung mit den Augen mindestens 15 Minuten lang mit genügend Wasser spülen. Ausreichende Spülung durch Spreizung der Augenlider sicherstellen.

Nach Verschlucken: Mund mit Wasser ausspülen, vorausgesetzt die Person ist bei Bewusstsein. Sofort einen Arzt zuziehen.

4 PROBEN

4.1 Probenmaterial

Serum und Plasma

Serum und Heparin -Plasma ergeben vergleichbare Werte. EDTA- und Citrat Plasma Proben werden mit 18% tieferen Adiponektinwerten gefunden.

4.2 Probenentnahme

Das Blut zur Probengewinnung mittels standardmäßiger Venenpunktion entnehmen. Hämolytische Reaktionen sind zu vermeiden.

4.3 Erforderliches Probenvolumen: 10 µL

4.4 Probenstabilität

In fest verschließbaren, geeigneten Probengefäßen

- Lagerung bei 20-25°C 2 Tage
- Lagerung bei -20°C mind. 2 Jahre
- Gefrier-Auftau-Zyklen max. 3

Die Lagerung von Proben über einen Zeitraum von 2 Jahren bei -20°C zeigte keinen Einfluss auf den Messwert. Einfrieren und Auftauen der Proben sollte minimiert werden. 3 Frier-Tauzyklen zeigten keinen Einfluss auf die gemessene Adiponektinkonzentration.

4.5 Interferenz

Hämoglobin, Triglyceride und Bilirubin in der Probe stören nicht bis zu einer Konzentration von **5mg/mL**, **100 mg/mL** bzw. **100 µg/mL**. Der Einsatz hämolytischer, lipämischer oder ikterischer Proben muss jedoch zuvor vom Anwender validiert werden.


4.6 Probenverdünnung

- Verdünnung: **1:310** mit Verdünnungspuffer **DIL**
- Beispiel: **10 µL** Probe werden zu **300 µL** Verdünnungspuffer **DIL** in PE-/PP-Gefäß gegeben (Verdünnung 1:31). In ein weiteres PE-/PP-Gefäß **900 µL** Verdünnungspuffer **DIL** vorlegen und **100 µL** von der gutdurchmischten ersten Verdünnung geben (Verdünnung 1:10). Nach dem Mischen werden von dieser Lösung mit einer Endverdünnung von 1:310 2x100 µL im Assay eingesetzt
- Die verdünnte Probe ist für mindestens eine Stunde stabil.

5 MATERIALIEN

5.1 Inhalt der Testpackung

Die im Kit gelieferten Reagenzien sind ausreichend für 96 Tests einschließlich der Kalibrationskurve.

MTP	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, beschichtet mit Maus-anti-Adiponektin-Antikörper. Die Vertiefungen sind einzeln abbrechbar.	(8x12) Vertiefungen
A-E	Kalibratoren , lyophilisiert (native humanes Adiponektin), die Konzentrationen sind auf den Etiketten und auf dem Qualitätszertifikat in ng/mL angegeben.	5 x 750 µL
CTR1	Kontrolle 1 , lyophilisiert, (humanes Serum), die Konzentration ist auf dem Qualitätszertifikat in ng/mL angegeben.	1 x 500 µL
CTR2	Kontrolle 2 , lyophilisiert, (humanes Serum), die Konzentration ist auf dem Qualitätszertifikat in ng/mL angegeben.	1 x 500 µL
DET	Antikörper-POD-konjugat , gebrauchsfertig, Maus-anti-hAdiponektin-Antikörper biotinyliert + Streptavidin Peroxidase-Konjugat	1 x 12 mL
DIL	Verdünnungspuffer , gebrauchsfertig	1 x 125 mL
WB	Waschpuffer WB , 20fach konzentrierte Lösung	1 x 50 mL
S	Substrat S , gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase (POD)-Substrat, stabilisiertes Tetramethylbenzidin.	1 x 12 mL
STP	Stopplösung STP , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure.	1 x 12 mL
-	Abdeckfolie für die Mikrotiterplatte	2 x
	Packungsbeilage	1 x
-	Qualitätszertifikat	1 x

5.2 Nicht mitgelieferte, benötigte Materialien

- Entmineralisiertes Wasser oder destilliertes Wasser (Aqua destillata) (**A. dest.**), 950 mL.
- Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen
- Einmalröhrchen aus Polyethylen PE/ Polypropylen PP Röhrchen zum Verdünnen der Proben
- Vortex-Mixer
- Mikrotiterplattenschüttler (350 rpm)
- Mikrotiterplattenwisher (empfohlen)
- Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und ≥ 590 nm

6 TECHNISCHE HINWEISE

Lagerbedingungen

Nach Erhalt sollte der Test-Kit bei 2 - 8°C (rekonstituierte Reagenzien bei -20°C) bis zum Verfallsdatum gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Haltbarkeit

Die Haltbarkeit der Reagenzien **nach Öffnung** beträgt 4 Wochen. Nicht verwendete Streifen **der Testplatte** sind zusammen mit dem Trockenkissen **luftdicht** in dem wiederverschließbaren Klippbeutel bei 2° - 8°C zu lagern. Die Streifen bitte nur in dem mitgelieferten Rahmen verwenden. **Rekonstituierte Komponenten** (Kalibratoren **A – E** und Kontrollen **CTR1 und CTR2**) sollten bei -20°C aufbewahrt werden. Zur weiteren Verwendung schnell aber schonend Auftauen (keine Temperaturerhöhung über Raumtemperatur und kein übermäßiges Vortexen), bis zu 3 dieser Einfrier-Auftauzyklen zeigten keinen Einfluss auf den Test. Der 1:20 gebrauchsfertig verdünnte Waschpuffer **WB** ist nur 4 Wochen haltbar.

Vorbereitung der Reagenzien

Alle Komponenten des Kits müssen **vor Gebrauch auf Raumtemperatur** 20-25°C gebracht werden, die evtl. in manchen Puffern vorhandenen Präzipitate müssen vor Gebrauch durch Mischen und Erwärmen wieder gelöst werden. Reagenzien aus Kits mit unterschiedlichen Chargen-Nummern sollten nicht vermischt werden.

Rekonstitution

Die Kalibratoren **A – E** und Kontrollen **CTR1 und CTR2** werden mit dem im Kit enthaltenen Probenpuffer **DIL** rekonstituiert. Es empfiehlt sich zum Rekonstituieren die Reagenzien 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen zu lassen und sie anschließend kräftig mit einem Vortex-Mixer zu mischen. Schaumbildung sollte jedoch vermieden werden.

Verdünnung

Nach der Rekonstitution werden die Kontrollen **CTR1 und CTR2** im gleichen Verhältnis (1:310) wie die Proben mit dem Verdünnungspuffer **DIL** verdünnt.

Das benötigte Volumen des Waschpuffers **WB** wird vorbereitet, indem das 20fach Konzentrat im Verhältnis 1:20 mit Aqua dest. verdünnt wird.

Inkubation

Inkubation bei Raumtemperatur bedeutet: **Inkubation bei 20 - 25°C**. Das Substrat **S**, stabilisiertes H₂O₂-Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich–Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

Testdurchführung

Die Messungen (Leerwert, Kalibratoren **A-E**, Kontrollen **CTR1 und CTR2** und Proben) sollten stets in Doppelbestimmung durchgeführt werden. Um optimale Ergebnisse zu erhalten, ist auf genaues Pipettieren und strikte Befolgung des Testprotokolls zu achten. Bei der Testdurchführung sollten Kalibratoren **A-E**, Kontrollen **CTR1, CTR2** und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden z.B. in 15 Minuten). Das Antikörper-POD-Konjugat **DET** sowie nachfolgend das Substrat **S** und die Stopplösung **STP** sollten in der gleichen Reihenfolge und in dem gleichen Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

Schütteln

Die Inkubationen sollen geschüttelt bei mittlerer Umdrehungsfrequenz eines für Mikrotiterplatten geeigneten Schüttlers erfolgen. Wir empfehlen 350 rpm. Bauartbedingt können individuell Abweichungen von diesem Wert möglich sein, dann muss die Umdrehungsfrequenz angepasst werden. Zu geringes Schütteln kann durch ungenügende Vermischung der Lösungen zu verringerten optischen Dichten, hohen Streuungen und/oder falschen Werten führen, zu starkes Schütteln dagegen zu erhöhten optischen Dichten und/oder falschen Werten.

Waschen

Korrektes Waschen ist von grundlegender Bedeutung für den sicheren, richtigen und präzisen Ablauf des Testes. Ungenügendes Waschen ist eine häufige Ursache für nicht valide Testdurchführungen. Mögliche Folgen sind unkontrollierte unspezifische Variationen der gemessenen optischen Dichten, die zu falschen Ergebnisberechnungen der Proben führen können. Mögliche Hinweise darauf sind z.B. hohe Leerwerte und variabel streuende Messwerte. Zum Waschen muss der mitgelieferte und auf Gebrauchskonzentration verdünnte Waschpuffer verwendet werden. Das Waschvolumen pro Waschzyklus und Vertiefung muss mindestens 300 µL betragen.

Bei Gebrauch eines speziellen **automatischen Mikrotiterplattenwashers** ist unbedingt dessen Gebrauchsanweisung zu befolgen. Die Geräteeinstellungen müssen u.a. der Mikrotiterplattengeometrie und den Parametern der Waschspezifikation angepasst werden. Es ist zu beachten, dass die Dispensier- und Absaugkapillaren des Gerätes nicht die Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterplatte beschädigen. Die verbleibende Restflüssigkeit nach jedem Absaugen muss minimiert werden. Nach Ende des gesamten Waschvorganges sollte die Menge der verbleibenden Restflüssigkeit überprüft und ggfs. verringert werden durch mehrmaliges Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fuselndem Zellstoff.

Manuelles Waschen ist eine gute Alternative. Die Waschflüssigkeit kann dabei per Multistepper, Mehrkanalpipette oder auch mit einer Spritzflasche dispensiert werden. Die Waschflüssigkeit kann durch schwingvolles Ausschwenken der Mikrotiterplatte über einem Becken entfernt werden. Falls Absaugvorrichtungen eingesetzt werden, ist darauf zu achten, dass die Oberflächen der Vertiefungen der Mikrotiterplatte nicht beschädigt werden. Nach jedem einzelnen Waschzyklus sollte die verbleibende Restflüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fuselndem Zellstoff gründlich entfernt werden.

7 TESTDURCHFÜHRUNG

Vorbereitung der Reagenzien

Reagenzpräparation:		Rekonstitution:	Verdünnung:
A-E	Kalibratoren	in 750 µL Verdünnungspuffer DIL	-
CTR1 & CTR2	Kontrollen	in 500 µL Verdünnungspuffer DIL	1:310 mit DIL
WB	Waschpuffer	-	1:20 with Aqua dest. → WB 1:20
Proben mit Verdünnungspuffer DIL 1:310 verdünnen.			
Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen.			
Testdurchführung in Doppelbestimmung:			
Pipettieren	Reagenzien	Position	
100 µL	Verdünnungspuffer DIL (Leerwert)	A1/A2	
100 µL	Calibrator A (2 ng/mL)	B1/B2	
100 µL	Calibrator B (10 ng/mL)	C1/C2	
100 µL	Calibrator C (30 ng/mL)	D1/D2	
100 µL	Calibrator D (70 ng/mL)	E1/E2	
100 µL	Calibrator E (100 ng/mL)	F1/F2	
100 µL	Kontrolle CTR1 (1:310 verdünnt)	G1/G2	
100 µL	Kontrolle CTR2 (1:310 verdünnt)	H1/H2	
100 µL	Probe SPE (1:310 verdünnt)	in die restlichen Vertiefungen nach Bedarf pipettieren	
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.			
Proben-Inkubation: 1 h bei 20-25°C, 350 rpm			
3x 300 µL	Absaugen und die Platte 3x mit je 300 µL Waschpuffer WB 1:20 / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung	
100 µL	Antikörper-POD-Konjugat DET	In jede Vertiefung	
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.			
Inkubation: 30 Minuten bei 20-25°C, 350 rpm			
3x 300 µL	Absaugen und die Platte 3x mit je 300 µL Waschpuffer WB 1:20 / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung	
100 µL	Substrat S	In jede Vertiefung	
Substrat S Inkubation: 15 Minuten im Dunklen bei 20-25°C			
100 µL	Stopplösung STP	In jede Vertiefung	
Messung der Absorption innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm).			

8 QUALITÄTSKONTROLLE

GLP erfordert, dass mit jeder Kalibrationskurve Kontrollen mitgeführt werden. Um eine ordnungsgemäße Durchführung zu gewährleisten, sollte eine statistisch signifikante Anzahl der Kontrollen untersucht werden, um Mittelwerte und akzeptable Bereiche zu ermitteln. Die Kit-Kontrolle muss innerhalb des zulässigen Bereichs, der auf dem QC-Zertifikat angegeben ist, gefunden werden. Wenn die Kriterien nicht erfüllt sind, ist der Test ungültig und sollte wiederholt werden.

8.1 Qualitätskriterien

Zur Auswertung des Testes sollte gewährleistet sein, dass die Extinktionen des Leerwertes 0,25 Einheiten nicht überschreiten, Calibrator E sollte dagegen Extinktionen über 1,0 Einheiten erreichen. Proben, die höhere Extinktionen als der Calibrator E erzielen, liegen außerhalb der Kalibrationskurve, zur sicheren Bestimmung sollten diese Proben in einer zweiten Testdurchführung bei höherer Verdünnung nochmals bestimmt werden.

9 AUSWERTUNG

9.1 Erstellung der Kalibrationskurve

Die bereitgestellten Kalibratoren enthalten folgende Adiponektinkonzentrationen:

Kalibrator	A	B	C	D	E
ng/mL	2	10	30	70	100

- 1) Ermittlung des **Mittelwertes** der optischen Dichte des Leerwertes aus den Doppelbestimmungen (Vertiefung A1/A2).
- 1) Von den Mittelwerten der optischen Dichte der Kalibratorkonzentrationen und der Proben wird der mittlere Leerwert abgezogen.
- 2) Die Kalibratorkonzentrationen (x-Achse) werden gegen die gemessene optische Dichte (y-Achse) aufgetragen.
- 3) Die Berechnung der Kalibrationskurve sollte durch ein statistisches Programm erfolgen, da die Kurve i. Allg. nicht ideal durch eine lineare Regression beschrieben wird. **Ein höhergradiges Polynom, 4-Parameter-Anpassungen** oder **nicht-lineare Regression** sind zur Auswertung geeignet, in manchen Fällen kann eine Spline oder Punkt-zu-Punkt Anpassung angebracht sein.
- 4) Die Multiplikation des jeweiligen für die Proben bzw. Kontrollen CTR1 und CTR2 berechneten Adiponektingehaltes mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor der Proben ergibt die Adiponektinkonzentration in ng/mL

9.2 Beispiel einer typischen Kalibrationskurve

Die exemplarischen Daten und die Kalibrationskurve in der Abbildung 1 können **nicht** für die Berechnung der Testergebnisse genutzt werden! Für jeden Test muss eine eigene Kalibrationskurve mitgeführt werden.

	Leerwert	A	B	C	D	E
ng/mL	0	2	10	30	70	100
OD (450-620 nm)	0,008	0,071	0,357	1,022	2,053	2,817

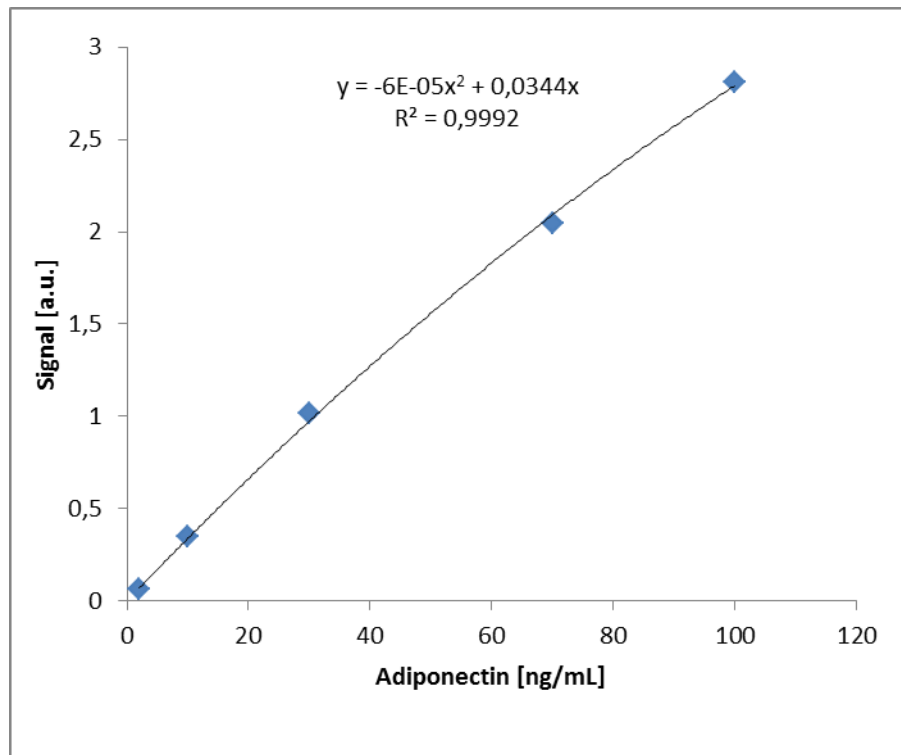


Abbildung 1 Exemplarische Kalibrationskurve

9.3 Beispielhafte Berechnung der Adiponektin-Konzentration

Probenverdünnung: 1:310

Gemessene Extinktion der Probe: 0,408

Gemessene Extinktion des Leerwertes: 0,008

Aus der Differenz der Probenextinktion und der Extinktion des Leerwertes (0,40) **berechnet Ihr Auswertungsprogramm** mit der entsprechenden Kurvenanpassung (hier: Polynom 2. Grades) die Adiponektinkonzentration der verdünnten Probe durch Auflösen der Gleichung aus Abb. 1 nach x. In diesem Fall ergibt sich eine Adiponektinkonzentration in der verdünnten Probe von

$$0,400 = -6 \times 10^{-5}x^2 + 0,0344x$$

$$11,89 = x$$

und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (**1:310**) somit eine Adiponektin-Konzentration in der unverdünnten Probe von

$$11,89 \times 310 = 3685,9 \text{ ng/mL} = 3,69 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

9.4 Interpretation der Ergebnisse

Das Testergebnis allein sollte nicht der einzige Grund für therapeutische Entscheidungen sein. Die Ergebnisse sollten in Bezug auf die Anamnese, weitere klinische Beobachtungen und den Resultaten anderer diagnostischer Untersuchungen interpretiert werden. Darüber hinaus empfehlen wir, dass jedes Labor seine für die relevante Patientengruppe eigenen Referenz-Bereiche und Grenzwerte ermittelt.

9.5 Einschränkungen

Der Mediagnost Adiponektin ELISA E09 basiert auf Antikörpern. Im Allgemeinen kann diese Technik durch heterophile Antikörper oder Rheumafaktoren in der Probe beeinflusst werden. Dieser Einfluss wird durch das Assay-Design reduziert, aber kann nicht vollständig ausgeschlossen werden.

10 REFERENZWERTE

Die Erwartungswerte für Adiponektin wurden mit dem Mediagnost ELISA E09 in Proben von gesunden Probanden bestimmt und analysiert durch Herrn Prof. Dr. J. Kratzsch, Institut für Laboratoriumsmedizin der Universitätsklinik Leipzig. Die Daten zeigen eine deutliche Abhängigkeit der Adiponektin-Serumwerte vom Alter sowie vom Geschlecht der Probanden, die Abhängigkeit vom jeweiligen BMI fällt dagegen wesentlich weniger signifikant aus. Bei Neugeborenen werden sehr hohe Werte gefunden. Nachfolgend sind verschiedene Gruppierungen der Daten statistisch analysiert worden, je nach Fragestellung können die am besten geeigneten Bereiche verwendet werden (Tab.1).

Tabelle 1a Erwartungswerte Adiponektin für Erwachsene, geschlechtsspezifischer Mittelwert sowie Median, Angabe der 5. und 95. Perzentile.

Geschlecht	n	Mittelwert [µg/ml]	Median [µg/ml]	Standard- abweichung	5. Perzentile [µg/ml]	95. Perzentile [µg/ml]
Frauen	101	10,2	9,1	4,6	4,0	19,4
Männer	125	6,8	6,1	4,1	2,0	13,9
Gesamt	226	8,3	7,5	4,6	2,4	19,3

Tabelle 1b Erwartungswerte Adiponektin für Kinder und Jugendliche, geschlechtsspezifischer Mittelwert sowie Median, Angabe der 5. und 95. Perzentile.

Geschlecht	n	Mittelwert [µg/ml]	Median [µg/ml]	Standard- abweichung	5. Perzentile [µg/ml]	95. Perzentile [µg/ml]
Mädchen	131	8,71	8,18	4,32	3,05	15,6
Jungen	134	8,97	8,12	5,13	3,36	18,6
Gesamt	265	8,84	8,18	4,74	3,33	16,5

Tabelle 1c Erwartungswerte Adiponektin, altersspezifischer Mittelwert sowie Median, Angabe der 5. und 95. Perzentile.

Altersgruppe (in Jahren)	n	Mittelwert [µg/ml]	Median [µg/ml]	5. Perzentile [µg/ml]	95. Perzentile [µg/ml]
< 7,99	46	12,82	11,7	2,33	26,5
8 – 9,99	40	8	8,09	3,96	14,9
10-11,99	55	8,02	7,14	3,36	13,8
12 – 13,99	26	8,21	7,54	4,5	13,2
14 – 15,99	59	8,12	8,09	3,67	13,7
16 – 19,99	41	7,97	7,79	2,74	13,3
alle	267	8,88	8,18	3,33	16,7
20 – 29,99	47	6,72	6,38	2,50	12,25
30 – 39,99	38	7,38	6,69	1,98	19,29
40 – 49,99	55	8,42	8,20	2,41	17,85
50 – 59,99	47	9,61	8,55	2,15	19,85
> 60	32	9,52	8,57	3,00	21,10
alle	226	8,33	7,5	2,41	19,29

Tabelle 1d

Erwartungswerte Adiponektin, **altersspezifischer** und **geschlechtsspezifischer** Mittelwert sowie Median, Angabe von BMI sowie der 25. und 75. Perzentile.

weiblich			Adiponektin (µg/ml):			
Alter: (in Jahren)	n:	BMI: MW ± SA	MW ± SA:	Median:	Perzentile: 25.- 75.	Min. – Max.:
Neugeborene Nabelschnurblut	19		29,80 ± 12,49	26,1	19,5 - 35,2	16,9 - 61,4
< 3,99	9	15,73 ± 0,79	14,43 ± 7,76	11,2	8,2 - 21,8	2,3 - 26,7
4,0 - 7,99	11	16,01 ± 1,94	8,46 ± 4,73	9,3	2,9 - 12,1	1,4 - 15,6
8,0 - 9,99	22	17,58 ± 3,84	7,92 ± 3,00	8,2	5,2 - 10,0	3,6 - 15,1
10,0 - 11,99	33	17,83 ± 1,86	7,66 ± 4,59	6,6	5,0 - 8,8	3,1 - 20,9
12,0 - 13,99	11	19,85 ± 2,31	8,22 ± 5,64	7,5	6,5 - 9,2	4,9 - 13,2
14,0 - 15,99	27	19,91 ± 1,72	8,83 ± 9,25	8,9	5,2 - 11,8	2,6 - 17,7
16,0 - 19,99	18	21,64 ± 2,64	9,00 ± 3,22	8,7	6,9 - 11,2	2,7 - 14,0
20,0 - 29,99	24	23,12 ± 5,01	7,39 ± 3,35	7,3	5,7 - 9,0	3,4 - 17,8
30,0 - 39,99	17	23,20 ± 2,86	9,19 ± 3,89	8,6	7,2 - 10,4	3,6 - 19,3
40,0 - 49,99	26	24,50 ± 4,11	9,93 ± 3,59	9,5	7,5 - 11,6	4,4 - 19,6
50,0 - 59,99	21	24,61 ± 3,31	11,5 ± 5,49	10,0	8,0 - 15,9	2,0 - 23,1
>60,0	8	24,63 ± 1,89	15,6 ± 4,64	15,3	11,4 - 18,2	11,2 - 24,1

männlich			Adiponektin (µg/ml):			
Alter: (in Jahren)	n:	BMI: MW ± SA	MW ± SA:	Median:	Perzentile: 25.- 75.	Min. – Max.:
Neugeborene Nabelschnurblut	10		27,80 ± 7,68	26,7	22,2-31,0	15,6 - 40,6
< 3,99	14	16,17 ± 1,81	16,57 ± 6,55	14,3	11,6-21,2	5,8 - 40,3
4,0 - 7,99	12	15,69 ± 1,05	11,24 ± 5,43	9,7	8,9-15,9	3,5 - 18,6
8,0 - 9,99	18	16,45 ± 1,76	8,11 ± 2,93	7,6	6,2-9,1	5,00 - 15,4
10,0 - 11,99	21	18,34 ± 2,18	8,43 ± 3,91	7,8	5,2-10,9	3,4 - 20,2
12,0 - 13,99	14	18,61 ± 2,11	7,59 ± 2,86	7,1	6,0-10,3	2,4 - 12,2
14,0 - 15,99	32	19,86 ± 2,00	7,53 ± 2,52	7,4	5,1-9,3	3,8 - 15,4
16,0 - 19,99	23	22,03 ± 2,42	7,16 ± 3,53	6,9	4,2-9,6	2,0 - 13,9
20,0 - 29,99	23	23,43 ± 2,48	5,44 ± 2,29	5,8	4,0-6,9	1,3 - 10,3
30,0 - 39,99	21	23,33 ± 2,72	5,92 ± 4,60	4,4	2,7-6,7	1,9 - 20,6
40,0 - 49,99	22	23,79 ± 2,41	6,13 ± 2,92	5,5	3,8-8,3	2,1 - 11,6
50,0 - 59,99	23	26,68 ± 2,77	7,45 ± 4,50	6,7	5,0-8,8	1,4 - 19,6
>60,0	24	25,72 ± 2,12	7,48 ± 3,92	7,6	4,6-9,2	3,0 - 21,1

n=Anzahl; MW=Mittelwert BMI=Body Mass Index (kg/m²) SA=Standardabweichung

11 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG

11.1 Sensitivität

Die analytische Sensitivität wurde basierend auf der zweifachen Standardabweichung des Null-Signals (Blank) berechnet. Sie beträgt für den Mediagnost ELISA E09 im Mittel 0,27 ng/mL (Bereich 0.094 - 0,59 ng/ml).

11.2 Spezifität

Adiponectin existiert in verschiedenen oligomeren Molekulargewicht-Formen: die hohe, mittlere und niedrige Form. Eine unterschiedliche Anzahl von Adiponectin monomeren aggregieren spezifisch zu einem Komplex. In Figur 2a sind die fünf verschiedenen Formen des menschlichen Adiponectins schematisch dargestellt. Parallel werden die Ergebnisse einer Größenausschluss-Chromatographie von human Serum, bestimmt mit dem Mediagnost E09 Adiponectin ELISA, angezeigt.

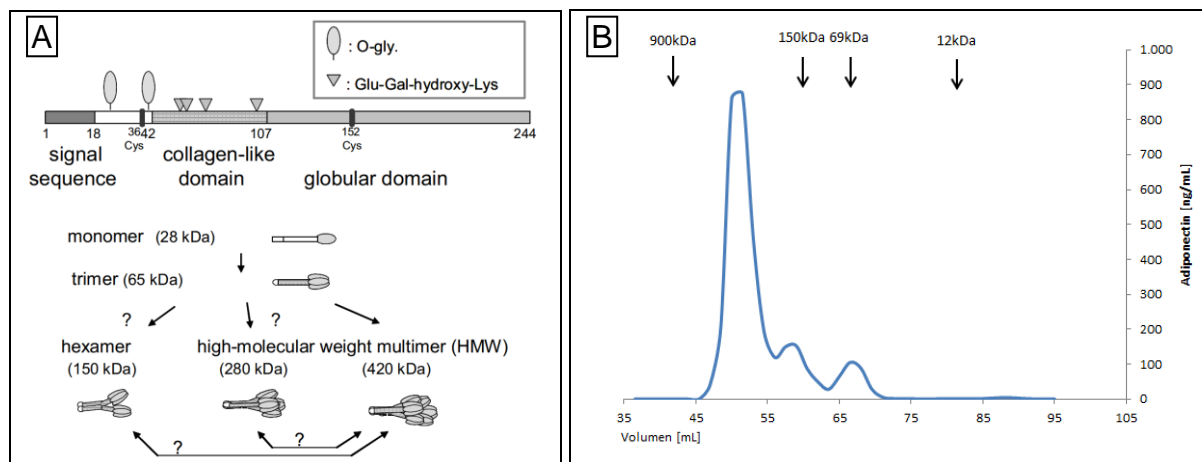


Abbildung 2 Adiponectin Struktur (A) proteinartigen Struktur des menschlichen Adiponectin einschließlich posttranslationaler Modifikationen und multimeren Formen (von Nakano et al). (B) Ergebnisse einer Serumentrennung mittels Größenausschluss-Chromatographie. Die Probe wurde fraktioniert und der Adiponectingehalt jeder Fraktion wurde durch Mediagnost E09 gemessen, Zum Vergleich werden die entsprechenden Größen in kDa durch die schwarzen Pfeile angedeutet.

Die Ergebnisse in 2b zeigen, dass Mediagnost E09 Adiponectin ELISA alle Formen von im menschlichen Serum vorhandenen Adiponectin erfasst: das Trimer bei 65 kDa, das Hexamer in 150 kDa und die Formen mit hohem Molekulargewicht von > 280 kDa.

Mediagnost E09 Adiponectin ELISA misst daher total Adiponectin.

11.3 Präzision

Intra-Assay Varianz

Intra-Assay Varianz und Genauigkeit werden beispielhaft mit zwei Proben dargestellt (Tabelle 2). Die Adiponectinkonzentrationen dieser Proben wurde dazu in einem Assay mehrfach gemessen.

Tabelle 2 Intra-Assay-Variation. Rekombinantes Adiponectin wurde in Verdünnungspuffer verdünnt und diese Probe mehrfach in einem Test eingesetzt.

	Bestimmungen [n]	Mittelwert [µg/L]	Standardabweichung [µg/L]	VK [%]	Sollwert [µg/L]
Probe 1	8	7,108	0,22	3,14	6
Probe 2	8	107,96	3,97	3,67	100

In beiden Proben ist die Variabilität geringer als 5% und die Abweichung von der Zielkonzentration kleiner als 20%.

Inter-Assay-Varianz und Genauigkeit

Serumproben wurden in unabhängigen Tests gemessen. Im Durchschnitt betrug der Variationskoeffizient 7,5% (SD 1,6). Die Ergebnisse von 5 verschiedenen Proben, deren Adiponektin Gehalt bis zu 174x bestimmt wurde sind in Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3 Inter-Assay Variation

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5
Mittelwert [µg/mL]	4,72	5,25	8,36	5,45	22,29
VK [%]	8,16	8,14	6,93	8,05	7,30
n	99	68	62	174	62

11.4 Linearität

Die Linearität der Probenverdünnung wurde durch die serielle Verdünnung von Serumproben getestet (1:100 - 1:4000) Keine der verdünnten Proben zeigte eine Abweichung > 30% im Vergleich zu dem mittleren Adiponektin Gehalt aller Verdünnungen.

Tabelle 4 Linearität. Serumproben wurden mit Verdünnungspuffer DIL verdünnt und der Adiponektin Gehalt wurde zurückberechnet.

µg/mL	Mittel	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1000	1:2000	1:4000
Probe 1	5,76	6,53	6,331	5,764	5,49	6,067	6,114	4,056
Probe 2	11,53	10,93	12,107	11,395	11,454	11,567	12,884	10,362
Probe 3	12,07	13,57	12,853	12,03	11,974	11,338	11,548	11,169
Probe 4	4,89	4,659	4,886	4,384	4,425	5,851	5,13	n/a

Zusätzlich Verdünnungen von 1:1500 bis 1:96000 wurden mit zwei Proben untersucht. Die in Abbildung 3 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass in den getesteten Proben kein Verdünnungseffekt auf die gemessenen Adiponektinkonzentration nachgewiesen werden kann. Die Abweichung von der der erwarteten Adiponektinkonzentration betrug in den Verdünnungen weniger als 30%.

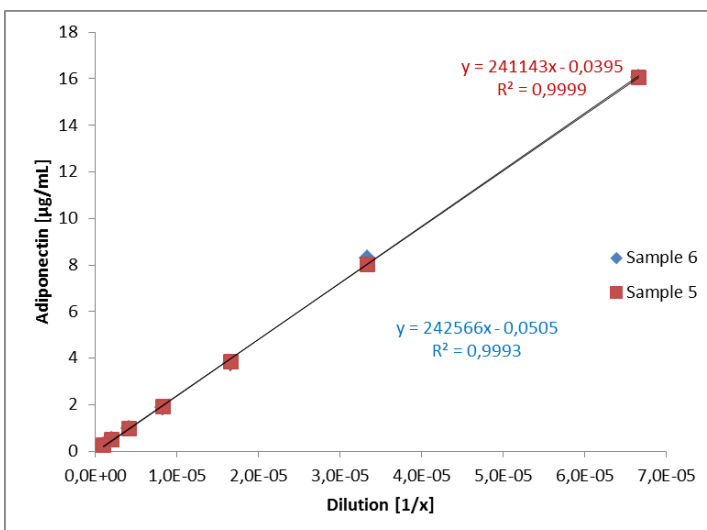


Abbildung 3 Linearität. Zur Bestimmung der Linearität wurden zwei Serumproben in einem Bereich von 1:1500 bis 1:96000 verdünnt und die Adiponektinkonzentration in den jeweiligen Verdünnungen gemessen.

11.5 Wiederfindung und Richtigkeit

Die Richtigkeit und Rückführbarkeit des Mediagnost Adiponektin ELISA E09 wurde mittels Untersuchungen zur Wiederfindung von rekombinantem Adiponektin in Serum gezeigt. Die Wiederfindung des rekombinanten Adiponektins betrug in einer Serummatrix durchschnittlich 110%.

Tabelle 5 Wiederfindung von rekombinantem humanen Adiponektin in Serum. Rekombinantes Adiponektin wurde in unterschiedlichen Mengen zu humanem Serum zugesetzt. Der Adiponektin Gehalt der so angereicherten Proben wurde gemessen und die Wiederfindung im Vergleich zum angereicherten Verdünnungspuffer DIL berechnet.

DIL mit rekombinantem Adiponektin	Serum mit rekombinantem Adiponektin	Wiederfindung
ng/mL	ng/mL	%
0	0.00778	---
87.92	95.71	109
51.84	59.98	116
26.55	26.7	101
13.35	15.15	113

11.6 Interferenz

Interferenz von Hämoglobin, Bilirubin und Triglyzeriden auf die Bestimmung von Adiponektin wurde durch Zugabe von verschiedenen Mengen dieser Substanzen zu Humanserum getestet. Zum Vergleich wurde die gleiche Menge des jeweiligen Lösungsmittels ohne jede Substanz auch zu Serum zugegeben. Die Messwerte in Tabelle 6 zeigen, dass weder Bilirubin noch Triglyzeride oder Hämoglobin einen Einfluss auf die Messung von Adiponektin in humanem Serum haben.

Tabelle 6 Interferenzen Serumproben wurden mit unterschiedlichen Mengen an Triglyzeriden, Bilirubin oder Hämoglobin angereichert. Die relative Menge vom gemessenen Adiponektin im Vergleich zu nativem Serum wird hier [%] angezeigt.

Triglyceride 100mg/mL	Bilirubin 100µg/mL	Hämoglobin 1 mg/mL	Hämoglobin 5 mg/mL
94	96	90	109
90	93	97	--
95	94	93	--

12 VERGLEICHSTUDIEN

Mediagnost Adiponectin, E09 wurde mit zwei verschiedenen, kommerziell verfügbaren Testsystemen verglichen. Beide Testsysteme zeigten in der linearen Regression eine gutes Bestimmtheitsmaß ($R^2=0,896$ und $R^2=0,97$). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse des Mediagnost ELISA mit anderen Testsystemen ist somit gegeben. Je nach Testsystem sind die absoluten Abweichungen bei den Messwerten unterschiedlich. Aufgrund der guten Korrelation können die Ergebnisse aber nach Anwendung eines Faktors miteinander verglichen werden. Graphisch sind die Ergebnisse der Vergleiche in Abbildung 4 dargestellt.

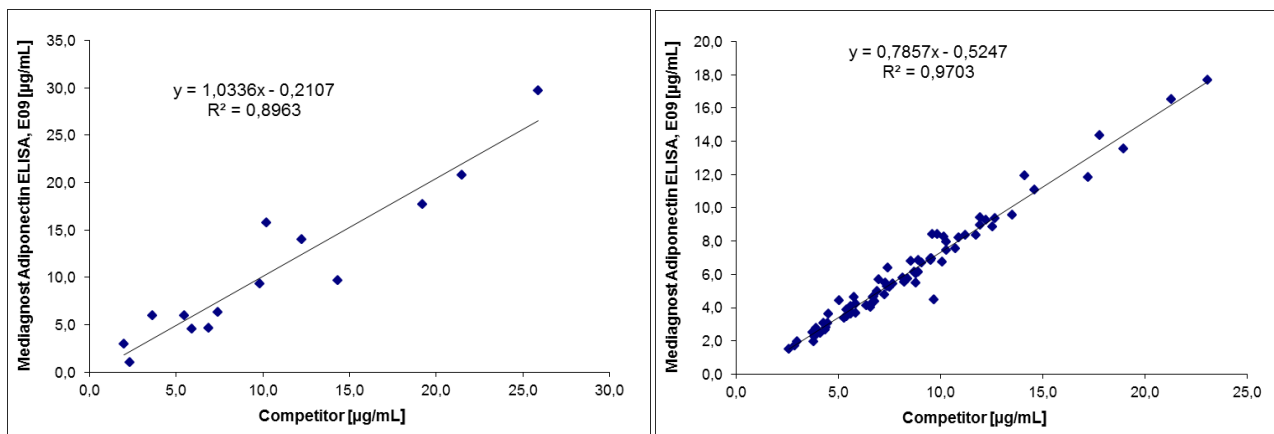


Abbildung 4 Assay Vergleich mit kommerziell verfügbaren Testsystemen (links) Radioimmunoassay (n=14) und (rechts) ELISA (n=76).

Gebrauchsinformation für wissenschaftliche Anwendungen

13 WISSENSCHAFTLICHE ANWENDUNGEN

Neben Serum- und Plasmaproben kann Adiponektin in anderen humanen Körperflüssigkeiten und in **Zellkulturüberständen** verschiedener humaner Zelllinien für wissenschaftliche Zwecke bestimmt werden.

13.1 Geeignete Proben für Forschungszwecke

Serum, Plasma, Urin, Speichel, Muttermilch, Zellkulturüberstand humaner **Zelllinien**.

Empfohlene Probenverdünnung von Serum und Plasma in Verdünnungspuffer **DIL 1:310**.

In den anderen Proben können die Adiponektinkonzentrationen stark variieren, die optimale Verdünnung muss vom Anwender festgelegt werden.

Tabelle 7 Ergebnisse der Probenmatrixtests. Adiponektin wurde den jeweils verdünnten Proben zugesetzt. Die Adiponektinkonzentration der angereicherten Proben wurden dann ohne weitere Verdünnung gemessen. Dargestellt ist die relative Wiederfindung [%] des zugesetzten Adiponektins in den Proben bezogen auf entsprechend mit Adiponektin angereichertem Verdünnungspuffer.

Matrix Verdünnung	Urin	Speichel	Muttermilch	Zellkulturmedium 10% FCS	Zellkulturmedium
1:2	80	87	89	83	95
1:5	95	80	92	92	97
1:10	92	87	-	101	85
1:20	94	99	-	83	91

13.2 Kreuzreaktivität

Die Kreuzreaktivitäten von mehreren handelsüblichen tierischen Seren wurden in diesem Assay getestet.

Dazu wurden die Seren in verschiedenen Verdünnungen als Probe in den Mediagnost Adiponektin ELISA E09 eingesetzt.

In den Seren der folgenden Arten wurde **KEIN SIGNAL** detektiert:

Pferd, Rind, Huhn, Kaninchen, Hund, Meerschweinchen, Schaf, Maus, Ziege, Esel, Ratte, Katze, Schwein.

ENGLISH Instructions for use	22
1 INTENDED USE	22
2 INTRODUCTION	22
3 ASSAY PRINCIPLE	23
4 WARNINGS AND PRECAUTIONS	24
5 SAMPLES	25
6 MATERIALS	26
7 TECHNICAL NOTES	27
8 ASSAY PROCEDURE	28
9 QUALITY CONTROL	29
10 EVALUATION OF RESULTS	29
11 REFERENCE VALUES	31
12 PERFORMANCE CHARACTERISTICS	33
13 COMPARISON STUDIES	36
Instructions for use for scientific application	37
14 SCIENTIFIC APPLICATION	37
15 LITERATUR / REFERENCES	38
16 RÉSUMÉ DU DOSAGE	39
17 INTERNATIONAL TEST DESCRIPTION	40

ENGLISH **Instructions for use**

Adiponectin ELISA E09	96 Determinations
CE	DE/CA40/00809/18
Principle of the test	Enzyme-linked Immunoassay
Duration (incubation period)	1.75 h
Antibodies	monoclonal antibodies
Buffer	Ready for use and 20fold concentrate
Calibrator	5 single calibrators: 2 - 100µg/L, native human Adiponectin
Assay Range	0.27 – 31000 µg/L
Control	2 controls freeze-dried
Sample	human serum / plasma
Required sample volume	10 µL
Sample dilution	1:310
Analytical sensitivity	$\varnothing \leq 0.27 \mu\text{g/L}$
Intra- / Interassay Variance	$\varnothing < 10 \%$
Reference values	Langkamp M, Pridzun P, Böttner A, Kiess W, Thiery J, Kratzsch J, Reference Intervals for Adiponectin Levels in Human Serum. 2005 DGKL Annual Meeting Jena.

1 INTENDED USE

The ELISA E09 is intended to be used for quantitative measurement of human Adiponectin in human serum and plasma samples.

1 INTRODUCTION

Adiponectin is a 30kDa protein which percentage in serum proteins is 0.01%. It is mainly synthesized by adipocytes, but also muscle cells and hepatocytes have the ability to synthesize Adiponectin. It consists of a Collagen-like N-terminal and a globular C-terminal domain [1]. In vivo Adiponectin appears with different oligomers. Beside the trimer and dimer also high molecular multimers exist [1-3]. Two different receptors are known, both receptors are ubiquitarily expressed, though the distribution in the tissues varies. The Adiponectin Receptor 1 (AdipoR1) is especially in muscle- and AdipoR2 in liver tissue synthesized [4].

Several studies show, that adiponectin correlates negatively with BMI and thus it could have relevance for the energy metabolism for example through the regulation of fatty acid oxidation. Beside the correlation with BMI, Adiponectin level is associated with the Insulin-Resistance [5-7] and so also linked with Type II Diabetes. Adiponectin is associated also with glucose- und lipometabolism [8, 9]. The formerly proposed diagnostic value of the high molecular weight form of adiponectin was not verified using a commercially available test system for the determination of HMW adiponectin [10]. Blueher et al. evaluated the Mediagnost E09 regarding its diagnostic value in diagnosis of insulin resistance. Results of ROC analysis showed an area under curve of 0.92, which indicates a diagnostic value [10].

Furthermore adiponectin is involved in inflammatory processes [11-15] and therewith it is of importance for appearance of arteriosclerosis [4, 5, 16] and coronaritis [17, 18], thus the determination of Adiponectin level in plasma could serve to estimate the risk of coronary

Exemplary version, do not use to perform assays

disease [19, 20]. Beside this Adiponectin influences further physiological processes as for example the angiogenesis [21, 22].

2 ASSAY PRINCIPLE

The Mediagnost ELISA for Adiponectin E09 is a so-called Sandwich-Assay using two specific and highly affine antibodies. The Adiponectin in the samples binds to the first antibody coated on the microtiter plate. In the following step the second specific anti-Adiponectin-Antibody binds in turn to the immobilised Adiponectin. The second antibody is biotinylated and will be applied in a mixture with a Streptavidin-Peroxidase-Enzyme Conjugate. In the closing substrate reaction, the turn of the colour will be catalysed quantitatively depending on the Adiponectin-level of the samples.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

For In Vitro Diagnostic Use only. For Professional use only.

The Mediagnost kit is suitable only for in vitro diagnostics and not for internal use in humans and animals. Follow strictly the test protocol. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything has been understood. Mediagnost will not be held responsible for any loss or damage (except as required by statute) howsoever caused, arising out of noncompliance with the instructions provided. A Material Safety Data sheet is available on request.

Do not use obviously damaged or microbial contaminated or spilled material.

Caution: This kit contains material of human and/or animal origin. Therefore, all components and patient's specimens should be treated as potentially infectious.

Appropriate precautions and good laboratory practices must be used in the storage, handling and disposal of the kit reagents. The disposal of the kit components must be made according to the local regulations.

Human Serum

Following components contain human serum: **Controls CTR1 and CTR2, and Calibrators A-E.**

Source human serum for the controls provided in this kit was tested and found non-reactive for Hepatitis-B surface antigen (HBsAg), Hepatitis C virus (HCV), and Human Immunodeficiency Virus 1 and 2 (HIV). No known methods can offer total security of the absence of infectious agents; therefore, all components and patient's specimens should be treated as potentially infectious.

Reagents A-E, DET, DIL, WB

Contain as preservative a mixture of **5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one** (<0.015%)

H317	May cause an allergic skin reaction.
P280	Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.
P272	Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace.
P261	Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapours/ spray.
P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention.
P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P501	Dispose of contents/ container in accordance with local/ regional/ national/ international regulations.

Substrate S

The TMB-Substrate (S) contains 3,3',5,5' Tetramethylbencidine (<0.05%)

H315	Causes skin irritation.
H319	Causes serious eye irritation.
H335	May cause respiratory irritation.
P261	Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapours/ spray.
P305+P351+	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes.
P338	Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

Stop Solution STP

The Stop solution contains 0.2 M acid sulphur acid (H₂SO₄)

H290	May be corrosive to metals.
H314	Causes severe skin burns and eye damage.
P280	Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.
P301+P330+	IF SWALLOWED: rinse mouth.
P331	Do NOT induce vomiting.
P305+P351+	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes.
P338	Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P309+P310	IF exposed or if you feel unwell: Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician.

3.1 General first aid procedures:

Skin contact: Wash affected area rinse immediately with plenty of water at least 15 minutes. Remove contaminated cloths and shoes.

Eye contact: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water at least 15 minutes. In order to assure an effectual rinsing, spread the eyelids.

Ingestion: After swallowing the product, if the affected person is conscious, rinse out the mouth with plenty of water: seek medical advice immediately.

4 SAMPLES

4.1 Sample type

Serum and Plasma

Serum and heparin plasma levels are comparable. In EDTA- and Citrate Plasma-samples levels were found approx. 18% lower, because of the relatively high amount of anticoagulant.

4.2 Specimen collection

The blood sample for serum preparation should be gained according to standardized venipuncture procedure. Hemolytic reactions have to be avoided.

4.3 Required sample volume: 10 µL

4.4 Sample stability

In firmly closable sample vials

- Storage at 20-25°C: 2 days
- Storage at -20° C: min. 2 years
- Freeze-thaw cycles max. 3

The storage of samples over a period of 2 years at -20°C, showed no influence on the reading. Freezing and thawing of samples should be minimized, 3 freeze-thaw cycles showed no effect on the measured adiponectin concentration.

4.5 Interference

Hemoglobin, triglyceride and bilirubin in the sample do not interfere to a concentration of **5 mg/mL**, **100 mg/mL** and **100 µg/mL** respectively. However, the use of hemolytic, lipemic or icteric samples should be validated by the user.


4.6 Sample dilution

- Dilution: **1:310** with Dilution Buffer **DIL**
- Dilute for example **300 µL** Dilution Buffer **DIL** in PE-/PP-Tubes (application of a multi-stepper is recommended in larger series), add **10 µL** Serum- or Plasma (dilution: 1:31). Add **900 µL** Dilution Buffer **DIL** in another PE-/PP-tube and **100 µL** of the thoroughly mixed first dilution. After mixing, use 2×100 µL from this **1:310** diluted sample in the assay.
- Alternatively, if you have the necessary technical equipment a one-step dilution of **1:301** is possible: Add **5 µL** to **1.5 mL** dilution buffer **DIL**.
- Sample stability after dilution of the sample: maximum 1 hour at 20-25°C.

5 MATERIALS

5.1 Materials provided

The reagents listed below are sufficient for 96 wells including the calibration curve.

MTP	Microtiter plate , ready for use, coated with mouse-anti-Adiponectin-antibody. Wells are separately breakable.	(8x12) wells
A-E	Calibrators , lyophilized, (native human Adiponectin), concentrations are given on vial labels and on quality certificate in ng/mL.	5 x 750 µL
CTR1	Control 1 , lyophilised, (human serum), concentration is given on quality certificate in ng/mL.	1 x 500 µL
CTR2	Control 2 , lyophilised, (human serum), concentration is given on quality certificate in ng/mL.	1 x 500 µL
DET	Antibody-HRP-Conjugate , ready for use, mouse-anti-hAdiponectin-antibody biotinylated + streptavidin horseradish peroxidase conjugate	1 x 12 mL
DIL	Dilution Buffer , ready for use	1 x 125 mL
WB	Washing Buffer , 20-fold concentrated solution	1 x 50 mL
S	Substrate , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP) substrate, stabilised Tetramethylbencidine.	1 x 12 mL
STP	Stop Solution , ready for use, 0.2 M sulphuric acid.	1 x 12 mL
-	Sealing Tape , for covering the microtiter plate .	2 x
	Instructions for use	1 x
--	Quality Certificate	1 x

5.2 Materials required, but not provided

- Distilled (Aqua destillata) or deionized water for dilution of the Washing Buffer **WB (A. dest.)**, 950 mL.
- Precision pipettes and multichannel pipettes with disposable plastic tips
- Polyethylene PE/Polypropylene PP tubes for dilution of samples
- Vortex-mixer
- Microtiter plate shaker (350 rpm)
- Microtiter plate washer (recommended)
- Micro plate reader ("ELISA-Reader") with filter for 450 and ≥ 590 nm

6 TECHNICAL NOTES

Storage Conditions

Store the kit at 2-8°C after receipt until its expiry date. The lyophilized reagents should be stored at –20 °C after reconstitution. Avoid repeated thawing and freezing.

Storage Life

The shelf life of the components **after initial opening** is warranted for **4 weeks**, store the unused strips and microtiter wells **airtight** together with the desiccant at 2-8°C in the clip-lock bag, use in the frame provided. The **reconstituted components** calibrators **A-E** and Controls **CTR1** and **CTR2** must be stored at –20°C (max. 4 weeks). For further use, thaw quickly but gently (avoid temperature increase above room temperature and avoid excessive vortexing). Up to 3 of the freeze-thaw cycles did not influence the assay. The 1:20 diluted Washing Buffer **WB** is 4 weeks stable at 2-8°C

Preparation of reagents

Bring all reagents to room temperature (20 - 25°C) before use. Possible precipitations in the buffers have to be resolved before usage by mixing and / or warming. Reagents with different lot numbers cannot be mixed.

Reconstitution

The Calibrators **A – E** and Controls **CTR1** and **CTR2** are reconstituted with the Dilution Buffer **DIL**. It is recommended to keep reconstituted reagents at room temperature for 15 minutes and then to mix them thoroughly but gently (no foam should result) with a Vortex mixer.

Dilution

After reconstitution dilute the Controls **CTR1** and **CTR2** with the Dilution Buffer **DIL** in the same ratio (1:310) as the sample. The required volume of Washing Buffer **WB** is prepared by 1:20 dilution of the provided 20fold concentrate with Aqua dest.

Assay Procedure

When performing the assay, Blank, Calibrators **A-E**, Controls **CTR1**, **CTR2** and the samples should be pipette as fast as possible (e.g. <15 minutes). To avoid distortions due to differences in incubation times, Antibody Conjugate **DET** as well as the succeeding Substrate **S** should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples. Stop Solution **STP** should be added to the plate in the same order as Substrate **S**.

All determinations (Blank, Calibrators **A-E**, Controls **CTR1**, **CTR2** and samples) should be assayed in duplicate. For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

Incubation

Incubation at room temperature means: Incubation at 20 - 25°C. The Substrate**S**, stabilised H₂O₂-Tetramethylbenzidine, is photosensitive—store and incubation in the dark.

Shaking

The incubation steps should be performed at mean rotation frequency of a particularly suitable microtiter plate shaker. We are recommending 350 rpm. Due to certain technical differences deviations may occur, in case the rotation frequency must be adjusted. Insufficient shaking may lead to inadequate mixing of the solutions and thereby to low optical densities, high variations and/ or false values, excessive shaking may result in high optical densities and/ or false values.

Washing

Proper washing is of basic **importance** for a secure, reliable and precise performance of the test. Incomplete washing is common and will adversely affect the test outcome. Possible consequences may be uncontrolled unspecific variations of measured optical densities, potentially leading to false results calculations of the examined samples. Effects like high background values or high variations may indicate washing problems.

All washing must be performed with the provided Washing Buffer **WB** diluted to usage concentration. Washing volume per washing cycle and well must be 300 µL at least.

The danger of handling with potentially infectious material must be taken into account.

When using an **automatic microtiter** plate washer, the respective instructions for use must be carefully followed. Device adjustments, e.g. for plate geometry and the provided washing parameters, must be performed. Dispensing and aspirating manifold must not scratch the inside well surface. Provisions must be made that the remaining fluid volume of every aspiration step is minimized. Following the last aspiration step of each washing cycle, this could be controlled, and possible remaining fluid could then be removed, by inverting the plate and repeatedly tapping it dry on non-fuzzy absorbent tissue.

Manual washing is an adequate alternative option. Washing Buffer may be dispensed via a multistepper device, a multichannel pipette, or a squirt bottle. The fluid may be removed by dynamical swinging out the microtiter plate over a basin. If aspirating devices are used, care has to be taken that the inside well surface is not scratched. Subsequent to every single washing step, the remaining fluid should be removed by inverting the plate and repeatedly tapping it dry on non-fuzzy absorbent tissue.

7 ASSAY PROCEDURE

Preparation of reagents		Reconstitution:	Dilution
CAL A-E	Calibrators	in 750 µL Dilution Buffer DIL	-
CTR1 and CTR2	Control 1 Control 2	in 500 µL Dilution Buffer DIL	1:310 with DIL
WB	Washing Buffer concentrate	-	1:20 with Aqua dest. → WB 1:20
Sample dilution: with Dilution Buffer DIL 1:310			
Before assay procedure bring all reagents to room temperature 20-25°C .			
Assay Procedure in Double Determination:			
Pipette	Reagents	Position	
100 µL	Dilution Buffer DIL (Blank)	A1/A2	
100 µL	Calibrator A (2 ng/mL)	B1/B2	
100 µL	Calibrator B (10 ng/mL)	C1/C2	
100 µL	Calibrator C (30 ng/mL)	D1/D2	
100 µL	Calibrator D (70 ng/mL)	E1/E2	
100 µL	Calibrator E (100 ng/mL)	F1/F2	
100 µL	Control CTR1 (1:310 diluted)	G1/G2	
100 µL	Control CTR2 (1:310 diluted)	H1/H2	
100 µL	Sample SPE (1:310 diluted)	in the rest of the wells according the requirements	
Cover the wells with the sealing tape.			
Sample Incubation: 1 h at 20-25°C, 350 rpm			
3 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 3 x with 300 µL each Washing Buffer WB 1:20/ well	In each well	
100 µL	Antibody-HRP-Conjugate DET	In each well	
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 30 Minutes at 20-25°C, 350 rpm			
3 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 3 x with 300 µL each Washing Buffer WB 1:20/ well	In each well	
100 µL	Substrate Solution S	In each well	
Incubation: 15 Minutes in the Dark at 20-25°C			
100 µL	Stop Solution STP	In each well	
Measure the absorbance within 30 min at 450 nm with ≥ 590 nm as reference wavelength.			

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls are included in each assay. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance. The test results are only valid if the test has been performed following the instructions. Moreover, the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state or local standards/laws. All calibrators and kit controls must be found within the acceptable ranges as stated on the QC Certificate. If the criteria are not met, the run is not valid and should be repeated. Each laboratory should use known samples as further controls.

8.1 Quality criteria

For the evaluation of the assay it is required that the absorbance values of the blank should be below 0.25, and the absorbance of calibrator E should be above 1.00.

Samples, which yield higher absorbance values than calibrator E, should be re-tested with a higher dilution.

9 EVALUATION OF RESULTS

9.1 Establishing of the calibration curve

Calibrator	A	B	C	D	E
ng/mL	2	10	30	70	100

- 1) Calculate the **mean absorbance** value for the blank from the duplicated determination (well A1/A2).
- 2) Subtract the mean absorbance of the blank from the mean absorbances of all other samples and calibrators.
- 3) Plot the calibrator concentrations on the x-axis versus the mean value of the absorbance of the calibrators on the y-axis.
- 4) Recommendation: Calculation of the calibration curve should be done by using a computer program, because the curve is in general (without respective transformation) not ideally described by linear regression. **A higher-grade polynomial, or four parametric logistic (4-PL) curve fit or non-linear regression** are usually suitable for the evaluation (as might be spline or point-to-point alignment in individual cases).
- 5) The Adiponectin concentration in ng/mL of the samples and controls **CTR1** and **CTR2** can be calculated by **multiplication** with the respective **dilution factor**.

9.2 Example of a typical calibration curve

The following data is for demonstration only and cannot be used in place of data generation at the time of assay.

	Blank	A	B	C	D	E
ng/mL	0.0	2	10	30	70	100
OD(450-620 nm)	0.008	0.071	0.357	1.022	2.053	2.817

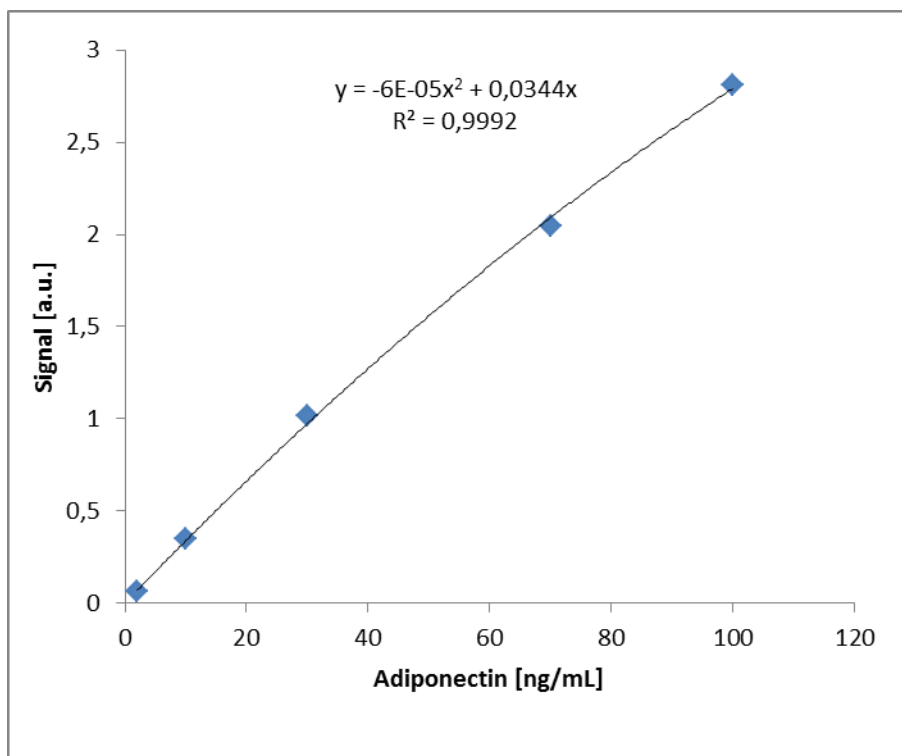


Figure 1 Exemplary calibration curve

The exemplary shown calibration curve in Figure 1 **cannot** be used for calculation of your test results. You have to establish a calibration curve for each test you conduct!

9.3 Exemplary calculation of Adiponectin concentrations

Sample dilution: 1:310

Measured extinction of your sample	0.408
Measured extinction of the blank	0.008

Your measurement programm will calculate the Adiponectin concentration of the diluted sample automatically by using the difference of sample and blank for the calculation. You only have to determine the most suitable curve fit (here: polynomial 2nd degree).

In this exemplary case the following equation is solved by the program to calculate the adiponectin concentration in the sample:

$$0.400 = -6 \times 10^{-5}x^2 + 0.0344x$$
$$11.89 = x$$

If the dilution factor (1:310) is taken into account the adiponectin concentration of the undiluted sample is

$$11.89 \times 310 = 3685.9 \text{ ng/mL} = 3.69 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

The exemplary shown calibration curve in Fig.1 cannot be used for calculation of your test results. You have to establish a calibration curve for each test you conduct!

9.4 Interpretation of results

The test results should not be the only base for therapeutic decisions. The results should be interpreted in regard to anamnesis, further clinical observations and results of other diagnostic investigations. Further, it is recommended to establish reference and cut-off values corresponding to the relevant group of patients for each laboratory.

9.5 Limitation of procedure

The Mediagnost sensitive human Adiponectin ELISA, E09 is based on monoclonal antibodies. Generally, this technique could be sensible to heterophilic antibodies or rheumatic factors in the sample. Their influence is reduced by assay design, but cannot be excluded completely.

10 REFERENCE VALUES

The expected values for serum adiponectin, which were determined with the Mediagnost ELISA E09 in healthy donors and analysed by Prof. Dr. J. Kratzsch, Department of Laboratory Medicine, University Hospital Leipzig, are given below (Tab. 1).

These data show significant correlation between Adiponectin-Serum values and age as well as gender of the probands, in turn the correlation between the respective BMI seems to be less significant. In the samples of neonatal cord blood very high values were found. Several different statistical analyses were performed to adapt for certain individual demands. The best suited data can be chosen respectively for interpretation of the own measurements.

Table 1a Expected values for adults, gender specific mean as well as median, 5. and 95. percentiles are given.

Sex	Number [n]	Mean [µg/ml]	Median [µg/ml]	Standard Deviation	5 th Percentile [µg/ml]	95 th Percentile [µg/ml]
Female	101	10.2	9.1	4.6	4.0	19.4
Male	125	6.8	6.1	4.1	2.0	13.9
total	226	8.3	7.5	4.6	2.4	19.3

Table 1b Expected values for children, gender specific mean as well as median, 5. and 95. percentiles are given.

Sex	Number [n]	Mean [µg/ml]	Median [µg/ml]	Standard Deviation	5 th Percentile [µg/ml]	95 th Percentile [µg/ml]
Female	131	8.71	8.18	4.32	3.05	15.6
Male	134	8.97	8.12	5.13	3.36	18.6
total	265	8.84	8.18	4.74	3.33	16.5

Table 1c Expected values for Adiponectin, age specific mean as well as median, 5. and 95. percentiles are given.

Age group [a]	Number [n]	Mean [µg/ml]	Median [µg/ml]	5. Percentile [µg/ml]	95. Percentile [µg/ml]
< 7.99	46	12.82	11.7	2.33	26.5
8 – 9.99	40	8	8.09	3.96	14.9
10-11.99	55	8.02	7.14	3.36	13.8
12 – 13.99	26	8.21	7.54	4.5	13.2
14 – 15.99	59	8.12	8.09	3.67	13.7
16 – 19.99	41	7.97	7.79	2.74	13.3
alle	267	8.88	8.18	3.33	16.7
20 – 29.99	47	6.72	6.38	2.50	12.25
30 – 39.99	38	7.38	6.69	1.98	19.29
40 – 49.99	55	8.42	8.20	2.41	17.85
50 – 59.99	47	9.61	8.55	2.15	19.85
> 60	32	9.52	8.57	3.00	21.10
alle	226	8.33	7.5	2.41	19.29

Table 1d Expected values for Adiponectin, age as well as gender specific mean and median, BMI and 25. and 75. percentiles are given.

Female			Adiponectin (µg/ml):			
Age (Years):	n:	BMI: AV ± SD	AV ± SD:	Median:	Percentile: 25.- 75.	Min. – Max.:
Newborn Cord blood	19	--	29.80 ± 12.49	26.1	19.5 -35.2	16.9 - 61.4
< 3.99	9	15.73 ± 0.79	14.43 ± 7.76	11.2	8.2 - 21.8	2.3 - 26.7
4.0 - 7.99	11	16.01 ± 1.94	8.46 ± 4.73	9.3	2.9 - 12.1	1.4 - 15.6
8.0 - 9.99	22	17.58 ± 3.84	7.92 ± 3.00	8.2	5.2 - 10.0	3.6 - 15.1
10.0 - 11.99	33	17.83 ± 1.86	7.66 ± 4.59	6.6	5.0 - 8.8	3.1 - 20.9
12.0 - 13.99	11	19.85 ± 2.31	8.22 ± 5.64	7.5	6.5 - 9.2	4.9 - 13.2
14.0 - 15.99	27	19.91 ± 1.72	8.83 ± 9.25	8.9	5.2 - 11.8	2.6 - 17.7
16.0 – 19.99	18	21.64 ± 2.64	9.00 ± 3.22	8.7	6.9 - 11.2	2.7 - 14.0
20.0 - 29.99	24	23.12 ± 5.01	7.39 ± 3.35	7.3	5.7 - 9.0	3.4 - 17.8
30.0 - 39.99	17	23.20 ± 2.86	9.19 ± 3.89	8.6	7.2 - 10.4	3.6 - 19.3
40.0 - 49.99	26	24.50 ± 4.11	9.93 ± 3.59	9.5	7.5 - 11.6	4.4 - 19.6
50.0 - 59.99	21	24.61 ± 3.31	11.5 ± 5.49	10.0	8.0 - 15.9	2.0 - 23.1
>60.0	8	24.63 ± 1.89	15.6 ± 4.64	15.3	11.4 - 18.2	11.2 - 24.1

Male			Adiponectin (µg/ml):			
Age (Years):	n:	BMI: AV ± SD	AV ± SD:	Median:	Percentile: 25.- 75.	Min. – Max.:
Newborn Cord blood	10	--	27.80 ± 7.68	26.7	22.2 -31.0	15.6 - 40.6
< 3.99	14	16.17 ± 1.81	16.57 ± 6.55	14.3	11.6 - 21.2	5.8 - 40.3
4.0 - 7.99	12	15.69 ± 1.05	11.24 ± 5.43	9.7	8.9 - 15.9	3.5 - 18.6
8.0 - 9.99	18	16.45 ± 1.76	8.11 ± 2.93	7.6	6.2 - 9.1	5.00 - 15.4
10.0 - 11.99	21	18.34 ± 2.18	8.43 ± 3.91	7.8	5.2 - 10.9	3.4 - 20.2
12.0 - 13.99	14	18.61 ± 2.11	7.59 ± 2.86	7.1	6.0 - 10.3	2.4 - 12.2
14.0 - 15.99	32	19.86 ± 2.00	7.53 ± 2.52	7.4	5.1 - 9.3	3.8 - 15.4
16.0 -19.99	23	22.03 ± 2.42	7.16 ± 3.53	6.9	4.2 - 9.6	2.0 - 13.9
20.0 - 29.99	23	23.43 ± 2.48	5.44 ± 2.29	5.8	4.0 - 6.9	1.3 - 10.3
30.0 - 39.99	21	23.33 ± 2.72	5.92 ± 4.60	4.4	2.7 - 6.7	1.9 - 20.6
40.0 - 49.99	22	23.79 ± 2.41	6.13 ± 2.92	5.5	3.8 - 8.3	2.1 - 11.6
50.0 - 59.99	23	26.68 ± 2.77	7.45 ± 4.50	6.7	5.0 - 8.8	1.4 - 19.6
>60.0	24	25.72 ± 2.12	7.48 ± 3.92	7.6	4.6 - 9.2	3.0 - 21.1

n= Number of Proband AV=Average Value BMI=Body Mass Index (kg/m²) SD=Standard Deviation

11 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1 Sensitivity

The analytical sensitivity of the ELISA E09 was measured by the variability of the signal of the blank. Based on the twofold standard deviation of the blank the mean analytical sensitivity is < 0.27 ng/mL (Range 0.094 to 0.59 ng/mL).

11.2 Specificity

Adiponectin exists in different oligomeric forms: the high, medium and low molecular weight form. Different numbers of the adiponectin monomer aggregate specifically to form a complex. In Figure 2a the five different forms of human adiponectin are shown schematically. In parallel the results of a size-exclusion chromatography of human serum measured with the Mediagnost E09 Adiponectin ELISA are shown.

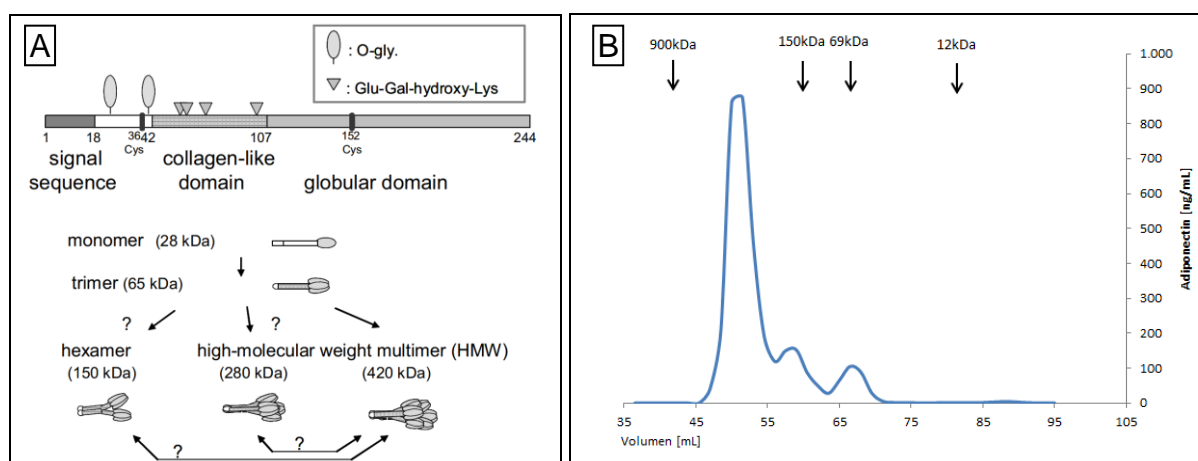


Figure 2 Adiponectin Structure (A) proteinaceous structure of human adiponectin including posttranslational modifications and multimeric forms (taken from Nakano et al¹). (B) Results of a serum separation by size-exclusion chromatography. The sample was fractionated and the adiponectin content of each fraction was measured by Mediagnost E09 Adiponectin, for comparison the corresponding seize in kDa is indicated by black arrows.

The results shown in Figure 2b clearly demonstrate that the Mediagnost E09 Adiponectin ELISA detects all forms of Adiponectin present in human serum: the trimer at 65 kDa, the hexamer at 150 kDa and the high molecular weight forms of >280 kDa. The Mediagnost E09 Adiponectin ELISA therefore measures total Adiponectin.

11.3 Precision

Intra-Assay Variance & Accuracy

Intra assay variance and accuracy is exemplarily shown with two samples. The adiponectin concentration of these samples was repeatedly measured in one assay.

Table 2 Intra-Assay Variation. Recombinant adiponectin was diluted in dilution buffer and the adiponectin concentration of the dilution was measured repeatedly within one assay.

	Determinations [n]	Mean value [µg/L]	Standard deviation [µg/L]	VC [%]	Target Value [µg/L]
Sample 1	8	7.108	0.22	3.14	6
Sample 2	8	107.96	3.97	3.67	100

In both samples the variability is less than 5% and the deviation from the target value is <20%.

¹ Nakano Y, Tahima S, Yoshimi A, Akiyama H, Tsushima M, Tanioka T, Negoro T, Tomita M, Tobe T: A novel enzyme-linked immunosorbent assay specific for high-molecular-weight adiponectin. J Lipid Res 2006, 47(7):1572-1582
IFU E09 IVD D/E

Inter-Assay Variance

Serum samples were repeatedly measured in independent assays of different lots. On average the coefficient of variation was 7.5% (SD 1.6). The results of 5 samples are shown in table 3.

Table 3 Inter-Assay Variation

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5
Mean [µg/mL]	4.72	5.25	8.36	5.45	22.29
CV [%]	8.16	8.14	6.93	8.05	7.30
n	99	68	62	174	62

11.4 Linearity

Linearity of sample dilution was tested by serial dilution (1:100 – 1:4000) of human serum samples and recalculation of the adiponectin content in comparison to the mean adiponectin concentration of all dilutions (Table 4), no diluted sample showed a deviation of >30%.

Table 4 Linearity. Human serum sample were diluted in DIL and adiponectin content was recalculated. Measurements results are shown in [mg/L]. No deviation of the mean >30% was detected.

µg/mL	Mean	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1000	1:2000	1:4000
Sample 1	5.76	6.53	6.331	5.764	5.49	6.067	6.114	4.056
Sample 2	11.53	10.93	12.107	11.395	11.454	11.567	12.884	10.362
Sample 3	12.07	13.57	12.853	12.03	11.974	11.338	11.548	11.169
Sample 4	4.89	4.659	4.886	4.384	4.425	5.851	5.13	n/a

Additionally, dilutions of 1:1500 to 1:96000 were evaluated with two samples. In Figure 3 the results are shown and demonstrate that in the tested samples no effect of dilution could be detected on measured adiponectin concentrations. The deviation of the target concentration of each dilution was less than 30% in all dilutions.

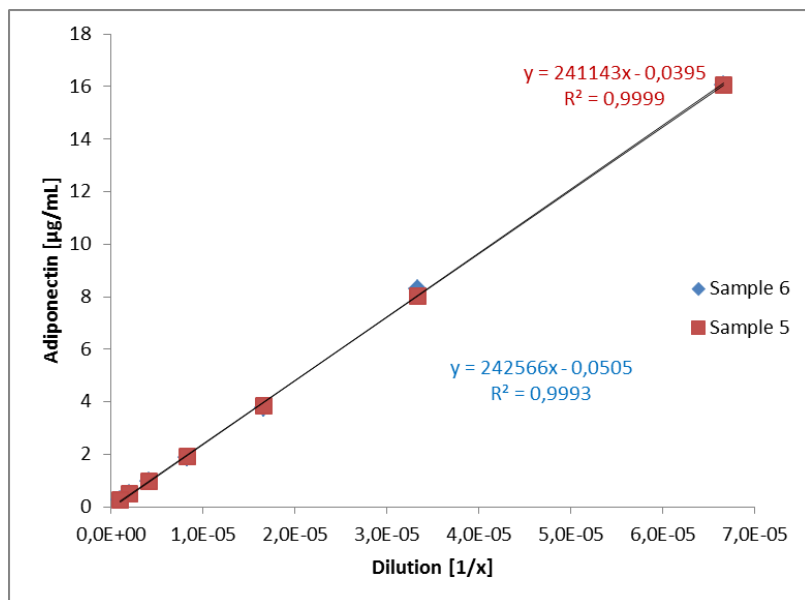


Figure 3 Linearity. Adiponectin concentration was measured in two human samples diluted 1:1500 to 1:96000.

11.5 Recovery

Trueness and traceability of the Mediagnost Adiponectin ELISA E09 was evaluated by recovery of recombinant adiponectin in human serum. The recovery of recombinant Adiponectin yielded in a serum matrix on average 110%.

Table 5 Recovery of recombinant human Adiponectin in Serum. Recombinant Adiponectin was added in different amounts to human serum. The Adiponectin content of the so enriched samples was measured and recovery in comparison to enriched buffer calculated.

R&D recombinant Adiponectin lot 1022911	DIL	Serum	Recovery
ng/mL	ng/mL	ng/mL	%
0	0	0.00778	---
75	87.92	95.71	109
37.5	51.84	59.98	116
18.75	26.55	26.7	101
9.375	13.35	15.15	113

11.6 Interference

Interference of bilirubin and triglycerides was tested by adding different amounts of these substances to human serum containing adiponectin. For comparison the same amount of buffer without any substance was also added to the serum. Table 6 demonstrates that neither bilirubin nor triglycerides or haemoglobin exert any influence on the measurement of adiponectin in human serum.

Table 6 Interference. Serum samples were enriched with different amount of triglycerides, bilirubin or haemoglobin. The relative amount of adiponectin measured in comparison with native serum is shown here [%].

Triglyceride 100 mg/mL	Bilirubin 100 µg/mL	Hemoglobin 1 mg/mL	Hemoglobin 5 mg/mL
94	96	90	109
90	93	97	--
95	94	93	--

12 COMPARISON STUDIES

Mediagnost Adiponectin, E09 was compared with two different, commercially available test systems. In linear regression analysis both tests showed a good coefficient of determination ($R^2=0.896$ and $R^2=0.97$). Thus, the comparability of the results between the Mediagnost E09 and other test systems is possible. In dependence on the respective system the absolute deviation of measurement results is different, but because of the excellent correlation the results are comparable after applying a factor. The results of both studies are shown in figure 4.

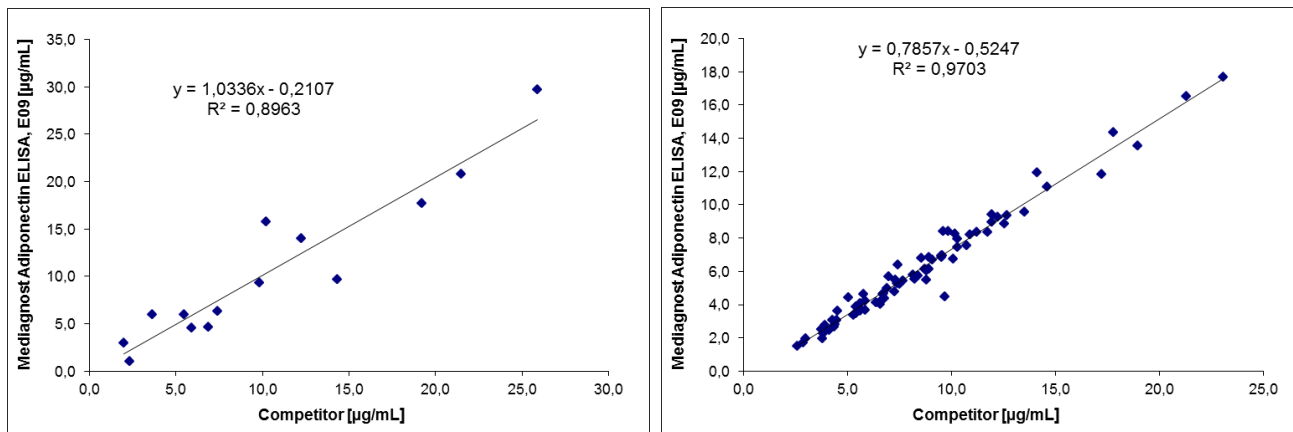


Figure 4 Comparison of Mediagnost E09 with commercially available test systems (left) radioimmunoassay (n=14) and (right) ELISA (n=84)

Instructions for use for scientific application

13 SCIENTIFIC APPLICATION

In addition to serum and plasma samples Adiponectin can be determined in other human body fluids and in cell culture supernatants of human cell lines for research purposes.

13.1 Samples suitable for scientific application

Serum, plasma, saliva, urine, breast milk and cell culture supernatant of human cell lines

The recommended dilution for serum and plasma samples in Dilution Buffer **DIL (1:310)**.

In the other samples, the Adiponectin levels can vary considerably, the optimal dilution must be found out by the customer.

Table 7 Results of sample matrix tests . Adiponectin was added to the respectively diluted samples. Enriched samples were measured without further dilution. Shown is the relative recovery of added Adiponectin of the concentration measured in respectively enriched assay buffer.

Matrix Dilution	Urine	Saliva	Breast Milk	Cell Culture Medium 10% FCS	Cell Culture Medium
1:2	80	87	89	83	95
1:5	95	80	92	92	97
1:10	92	87	-	101	85
1:20	94	99	-	83	91

13.2 Species Cross-Reactivity

Serum of the cited species was diluted and used as sample in this assay system. No signal was detected in serum of the following species:

Horse, Cow, Chicken, Rabbit, Dog, Guinea pig, Sheep, Mouse, Goat, Donkey, Rat, Cat

Whether this obvious non-reactivity is species specific should be assessed individually by each customer.

14 LITERATUR / REFERENCES

Literature

1. Nakano, Y., et al., Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem (Tokyo)*, 1996. 120(4): p. 803-12.
2. Pajvani, U.B., et al., Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem*, 2003. 278(11): p. 9073-85.
3. Tsao, T.S., et al., Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways. *J Biol Chem*, 2003. 278(50): p. 50810-7.
4. Shimada, K., T. Miyazaki, and H. Daida, Adiponectin and atherosclerotic disease. *Clin Chim Acta*, 2004. 344(1-2): p. 1-12.
5. Higashiura, K., et al., Correlations of adiponectin level with insulin resistance and atherosclerosis in Japanese male populations. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2004. 61(6): p. 753-9.
6. Spranger, J., et al., Adiponectin is independently associated with insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2004. 61(6): p. 738-46.
7. Zoico, E., et al., Adipocytokines, fat distribution, and insulin resistance in elderly men and women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2004. 59(9): p. M935-9.
8. Ye, J.M., et al., PPARalpha /gamma ragaglitazar eliminates fatty liver and enhances insulin action in fat-fed rats in the absence of hepatomegaly. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003. 284(3): p. E531-40.
9. Yamauchi, T., et al., Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*, 2002. 8(11): p. 1288-95.
10. Blüher (Blueher), M., et al., Total and high-molecular weight adiponectin in relation to metabolic variables at baseline and in response to an exercise treatment program: comparative evaluation of three assays. *Diabetes Care*, 2007. 30(2): p. 280-5.
11. Delaigle, A.M., et al., Induction of adiponectin in skeletal muscle by inflammatory cytokines: in vivo and in vitro studies. *Endocrinology*, 2004. 145(12): p. 5589-97.
12. Winzer, C., et al., Plasma adiponectin, insulin sensitivity, and subclinical inflammation in women with prior gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 2004. 27(7): p. 1721-7.
13. Xydakis, A.M., et al., Adiponectin, inflammation, and the expression of the metabolic syndrome in obese individuals: the impact of rapid weight loss through caloric restriction. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. 89(6): p. 2697-703.
14. Motoshima, H., et al., Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 315(2): p. 264-71.
15. Wolf, A.M., et al., Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 323(2): p. 630-5.
16. Okamoto, Y., et al., Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 2002. 106(22): p. 2767-70.
17. Schlegel, A., Adiponectin and risk of coronary heart disease. *Jama*, 2004. 292(1): p. 40; author reply 40.
18. Choi, K.M., et al., Inflammation, Insulin Resistance, and Glucose Intolerance in Acute Myocardial Infarction Patients without a Previous Diagnosis of Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004.
19. Nakamura, Y., et al., Implications of plasma concentrations of adiponectin in patients with coronary artery disease. *Heart*, 2004. 90(5): p. 528-33.
20. Pischon, T., et al., Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *Jama*, 2004. 291(14): p. 1730-7.
21. Shibata, R., et al., Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem*, 2004. 279(27): p. 28670-4.
22. Fernandez-Real, J.M., et al., Adiponectin is associated with vascular function independent of insulin sensitivity. *Diabetes Care*, 2004. 27(3): p. 739-45.

15 RÉSUMÉ DU DOSAGE

Préparation des réactifs	Reconstitution	Dilution
Etalons A-E	dans 750 µL de Tampon de Dilution DIL	
Contrôle sérique CTR1 & CTR2	dans 500 µL de Tampon de Dilution DIL	1:310 avec Tampon de Dilution DIL
Tampon de lavage WB		1:20 avec eau distillée. (ex. ajouter le contenu du flacon (50mL) dans une bouteille avec graduation et ajouter de l'eau distillée jusqu'à 1000 mL) → WB 1:20







Diluer l'échantillon: Diluer par exemple 10 µL de sérum ou plasma dans 300 µL de WB, (dilution 1:31) dans des tubes PE/PP. Ajouter 100 µL de cette première dilution bien mélangée à 900 µL de tampon de dilution dans un autre tube (dilution 1:310). Après mélange, utiliser 2 x100 µL de la dilution 1:310 d'échantillon pour le dosage.

Procédure de dosage en doublets:

Distribuer:	Réactifs	Position
100 µL	Tampon de Dilution DIL	A1/2
100 µL	Etalon A (2 ng/mL)	B1/2
100 µL	Etalon B (10 ng/mL)	C1/2
100 µL	Etalon C (30 ng/mL)	D1/2
100 µL	Etalon D (70 ng/mL)	E1/2
100 µL	Etalon E (100 ng/mL)	F1/2
100 µL	Contrôle sérique CTR1 (1:310 dilué)	G1/2
100 µL	Contrôle sérique CTR2 (1:310 dilué)	H1/2
100 µL	dilution d'échantillons SPE (1:310 dilué)	Les puits suivants
Recouvrir la microplaque avec une bande adhésive		
Incubation 1 h à température ambiante, 350 tours par minute		
3x 300 µL	Aspirer le contenu des puits et laver 3 x avec 300 µL de tampon de lavage WB 1:20 / puits	Tous les puits
100 µL	Ajouter l'Anticorps-POD-Conjugate DET	Tous les puits
Recouvrir la microplaque avec une bande adhésive.		
Incubation 30 min à température ambiante, 350 tours par minute		
3x 300 µL	Aspirer le contenu des puits et laver 3 x avec 300 µL de tampon de lavage WB 1:20 / puits	Tous les puits
100 µL	Ajouter la Solution de Substrat S	Tous les puits
Incubation: 15 min dans le noir à température ambiante		
100 µL	Ajouter la Solution d'arrêt STP	Tous les puits
Mesurer l'absorbance dans les 30 min à 450 nm avec ≥ 590 nm longueur d'onde de référence		

16 INTERNATIONAL TEST DESCRIPTION

International Test Description

CAL A-E	Rec in 750 µL DIL	-
CTR1	Rec in 500 µL DIL	1:310 DIL
CTR2	Rec in 500 µL DIL	1:310 DIL
WB 20x	-	1:20 A. dest. → WB 1:20
SPE		1:310 DIL
-	°C 20-25°C	
100 µL	DIL	A1/A2
100 µL	CAL A (2 ng/mL)	B1/B2
100 µL	CAL B (10 ng/mL)	C1/C2
100 µL	CAL C (30 ng/mL)	D1/D2
100 µL	CAL D (70 ng/mL)	E1/E2
100 µL	CAL E (100 ng/mL)	F1/F2
100 µL	CTR1 1:310 DIL	G1/G2
100 µL	CTR2 1:310 DIL	H1/H2
100 µL	SPE 1:310 DIL	
TAPE		
 1 h °C 20-25°C  350 rpm		
3x 300 µL	3x WB 1:20	
100 µL	DET	
TAPE		
 0.5 h °C 20-25°C  350 rpm		
3x 300 µL	3x WB 1:20	
100 µL	S	
 0.25 h °C 20-25°C 		
STP		
MEASURE		