

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Adiponectin ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von
humanem Adiponektin
Deutsch

Enzyme Immunoassay for quantitative Determination of
human Adiponectin
English



DEE009



96

Europäische Union / European Union*
für in vitro Diagnostik / for in vitro diagnostics
Rest of the world: for research use only!

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/ Αεγυμίσκουρπἀεγ/ 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/ Vă rugăm să respectați instrucțiunile de utilizare/ Uspoštečajte navodila za uporabo/ Lue käyttöohje huolellisesti!

V

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 zdravotnícký 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

g

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/ Numerarii/ Tétel-sarzs szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/Партиден номер/Partii – partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-număr lot/ Številka serije/ erä



Manufactured by/ Hergestellt von/Fabriqué par/ Prodotto da/Fabricado por/ Fabricado por/ Vervaardigd doo/Fabrikation af /Tillverkad av/ Wyprodukowane przez/ Gyártotta / Vyrobené/ Vyrobeno v/ Производител/ Тootja/Κατασκευάζεται από/ Produs de/Proizvajalec/ Valmistaja

h

Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/Numero di riferimento/Número de referencia/ Número de Referência/ Referentienummer/Referencennummer /Beställningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/Katalógovné číslo/ Objednací číslo/Каталожен номер/Tellimnumber/ Αρ. παραγγελίας/Număr comandă/ Številka naročila/ viite tai tilausnumero

l

Store at between/ Lagerung bei zwischen/ Conserver à entre/ Conservare a tra/ Conservar a temp. Entre/ Armazenaer entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilitada temperatuuridel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ Skladištenje med/ Säilytys x-y Celsiusasteen lämpötilassa

x

Contains sufficient for x tests/ Inhalt ausreichend für x Tests/ Contient suffisant pour x tests/ Contenido suficiente per x test/ Contenido suficiente para x pruebas/ Conteúdo suficiente para x testes/ Bevat voldoende voor x bepalingen/ Indeholder tilstrækkeligt til x prøver/Innehållet räcker till x analyser/ Zawartość na x testów/ Tartalma x teszt elvégzésére elegendő/ Obsahuje materiál pre x testov / Obsah dostacuje pro x testů/ Съдържание достатъчно за x тестове/ Sisust jätkub x katse jaoks/ Το περιεχόμενο επαρκεί για x δοκιμές/ Conținut suficient pentru x teste/Vsebina zadostuje za x preizkusov/ Sisältö riittää x testille



Keep away from sunlight/ Nicht dem Sonnenlicht aussetzen/ Conserver à l'abri de la lumière/ Conservare al riparo della luce solare/ No exponer a la luz solar/ Proteger da luz solar/ Niet aan zonlicht blootstellen/ Må ikke udsættes for sollys/ Utsätt inte för solljus/ Nie wystawiać na słońce/ Napfénytől távol tartandó/ Nevystavovat slnečnému svetlu/ Nevystavovat slunečnímu světlu/ Да се предпазва от слънчева светлина/ Kaitsta otsese päikesekiirguse eest/ Κρατήστε το μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία/ Țineți departe de lumina soarelui/ Ne izpostavljajte sončni svetlobi/ suojaa auringonvalolta



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



SORB MT

Shaking/ Schütteln/ Mélanger/ Agitare/ Agitar/ Agitação/ Schudden/ Ryster/ Skaka/ Wstrząsanie/ Rázás/ Pretrepat/ Protřepat/ Разклатяване/ Raputada/ Ανακινήστε/ Vibrare/ Stresite/ Sekoita Mikrotiterplate/ Mikrotiterplatte/ plaque de microtitrage/ Piastra di microtitolazione/ Placa de microtitulación/ Placa de Microtitulação/ microtiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ microtiterplaat/ Plytka microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiterplaat/ Τρυβλίο μικροτιτλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitraska plošča/ Mikrotitruslevy

Rec in	Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituier en/ Reconstituir em/ reconstituieren in/ Rekonstituér i/ rekonstituera/ Rekonstytuować w/ Helyreállítás/ Znovu pripravít za/ Znovu pripravít za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti / Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v /rekonstitui
SPE	Sample/ Probe /Echantillon/ campione/ Muestra/ Amostra/ monster/ Prøve/ prov/ Próbka/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probă/Vzorec/Näyte
ENZ CONJ	AK Antibody and Enzyme Conjugate/ Antikörper und Enzym Konjugat/ anticorps conjugué et conjugué enzymatique/ Coniugato di anticorpo ed enzima/ Conjugado de anticuerpos y enzimas/ Conjugado Anticorpo-Enzima/ antilichaam- en enzymconjugaat/ Antistoffer og enzym-konjugat/ antikropps- och enzymkonjugat (antikropp och enzym, konjugat)/ Koniugat antyciał i enzymów/ Antitest és enzim páros/ Protílátkový a enzymatický konjugát/ Protílátkový a enzymatický konjugát/ Антитяло и ензим конюгат/ Antikehad ja ensüümi konjugaat/ Συμπλοκο αντισώματος-ενζύμου/ Compuși din anticorpi și enzime/ Antitelesa in konjugat encima/ Vasta-aine ja entsymi konjugaatti
BUF X	VP Buffer / puffer/ Tampon / Tampone / Tampón /Tampão / buffer/ buffer/ buffert/ Bufor / puffer/ pufer/ pufr/ бυφερ/ puhver/ ρυθμιστικό διάλυμα / Tampon /pufer/ puskuriliuos
DILU BUF X	Dilute in Buffer X/ Verdünnen in Puffer X/ Diluer dans le tampon X/ Diluire nel tampone X/ Diluir en tampón X/ Diluir no Tampão X/ verdunnen in buffer X/ Fortyndes i buffer X/ späđ i buffert X/ Rozcieńczenie w buforze X/ Hígítás X pufferben/ Riedit' v pufrí X/ Ředit v pufru X/ Разреждане в бυφερ X/ Lahjendada puhvris X/ Αραιώστε σε ρυθμιστικό διάλυμα X/ Diluati în tamponul X/ Razredčiti v pufru X/ laimennetaan x puskuriin
CAL X	A-E Standard X /Standard X/ Etalon X/ Standard X/ Estándar X/ Standard X/ standaard X/ Standard X/ standard X/ Standard X/ Standard X/ Štandard X/ Standard X/ Стандарт X/ Standard X/ Πρότυπο X/ Standard X/ Standardni X/ Kalibraattori X
Control	KS1/ Control Serum / Kontrollserum/ Contôle sérique/ Siero di controllo/ Suero de control/ Soro de Controlo/ kontrolserum/ Контролен сeрyм/ Kontrollseerum/ Ορός ελέγχου/Ser de control/ Kontrolni serum/ Kontrolli seerumi
WASHBUF 20x	WP Washing Buffer Concentrate/ Waschpufferkonzentrat/ Tampon de lavage conc./ Tampone di lavaggio concentrato/ Tampón de lavado concentrado/ Tampão de Lavagem Concentrado/ wasbuffer, geconcentreerd/ Vaskebufferkonzentrat/ Vaskebufferkonzentrat/ tvättbuffertkonzentrat/ Bufor plukania koncentrat/ Mosópuffer koncentrátum/ Koncentrát vymývacieho pufru/ Концентрат на промивен бυфер/ Pesupuhvri kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralnega pufru/ Pesuliositiiviste
WASHBUF	Washing Buffer / Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor plukania/ Mosópuffer/ Vymývaci pufer/ Vymývaci pufr/ Προμивен бυфер/ Pesupuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare /Izpiralni pufer/ Pesuliuos
SUB TMB	S Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Szubsztrátum/ Substrát/ Substrát/ Субстрат Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraattiliuos
STOP SOLN	SL Stop Solution/ Stopp Lösung/ Stop Solution/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ stopoplossing/ Stopopløsning/ Stoppløsning/ Stop roztwór/ Megállító oldat/ Roztok na ukončenie/ Roztok pro ukončení/ Стопираш 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 leragsztása/ Oblepiť podložku lepiacou páskou/ Olepit podložku lepicí páskou/ Плака с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerikleerplindiga/ Κολληστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperiti placa cu o bandă adezivă/ Prelepiti ploščo/ Peitã mikrotitrauslevy oheisella teipillä
MEASURE	Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590nm)/Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)./ Measure lábsorbance en l'espacce de 30 min à450 nm avec ≥590nm 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 referéncia ≥590nm)/ Binnen 30 minuten bij 450 nm meten (referentiefilter ≥ 590 nm)./ Mål plade i løbet af 30 min ved nm (referencefilter ≥590nm)/ 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)./ Merat' 30 minút pri 450 nm/Měřit 30 minut při 450 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)
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 /kaikkiin tarvittaviin mikrotitrauslevyn syvennyksiin

Vor Gebrauch ist die gesamte Packungsbeilage zu lesen!

Read entire protocol before use!

Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ symbolen/ Symboler/ Symboler/Symbole/ Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ Символи/ Sümbolid/ Σύμβολα/ Simboluri/ Simboli/ Symbolit	2
Zugelassener Verwendungszweck	5
Einführung	5
Inhalt der Testverpackung	6
Zusätzlich benötigtes Material	6
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	7
Methode	8
Geeignete Proben	8
Lagerung der Proben	8
Proben Vorbereitung	8
Technische Hinweise	8
Testdurchführung	10
Auswertung	11
Berechnung der Standardkurve	11
Leistungsmerkmale	12
Standard	12
Sensitivität	12
Spezifität	13
Interferenz	13
Recovery	13
Reproduzierbarkeit und Präzision	13
Linearität	14
Referenzwerte	14
Intended Use	17
Introduction	17
Reagents Provided	18
Materials Required but not provided	18
WARNINGS AND PRECAUTIONS	19
Method	20
Specimen	20
Storage of the samples	20
Sample Preparation	20
Technical Notes	20
Standards and Controls	21
Washing Buffer	21
Microtiter plate	21
Assay Procedure	22
Calculation of Results	23
Establishing the Standard Curve	23
Performance Characteristics	24
Standards	24
Sensitivity	24
Specificity	24
Interference	24
Recovery	25
Reproducibility and Precision	25
Linearity	25
Expected Reference Values	26
Literatur / Literature	29
KURZANLEITUNG – DEMEDITEC Adiponektin ELISA DEE009	30
SUMMARY – DEMEDITEC Adiponectin ELISA DEE009	31

*please ask for package inserts in your national language

** please ask for special package insert

PACKUNGSBEILAGE DEUTSCH

Demeditec Adiponektin ELISA DEE009

- ist geeignet für Adiponektin Bestimmungen in **Serum-** und **Plasma, Zellkulturmedien**
- alters- und geschlechtsspezifische **Referenzwerte** wurden ermittelt
- ist **schnell**: Inkubationszeit insgesamt nur 1 Stunde und 45 Minuten.
- hohe analytische Sensitivität (**< 0,6 ng/ml**)
- Einzel-Standards mit **2, 10, 30, 70 bzw. 100 ng/ml** humanem Adiponektin sind im Kit enthalten.
- 2 Kontrollseren zur RiliBÄK-konformen **Qualitätssicherung**
- kalibriert gegen **natives Adiponektin** und einen kommerziell erhältlichen Radioimmunoassay
- verwendet **hochaffine monoklonale Antikörper** gegen natives Adiponektin
- Testplatten enthalten **einzel abbrechbare Vertiefungen**

Zugelassener Verwendungszweck

Messung von humanem Adiponektin in menschlichem Serum und Plasma.

Einführung

Adiponektin ist ein 30kDa Protein dessen Anteil an Serumproteinen 0.01% umfasst. Die Synthese des Proteins erfolgt hauptsächlich durch Adipocyten, aber auch Muskelzellen und Leberzellen sind in der Lage Adiponektin zu synthetisieren. Als einziger natürlicher Induktor der Synthese ist bisher IGF-I bekannt. 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 bisher 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].

Die Bedeutung für den menschlichen Organismus ist noch nicht aufgeklärt. Erste 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]. Hier konnte auch eine hervorragende diagnostische Sensitivität und Spezifität des Demeditec DEE009 für den Nachweis von verminderter Glucose-Toleranz und Typ II Diabetes gezeigt werden [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].

Inhalt der Testverpackung

1)	SORB MT	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen , die in 12 abnehmbare Streifen à 8 Vertiefungen (einzel n abbrechbar) aufgeteilt ist. Die Platte ist mit einem Antikörper gegen humanes Adiponektin beschichtet.
2)	CAL	Standards A-E , lyophilisiert, enthalten natives Adiponektin. Die Verdünnungen der Standardkurve decken einen Bereich von 2 bis 100 ng/ml (2, 10, 30, 70 und 100 ng/ml) Adiponektin ab und werden in je 750 µl Verdünnungspuffer VP rekonstituiert. Für den Assay werden jeweils 100 µl pro Vertiefung eingesetzt. Falls die Standards für mehr als eine Assay-Durchführung benötigt werden sollten, empfehlen wir die rekonstituierten Standards gefroren bei -20°C zu lagern. Achtung: die Standards dürfen nur einmal aufgetaut werden – gegebenenfalls bitte in geeigneten Volumina aliquotiert lagern!
3)	BUF	Verdünnungspuffer VP, 125 ml , gebrauchsfertig, bitte zum Rekonstituieren der Standards A – E, der Kontrollseren KS1 & KS2 sowie für die Verdünnung der Proben verwenden.
4)	Control	Kontrollseren KS1 & KS2 , je 500 µl , lyophilisiert, enthalten humanes Serum und müssen in 500 µl Verdünnungspuffer VP rekonstituiert werden. Die Adiponektin Soll-Konzentration und der Schwankungsbereich sind auf dem Zertifikat angegeben. Es sollte im Assay in der gleichen Verdünnung wie die jeweiligen Proben bestimmt werden, die Soll-Konzentration erhält man nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor .
5)	ENZ CONJ	Antikörper-POD-Konjugat AK, 12 ml, gebrauchsfertig , enthält eine Mischung von biotinyliertem anti-Adiponektin Antikörper und POD(Meerrettich-Peroxidase)-markiertem Streptavidin. Für den Assay werden jeweils 100 µl pro Vertiefung eingesetzt.
6)	WASHBUF 20x	Waschpuffer WP, 50 ml , 20-fach konzentrierte Lösung, bitte vor Gebrauch 1:20 mit A.dest. oder entmineralisiertem Wasser verdünnen (z.B. den gesamten Flascheninhalt von 50 ml im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen). Achtung: endverdünnt ist der Waschpuffer nur 4 Wochen haltbar, bitte nur nach Bedarf ansetzen.
7)	SUB TMB	Substrat S, 12 ml , gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase-(POD)-Substrat, stabilisiertes H ₂ O ₂ -Tetramethylbenzidin
8)	STOP SOLN	Stopplösung SL, 12 ml , gebrauchsfertig, 0,4 N saure Lösung
9)		Abdeckfolie für Mikrotiterplatten, 2 Stück, selbstklebend

Zusätzlich benötigtes Material

Destilliertes oder entmineralisiertes Wasser zum Verdünnen des Waschpuffers WP
 Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen
 Vortex-Mischgerät
 Mikrotiterplattenschüttler (350 rpm)
 Mikrotiterplattenwisher (empfohlen)
 Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und ≥590 nm.
 Polyethylen PE/ Polypropylen PP Röhrchen zum Verdünnen der Proben

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Demeditec DEE009 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. Demeditec GmbH kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht, soweit keine gesetzliche Regelung anderes besagt.

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

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: **KS1&KS2**

Das humane Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, ist durch von der US-amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde FDA empfohlene Nachweisverfahren auf die Präsenz von Antikörpern gegen Humanes Immundefizienz-Virus (HIV I und II), gegen Hepatitis B-Oberflächenantigen und gegen Hepatitis C Virus geprüft und für negativ befunden worden. Da kein Test das Vorhandensein von infektiösen Erregern völlig ausschließen kann, sollten die Reagenzien gemäß der Vorgaben der Biosicherheitsstufe 2 gehandhabt werden.

Die Reagenzien **A-E, AK, VP** enthalten als Konservierungsmittel (0,01%)

2-Methyl-4-isothiazolin-3-one Solution

- R34 Verursacht Verätzungen
- R43 Kann bei Hautkontakt zur Sensibilisierung führen
- S26 Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen
- S36/37 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung und –handschuhe tragen.
- S45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen

Die Reagenzien **A-E, AK, VP, WP** enthalten als Konservierungsmittel (0,01%) (w/w)

5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one und 2-methyl-2H-isothiazol-3-one

- R36/38 Reizend für Augen und Haut
- R43 Kann bei Hautkontakt zur Sensibilisierung führen
- S26 Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen
- S28.1 Im Falle von Hautkontakt sofort mit viel Wasser waschen

Substratlösung (S)

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

- R20/21/R22 Gesundheitsschädlich bei Inhalation, Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
- R36/37/38 Reizend/Irritierend für Augen, Haut und Atmungssystem
- S26 Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen
- S36/37 Geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

Stopplösung (SL)

Die Stopplösung enthält 0,2 M Schwefelsäure (H₂SO₄)

- R36/38 Reizt die Augen und die Haut
- S26 Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.
- S36/37 Geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

Erste-Hilfe Maßnahmen:

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

Nach Augenkontakt: Nach Berührung mit den Augen während mindestens 15 Minuten 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.

Methode

Der Demeditec ELISA für Adiponektin DEE009 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.

Geeignete Proben

Geeignet sind humane Serum- und Plasmaproben. EDTA- und Citrat Plasma Proben werden mit 18% tieferen Werten gefunden. Sowie Zellkulturmedium, Urin und Muttermilch.

Das Blut zur Serumgewinnung mittels standardmäßiger Venenpunktion entnehmen. Die Proben sollten ohne Antikoagulanzen aufbewahrt werden. Hämolytische Reaktionen sind zu vermeiden. Das Blut koagulieren lassen und das Serum durch Zentrifugation abtrennen.

Lagerung der Proben

Lagerung bei RT	max. 2 Tage
Lagerung bei -20°C	max. 2 Jahre

Die Proben dürfen nicht öfter als fünfmal eingefroren/aufgetaut werden.

Proben Vorbereitung

Die Proben müssen in Verdünnungspuffer VP verdünnt werden. Die gute Linearität des Testsystems (vgl. Leistungsmerkmale) ermöglicht Probenverdünnungen von 1:200 – 1:1600.

Wir empfehlen für den klinischen Bereich eine Serum- oder Plasma-Verdünnung von 1:310.

Verdünnungsprotokoll:

z.B. 300 µl Verdünnungspuffer VP in PE-/PP-Gefäße vorlegen (bei größeren Serien empfiehlt sich hierfür die Verwendung eines Multi-Steppers), dazu 10 µl Serum- oder Plasma pipettieren (Verdünnung 1:31). In ein weiteres PE-/PP-Gefäß 900µl Verdünnungspuffer VP vorlegen und 100µl 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.

Bei entsprechender technischer Ausstattung ist 1-Schritt 1:301 Verdünnung geeignet: 5µL Probe auf 1,5 ml Verdünnungspuffer VP geben und mischen, davon je 100 µl im Assay einsetzen.

Technische Hinweise

Der Assay ist strikt nach dem Testprotokoll durchzuführen.

Reagenzien mit unterschiedlichen Lot-Nummern sollten nicht vermischt werden. Die Testplatte und alle Reagenzien sind ungeöffnet lichtgeschützt und bei 2° - 8°C gelagert mindestens haltbar bis zum Verfallsdatum (s. Etikett).

Alle Komponenten des Kits müssen **vor Gebrauch auf Raumtemperatur** gebracht werden, die evtl. in manchen Puffern vorhandenen Präzipitate müssen vor Gebrauch durch Mischen und Erwärmen wieder gelöst werden.

Inkubation bei Raumtemperatur bedeutet: Inkubation bei 20 - 25°C.

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.

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.

Die mögliche Gefährdung durch den Umgang mit zumindest potentiell infektiösem Material muss beachtet werden.

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 Alternativoption. 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.

Standards und Kontrollen

Für die Rekonstitution der lyophilisierten Komponenten (Standards A-E, KS1 & KS2) muss der im Kit erhaltene Verdünnungspuffer VP verwendet werden. 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 muss vermieden werden.

Die rekonstituierten Standards und Kontrollen können bei –20°C für 2 Monate gelagert werden. Wiederholte Gefrier-/Taufzyklen sind zu vermeiden.

Waschpuffer

Das benötigte Volumen des Waschpuffers wird vorbereitet, indem das 20fach Konzentrat im Verhältnis 1:20 mit entionisiertem Wasser verdünnt wird. Der endverdünnte Waschpuffer kann 4 Wochen bei 4°C gelagert werden und ist vor Gebrauch auf Raumtemperatur zu bringen.

Testplatte

Nicht verwendete Streifen der Testplatte sind zusammen mit dem Trockenkissen luftdicht bei 2° - 8°C zu lagern. Die Haltbarkeit ist bei sachgerechter Lagerung nicht eingeschränkt.

Substrat

Die Substratlösung S, stabilisiertes H₂O₂-Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich – Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

Testdurchführung

Die Messungen (Standards, Kontrollen 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 müssen Standards, Kontrollseren und die jeweiligen Proben möglichst in 15 Minuten pipettiert werden.

Alle Inkubationen müssen bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) erfolgen

Das Antikörper-POD-Konjugat AK sowie nachfolgend die Substratlösung S sollten in der gleichen Reihenfolge und in dem gleichen Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Ebenso sollte die Stopplösung SL in der gleichen Reihenfolge und im gleichen Zeitintervall wie die Substratlösung auf die Testplatte gegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

- 1) In die ersten Vertiefungen werden 100 µl Verdünnungspuffer VP pipettiert (Leerwert). Im Anschluss daran werden jeweils 100 µl der Standardlösungen oder der verdünnten Kontrollen oder Proben in die Vertiefungen gegeben.
- 2) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **1 Stunde** bei Raumtemperatur inkubiert (unter Schütteln 350 rpm).
- 3) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Lösungen abgesaugt und die Platte mit **300 µl Waschpuffer WP / Vertiefung dreimal** gewaschen. Der Waschpuffer sollte vor dem Absaugen mindestens 15 Sekunden in den Vertiefungen verbleiben.
- 4) Im Anschluss an den letzten Waschschrift werden **100 µl des Antikörper-POD-Konjugates** AK in jede Vertiefung pipettiert.
- 5) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubiert (unter Schütteln 350 rpm).
- 6) Nach Abschluss dieser Inkubation wird die Platte wie in Schritt 3) beschrieben gewaschen
- 7) In jede Vertiefung werden **100 µl der Substratlösung S** pipettiert.
- 8) Die Platte wird **15 Minuten** im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert
- 9) Nach Ablauf der Inkubationszeit wird in jede Vertiefung **100 µl Stopplösung SL** pipettiert.
- 10) Die Ausmessung der Farbreaktion erfolgt **innerhalb von 30 Minuten** bei 450 nm (Referenzfilter ≥590 nm).

Auswertung

Berechnung der Standardkurve

Zur Auswertung des Testes muss gewährleistet sein, dass die Extinktionen des Leerwertes 0,25 Einheiten nicht überschreiten, Standard E muss dagegen Extinktionen über 1,0 Einheiten erreichen.

Proben, die höhere Extinktionen als der Standard E erzielen, liegen außerhalb der Standardkurve, zur sicheren Bestimmung müssen diese Proben in einer zweiten Testdurchführung bei höherer Verdünnung nochmals bestimmt werden.

Die bereitgestellten Standards enthalten folgende Adiponektin-Konzentrationen:

Standard	A	B	C	D	E
ng/ml	2	10	30	70	100
µg/ml	0,002	0,01	0,03	0,07	0,1

- 1) Ermittlung des **Mittelwerts** (MW) der optischen Dichte des Leerwertes aus den Doppelbestimmungen (Vertiefung A1/A2).
- 2) Von den Mittelwerten der optischen Dichte der Standardkonzentrationen und der Proben wird der mittlere Leerwert abgezogen.
- 3) Die Standardkonzentrationen (x-Achse) werden gegen die gemessene optische Dichte (y-Achse) aufgetragen.
- 4) Die Berechnung der Standardkurve 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.
- 5) Aus der Standardkurve erhält man derart die Adiponektin-Konzentration der verdünnten Kontrollen KS1 & KS2 bzw. der verdünnten Proben (mit der individuellen Verdünnung, allgemein für Serum- und Plasma empfohlen 1:310). Die **Multiplikation** des jeweiligen berechneten Adiponektin-Gehaltes **mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor** ergibt dann die Adiponektin-Konzentration der unverdünnten Ausgangslösungen (je nach gewählter Einheit der Konzentration der Standards!).

Die hier beispielhaft gezeigte Standardkurve (Abbildung 1) darf **nicht für die Auswertung** Ihres Testes genutzt werden. Für jeden Test ist eine eigene Standardkurve anzufertigen.

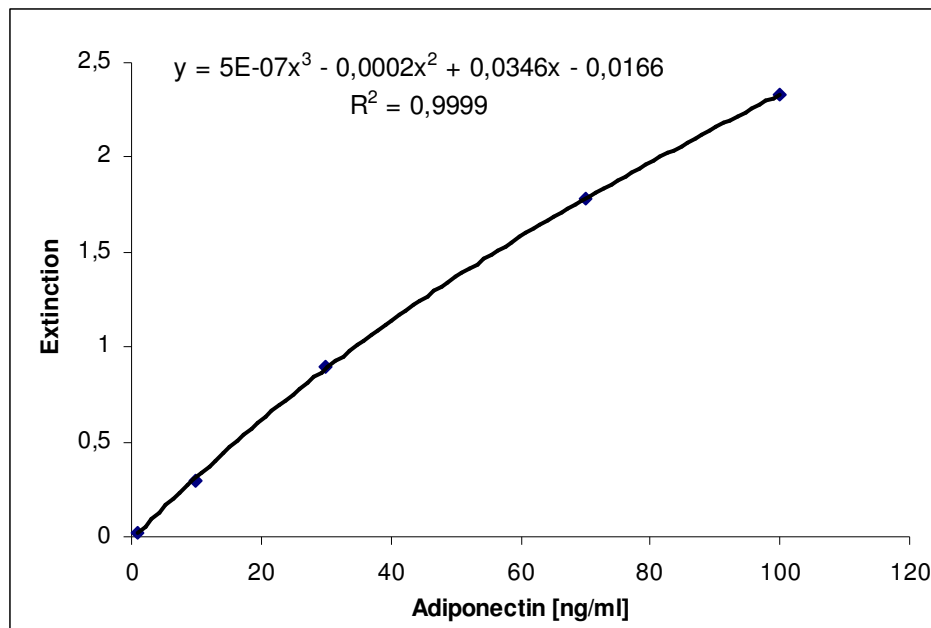


Abb. 1 Typische Standardkurve mit einem Polynom 3. Grades zur Berechnung der Standardkurve

Beispielhafte Berechnung der Adiponektin – Konzentration einer 1:310 verdünnten Probe:

Gemessene Extinktion der Probe: 0,39
 Gemessene Extinktion des Nullwertes: 0,04

Aus der Differenz der Probenextinktion und der Extinktion des Leerwertes (0,35) **berechnet Ihr Auswertungsprogramm** mit der entsprechenden Kurvenanpassung (hier: Polynom 3. 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

$$\begin{aligned} 0,35 &= 5 \times 10^{-7} x^3 - 0,0002 x^2 + 0,0346 x - 0,0166 \\ 11,13 &= x \end{aligned}$$

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

$$11,13 \times 310 = 3450,3 \text{ ng/mL} = 3,45 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Leistungsmerkmale

Standard

Die Standards des ELISA DEE009 bestehen aus **nativem Adiponektin** (humanes Serum) in Konzentrationen von **2, 10, 30, 70 und 100 ng/ml**. Das native Adiponektin wurde mit rekombinantem Protein sowie einem kommerziellen Radioimmunoassay (Linco Corp.) für Adiponektin quantifiziert.

Sensitivität

Die analytische Sensitivität des ELISA DEE009 beträgt **< 0,6 ng/ml** (entsprechend < 0,06 ng pro Vertiefung; zweifache Standardabweichung des Null-Standards in 16facher Bestimmung).

Spezifität

Seren der unten genannten Spezies wurden 1:505 verdünnt im Testsystem eingesetzt. Es konnte keine Kreuzreaktivität nachgewiesen werden.

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

Interferenz

Die Interferenz physiologisch auftretender Substanzen wurde durch Zugabe unterschiedlicher Mengen dieser Substanzen zu Serumproben getestet. In Tabelle 1 ist die relative Wiederfindung im Vergleich zum Serum ohne Zusätze für die maximal zugegebene Menge der potentiell interferierenden Substanz dargestellt.

Keine der untersuchten Substanzen beeinflusst das Ergebnis des Testes signifikant.

Tabelle 1: %-Wiederfindung im Vergleich zum Normalserum

%	Triglyceride 100 mg/mL	Bilirubin 100µg/mL	Hemolysat 100µg/mL
Serum 1	95	97	90
Serum 2	90	93	97
Serum 3	95	94	93

Recovery

Die Wiederfindung des rekombinanten Adiponektins betrug in einer Serummatrix durchschnittlich 110%.

Tabelle 2: Wiederfindung von Adiponektin

Adiponektin [ng/mL]	9,38	18,75	37,5	75
% Recovery	109	116	101	113

Reproduzierbarkeit und Präzision

Die Inter- und Intra-Assay Variationskoeffizienten sind **kleiner als 6,7% bzw. 4,7%**. Beispielhafte Bestimmungen sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 dargestellt

Tabelle 3 : Inter-Assay-Varianz

	Anzahl der unabh. Durchführungen	Mittelwert (µg/ml)	Standardabweichung (µg/ml)	VK (%)
Probe 1	22	4,76	0,28	5,88
Probe 2	25	5,22	0,35	6,72
Probe 3	25	5,62	0,32	5,70
Probe 4	25	11,57	0,68	5,90

Tabelle 4: Intra-Assay-Varianz

	Anzahl der Bestimmungen	Mittelwert (µg/ml)	Standardabweichung (µg/ml)	VK (%)
Probe 1	16	5,87	0,138	2,35
Probe 2	16	12,19	0,377	3,10
Probe 3	16	14,36	0,668	4,66

Linearität

Der Demeditec Adiponektin ELISA DEE009 ist über einen sehr weiten Bereich verdünnungsecht. Die Linearität von Serenverdünnungen ist hervorragend (s. Tab.5):

Tabelle 5: Verdünnungslinearität (hier: typische Ergebnisse zweier verschiedener Seren)

Verdünnung:	Probe 1 [µg/ml]	Verdünnung:	Probe 2 [µg/ml]
1:200	12,49	1:200	11,58
1:400	11,92	1:400	11,74
1:600	10,80	1:600	11,41
1:800	11,17	1:800	11,35
1:1000	12,06	1:100	10,58
1:1200	11,64	1:1200	10,96
1:1400	10,86	1:1400	11,18
1:1600	10,75	1:1600	10,61
MW / 1SA / VK%	11,46 / 0,66 / 5,8	MW / 1SA / VK%	11,18/ 0,43 / 3,8

MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient

Referenzwerte

Die Erwartungswerte für Adiponektin wurden mit dem Demeditec ELISA DEE009 in gesunden Probanden bestimmt. Nachfolgend sind verschiedene Gruppierungen der Daten statistisch analysiert worden, je nach Fragestellung können die am besten geeigneten Bereiche verwendet werden (Tab.6). 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.

Tabelle 6a: 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 6b: 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 6c: 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 6d:

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

Demeditec Diagnostics GmbH • Lise-Meitner-Straße 2 • D-24145 Kiel (Germany)

PACKAGE INSERT ENGLISH

Demeditec **Adiponectin ELISA DEE009** –

- is suited for Adiponectin determination in **Serum** and **Plasma** samples,
- age- and sex specific **reference values** are available
- is extremely sensitive (less than **0.6 ng/ml**)
- is **fast**: incubation time a total of 1 hour and 45 minutes
- Single Standards with **2, 10, 30, 70, 100 ng/ml** human Adiponectin are provided in the Kit
- 2 Control Sera are provided for quality control purposes according GLP
- is calibrated with native **Adiponectin** and correlated to a commercialised radioimmunoassay
- uses **high affinity monoclonal antibodies** against human Adiponectin
- Microtiter plates are separately breakapart

Intended Use

Measurement of human Adiponectin in human serum and plasma samples.

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. Until now, IGF-I is the only known natural inducer of the synthesis. 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]. Up to now 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].

The significance for the human organism is not clear until now. First 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 testsystem for the determination of HMW adiponectin [10]. Blueher et al. clearly demonstrate that regarding the diagnosis of insulin resistance, measured by whole body glucose uptake below 40 $\mu\text{mol}/\text{kg} \cdot \text{min}$, total adiponectin as determined with the Demeditec DEE009, is with an area of 0.92 under the receiver-operating curve, of greater diagnostic value [10].

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

Reagents Provided

1)	SORB MT	Microtiter plate , ready for use: Microtiter plate with 96 wells, dived up in 12 stripes à 8 wells (separately breakapart), coated with anti-human Adiponectin antibody.
2)	CAL	Standards A-E , lyophilised, contain native Adiponectin. Standard values are between 2-100 ng/ml (2, 10, 30, 70 and 100 ng/ml) Adiponectin and have to be reconstituted in 750 µl (each) Dilution Buffer VP . 100 µl per well are used in the assay. If the standards are required for more than one assay process we recommend to store the reconstituted Standards frozen at -20°C. Attention: Standards should be thawed only once – where required please store aliquoted in adequate volumes.
3)	BUF	Dilution buffer VP , 125 ml , ready for use, please use for the reconstitution of Standards A-E, Control Sera KS1 & KS2 and for the serum dilution.
4)	Control	Control Serum KS1 & KS2 , each 500 µl lyophilised: Contains human Serum and has to be reconstituted in 500 µl Dilution Buffer VP . The Adiponectin target value concentration and the respective range are given in the certificate. The dilution of the Control Sera KS 1&2 should be according to the dilution of the respective samples, the target value concentration should be obtained by multiplication with the respective dilution factor .
5)	ENZ CONJ	Antibody-POD-Conjugate AK , 12 ml , ready for use , contains a mixture of biotinylated anti-Adiponectin antibody and HRP (Horseradish Peroxidase)-labelled Streptavidin. Use 100 µl/well in the assay.
6)	WASHBUF 20x	Washing Buffer (WP) , 50 ml , 20 X concentrated solution. Washing Buffer (WP) has to be diluted 1:20 with distilled or demineralised water before use (e.g. add the complete contents of the flask (50 ml) into a graduated flask and fill up with A.dest. to 1000 ml). Attention: After dilution the Washing Buffer is only 4 weeks stable, dilute only according to requirements.
7)	SUB TMB	Substrate (S) , 12 ml , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP)-substrate, stabilised H ₂ O ₂ Tetramethylbendine.
8)	STOP SOLN	Stopping Solution (SL) , 12 ml , ready for use, 0.4 N acidic solution, Caution acid!
9)		Sealing tape for covering of the microtiter plate, 2 x, adhesive.

Materials Required but not provided

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

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For in-vitro diagnostic use only. For professional use only.

Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.

Before use, all kit components should be brought to **room temperature at 20 - 25°C**. Precipitates in buffers should be dissolved before use by thorough mixing and warming.

Do not mix reagents of different lots. Do not use expired reagents.

The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 - 8°C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.

Caution: This kit contains material of human and/or animal origin. Source human sera for the Control Sera provided in this kit were tested by FDA recommended methods and found non-reactive for Hepatitis-B surface antigen (HBsAg), Hepatitis C virus (HCV), and Human Immunodeficiency Virus 1 and 2 (HIV) antibodies. No known test methods can offer total assurance of the absence of infectious agents; therefore all components and patient's specimens should be treated as potentially infectious.

Following components contain < 0.01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one solution as preservative **A-E, AK, VP**

R34	Irritating to eyes and skin
R43	Sensibilisation through skin contact possible
S26	In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice
S36/37	Wear suitable protective clothing and gloves
S45	In case of accident or if you feel unwell seek medical advice

Following components contain < 0.01% (w/w) 5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one as preservative: **A-E, AK, VP, WP**

R36/38	Irritating to eyes and skin
R43	Sensibilisation through skin contact possible
S26	In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice
S28.1	After contact with skin, wash immediately with plenty of water

Stop solution contains 0.2 M Sulfuric Acid (H₂SO₄)

R36/38	Irritating to eyes and skin
S26	In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice
S28.1	After contact with skin, wash immediately with plenty of water
S36/37	Wear suitable protective clothing and gloves.

Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step. Use separate pipette tips for each sample, control and reagent to avoid cross contamination. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.

TMB-Substrate (S) contains 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine. Store and Incubate in the dark.

R20/21/R22	Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed
R36/37/38	Irritating to eyes, respiratory system and skin
S26	In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice
S28.1	After contact with skin, wash immediately with plenty of water
S36/37	Wear suitable protective clothing and gloves

General first aid procedures:

Skin contact: Wash affected area thoroughly with water. Discard 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: If swallowed, wash out mouth thoroughly with water. Immediately see a physician.

Do not eat, drink or smoke in these areas.

Never pipette the materials with the mouth.

Spilled material must be wiped off immediately and should become disinfected. Clean contaminated areas and equipment with a suitable detergent.

Method

The Demeditec ELISA for Adiponectin DEE009 is a so-called Sandwich-Assay using two specific and high affinity 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.

Specimen

Serum and plasma samples are applicable. In EDTA- and Citrate Plasma-samples levels were found approx. 18% lower. Adiponectin can also be measured in urine, breast milk and cellculture media by this testsystem.

The blood sample for serum preparation should be gained according to standardized venipuncture procedure. The samples should be stored without anticoagulation reagents. Hemolytic reactions have to be avoided. The blood has to be allowed to clot and after complete clotting, serum is separated by centrifugation.

Storage of the samples

Storage at RT max. 2 days

Storage at -20°C max. 2 years

More than five freeze/thaw cycles are not possible.

Sample Preparation

Samples have to be diluted in Dilution Buffer (VP). The excellent linearity of this testsystem allows sample dilution of 1:200 to 1:1600.

For clinical purposes we recommend a standard dilution of 1:310.

Suggestion for dilution protocol:

Dilute for example 300 µl Dilution Buffer VP 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 **VP** in an other 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.

If you have the necessary technical equipment a one-step dilution of 1:301 is possible: Ad 5 µL to 1.5 mL dilution buffer VP.

Technical Notes

The assay has to be conducted strictly according the test protocol herein.

Reagents with different lot numbers cannot be mixed. The microtiter plate and reagents are stable until the indicated expiry if stored unopened and protected from sunlight at 2 – 8°C.

The shelf life of the components after opening is not affected, if used appropriately.

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.

Incubation at room temperature means: 20-25°C

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 become 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.

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 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 dynamically 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.

Standards and Controls

For the reconstitution of the lyophilised components (Standards A - E and Control Sera KS1 &KS2) the kit Dilution Buffer VP has to be used. It is recommended to keep reconstituted reagents at room temperature for 15 minutes and then to mix them thoroughly but gently (no foam!) with a Vortex mixer.

The reconstituted standard and controls can be stored for 2 months at -20°C. Repeated freeze/thaw cycles have to be avoided.

Washing Buffer

The required volume of washing buffer is prepared by 1:20 dilution of the provided 20fold concentrate with deionised water. The diluted Washing Buffer is stable for 4 weeks at 2-8°C. It has to be at room temperature for usage!

Microtiter plate

Unused microtiter plate stripes have to be stored airtight together with the desiccant bag at 2-8°C. The labelled expiry is not influenced in case of proper storage.

Assay Procedure

All determinations (Standards, Control Sera KS1 & KS2 and samples) should be assayed in duplicate. For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

When performing the assay, the Standards, Control Sera and the samples should be pipette as fast as possible (e.g., <15 minutes).

All incubations have to conducted at room temperature (20-25°C)

To avoid distortions due to differences in incubation times, Antibody-POD-Conjugate AK as well as the following Substrate Solution S should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples. Stop Solution SL should be added to the plate in the same order as the Substrate Solution.

- 1) Add **100 µl** Dilution Buffer VP in the first wells. Subsequently add 100 µl Standard or 100 µl of diluted Control Sera or diluted samples.
- 2) Cover the wells with sealing tape and incubate the plate for **1 hour at room temperature** (shake at 350 rpm)
- 3) After incubation aspirate the contents of the wells and wash the wells **3 times 300 µl Washing Buffer WP** / well. The washing buffer should incubate for at least for 15 seconds/cycle.
- 4) Following the last washing step pipette **100 µl** of the **Antibody-POD-Conjugate AK** in each well.
- 5) Cover the wells with sealing tape and incubate the plate for **30 Minutes at room temperature** (shake at 350 rpm).
- 6) After incubation wash the wells **3 times** with Washing Buffer as described in step 3
- 7) Pipette **100 µl of the TMB Substrate** Solution in each well.
- 8) Incubate the plate for **15 minutes in the dark at room temperature (20 - 25°C)**.
- 9) Stop the reaction by adding **100 µl of Stopping Solution**.
- 10) Measure the colour reaction within 30 minutes at **450 nm (reference filter ≥590 nm)**.

Calculation of Results

Establishing the Standard Curve

For the evaluation of the assay it is preconditioned that the absorbance values of the blank should be below 0.25, these of standard E should be above 1.0.

Samples, which yield higher absorbance values than Standard E are beyond the standard curve, for reliable determinations these samples should be tested anew with a higher dilution.

Standards are provided in the following concentrations (use the concentration unit as preferred):

Standard	A	B	C	D	E
ng/ml	2	10	30	70	100
µg/ml	0.002	0.01	0.03	0.07	0.1

- 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 values.
- 3) Plot the standard concentrations on the x-axis versus the mean value of the absorbance of the standards on the y-axis.
- 4) Recommendation: Calculation of the standard 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 of the diluted sample or the diluted control sera KS1&2 in ng/ml (or µg/ml according the chosen unit for the standards) is calculated in this way, the Adiponectin concentration of the **undiluted sample** and of KS1 & KS2 is calculated **by multiplication** with the respective dilution factor.

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

Exemplary calculation of the adiponectin concentration of a 1:310 diluted sample:

Measured extinction of your sample 0.39
Measured extinction of the blank 0.04

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 3rd degree).

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

$$\begin{aligned} 0.35 &= 5 \times 10^{-7} x^3 - 0.0002x^2 + 0.0346x - 0.0166 \\ 11.13 &= x \end{aligned}$$

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

$$11.13 \times 310 = 3450.3 \text{ ng/mL} = 3.45 \text{ µg/mL}$$

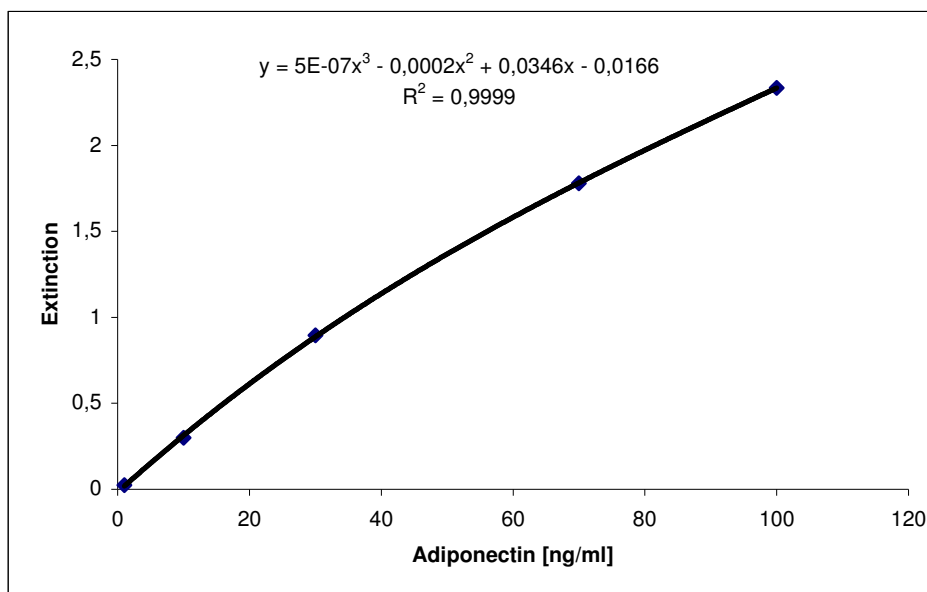


Fig. 1 Exemplary Standard Curve with a polynomial 3rd degree as curve fit.

Performance Characteristics

Standards

The Standards of the ELISA DEE009 are prepared from **native Adiponectin** (Human Serum) in concentrations of 2, 10, 30, 70 and 100 ng/ml. The native Adiponectin was quantified with a recombinant protein and with a commercialised radio immunoassay (Linco Corp.) for Adiponectin.

Sensitivity

The analytical sensitivity of the ELISA DEE009 yields < 0.6 ng/ml (equal to < 0.06 ng per well; as 2xSD of zero standard in 16fold determination).

Specificity

Serum of the cited species was diluted (1:505) and used as sample in this assay system. No cross reactivity was detected:

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

Interference

Interference of physiological appearing substance with the adiponectin measurement was investigated. Serum samples have been enriched with different concentrations of possibly interfering substances and the amount of adiponectin was measured and compared with the adiponectin concentration in the same sample without any enrichment. In Table 1 the relative results are shown. None of the tested substances interfered significantly with adiponectin measurement.

Table 1: %-Recovery compared to non-enriched serum

%	Triglyceride 100 mg/mL	Bilirubin 100µg/mL	Hemolysat 100µg/mL
Serum 1	95	97	90
Serum 2	90	93	97
Serum 3	95	94	93

Recovery

The recovery of recombinant Adiponectin yielded in a serum matrix on average 110%.

Table 2: Recovery of recombinant Adiponectin

Adiponectin [ng/mL]	9.38	18.75	37.5	75
% Recovery	109	116	101	113

Reproducibility and Precision

The inter- and intra assay coefficients of variability are below 6.7% and 4.7%, respectively. Exemplary determinations are shown in table 3 and 4.

Table 3: Inter-Assay-Variation

	Number of single determinations	Mean value (µg/ml)	Standard deviation (µg/ml)	VC (%)
Sample 1	22	4.76	0.28	5.88
Sample 2	25	5.22	0.35	6.72
Sample 3	25	5.62	0.32	5.70
Sample 4	25	11.57	0.68	5.90

Table 4: Intra-Assay-Variation

	Number of determinations	Mean value (µg/ml)	Standard deviation (µg/ml)	VC (%)
Sample 1	16	5.87	0.138	2.35
Sample 2	16	12.19	0.377	3.10
Sample 3	6	14.36	0.668	4.66

Linearity

The Demeditec Adiponectin ELISA DEE009 is over a very wide range dilution authentic, the linearity of serum dilutions is over a very wide range excellent (s.Tab.5).

Table 5: Linearity

Dilution:	Sample 1 (recalculated, µg/ml)	Dilution:	Sample 2 (recalculated, µg/ml)
1:200	12.49	1:200	11.58
1:400	11.92	1:400	11.74
1:600	10.80	1:600	11.41
1:800	11.17	1:800	11.35
1:1000	12.06	1:1000	10.58
1:1200	11.64	1:1200	10.96
1:1400	10.86	1:1400	11.18
1:1600	10.75	1:1600	10.61
AV / 1SD / VC%	11.46 / 0.66 / 5.8	AV / 1SD / VC%	11.18 / 0.43 / 3.8

AV = Average Value , SD = Standard Deviation

Expected Reference Values

The expected values for serum adiponectin, which were determined with the Demeditec ELISA DEE009 in healthy donors and analysed by Prof. Dr. J. Kratzsch, Department of Laboratory Medicine, University Hospital Leipzig, are given below (Tab. 6). 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.

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.

Table 6a: Expected values for **adults, gender specific** mean as well as median, 5. and 95. percentile are given.

Sex	number	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 6b: Expected values for **children, gender specific** mean as well as median, 5. and 95. percentile are given.

Sex	number	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 6c: Expected values for Adiponectin, **age specific** mean as well as median, 5. and 95. Percentile are given.

Age (in years)	number	Mean [$\mu\text{g/ml}$]	Median [$\mu\text{g/ml}$]	5 th Percentile [$\mu\text{g/ml}$]	95 th Percentile [$\mu\text{g/ml}$]
< 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
all	267	8.88	8.18	3.33	16.7
20 – 29.99	47	6.72	6.38	2.5	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
all	226	8.33	7.5	2.41	19.29

Table 6d: Expected values for Adiponectin, **age** as well as **gender specific** mean and median, BMI and 5. and 95. percentile are given.

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

n= Number of Proband **AV**=Average Value, **BMI**=Body Mass Index (kg/m^2) **SD**=Standard Deviation

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

Literatur / 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.

KURZANLEITUNG – DEMEDITEC Adiponektin ELISA DEE009

Reagenz:	Rekonstitution:	Verdünnung:
Standards A-E	in 750 µl Verdünnungspuffer VP	
Kontrollseren KS1 & KS2	in 500 µl Verdünnungspuffer VP	1:310 mit Verdünnungspuffer VP
Waschpuffer WP		1:20 mit Aqua. dest. (z.B. den gesamten Flascheninhalt von (50 ml) im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen)
Probenverdünnung: z.B. 1:310 (10 µl Serum werden mit 300 µl Verdünnungspuffer VP verdünnt, davon werden 100 µl in 900 µl Verdünnungspuffer verdünnt und von dieser 1:310 Verdünnung 100 µl/ Vertiefung einsetzen).		

Testdurchführung in Doppelbestimmungen:

Pipetieren	Reagenzien	Position
100 µl	Verdünnungspuffer VP	A1/2
100 µl	Standard A (2 ng/ml)	B1/2
100 µl	Standard B (10 ng/ml)	C1/2
100 µl	Standard C (30 ng/ml)	D1/2
100 µl	Standard D (70 ng/ml)	E1/2
100 µl	Standard E (100 ng/ml)	F1/2
100 µl	Kontrollserum KS1	G1/2
100 µl	Kontrollserum KS2	H1/2
100 µl	Probenverdünnung	nachfolgende Vertiefungen
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		
Inkubation: 1 h bei RT, 350 rpm		
3x 300 µl	Absaugen und die Platte 3x mit je 300 µl Waschpuffer WP / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µl	Antikörper-POD-Konjugat AK	In jede Vertiefung
Inkubation: 30 min bei RT, 350 rpm		
3x 300 µl	Absaugen und die Platte 3x mit je 300 µl Waschpuffer WP / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µl	Substratlösung S	In jede Vertiefung
Inkubation: 15 min im Dunklen bei RT		
100 µl	Stopplösung SL	In jede Vertiefung
Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥590 nm).		

SUMMARY – DEMEDITEC Adiponectin ELISA DEE009

Reagent preparation:	Reconstitution:	Dilution
Standards A-E	in 750 µl Dilution Buffer VP	
Control Sera KS1 & KS2	in 500 µl Dilution Buffer VP	1:310 with Dilution Buffer VP
Washing Buffer WP		1:20 with Aqua. dest. (e.g., add the complete contents of the flask (50 ml) into a graduated flask and fill with A.dest. to 1000 ml).

Sample Dilution: Pipette for example 300 µl Dilution Buffer VP 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 **VP** in an other 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.

Assay Procedure for Double Determination:

Pipette	Reagents	Position
100 µl	Dilution Buffer VP	A1/2
100 µl	Standard A (2 ng/ml)	B1/2
100 µl	Standard B (10 ng/ml)	C1/2
100 µl	Standard C (30 ng/ml)	D1/2
100 µl	Standard D (70 ng/ml)	E1/2
100 µl	Standard E (100 ng/ml)	F1/2
100 µl	Control Serum KS1	G1/2
100 µl	Control Serum KS2	H1/2
100 µl	Sample dilution	following wells
Cover the wells with the sealing tape.		
Incubation: 1 h at RT, 350 rpm		
3x 300 µl	Aspirate the contents of the wells and wash 3x with 300 µl Wash Buffer WP	each well
100 µl	Antibody-POD-Conjugate AK	each well
Incubation: 30 min at RT, 350 rpm		
3x 300 µl	Aspirate the contents of the wells and wash 3x with 300 µl Wash Buffer WP .	each well
100 µl	Substrate Solution S	each well
Incubation: 15 min in the Dark at RT		
100 µl	Stopping Solution SL	each well
Measure the absorbance within 30 min at 450 nm with ≥590 nm as reference wavelength.		

RÉSUMÉ DU DOSAGE

Préparation des réactifs	Reconstitution:	Dilution
Etalons A-E	dans 750 µl de Tampon de Dilution VP	
Contrôle sérique KS1 & KS2	dans 500 µl de Tampon de Dilution VP	1:310 avec Tampon de Dilution VP
Tampon de lavage WP		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)
Diluer l'échantillon : Diluer par exemple 10 µl de sérum ou plasma dans 300 µl de WP, (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 VP	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 KS1	G1/2
100 µl	Contrôle sérique KS2	H1/2
100 µl	dilution d'échantillons	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 WP	Tous les puits
100 µl	Ajouter l'Anticorps-POD-Conjugate AK	Tous les puits
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 WP	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 SL	Tous les puits
Mesurer l'absorbance dans les 30 min à 450 nm avec ≥ 590 nm longueur d'onde de référence		



CAL A-E	A -E	Rec in 750 µl BUF VP	
Control	KS1 & KS2	Rec in 500 µl BUF VP	1:310 DILU BUF VP
WASHBUF 20x	WP		1:20 DILU A. dest.

SPE	1:310 DILU BUF VP
°C 20-25 °C	

100 µl	BUF VP	A1/2
100 µl	CAL A (2 ng/ml)	B1/2
100 µl	CAL B (10 ng/ml)	C1/2
100 µl	CAL C (30 ng/ml)	D1/2
100 µl	CAL D (70 ng/ml)	E1/2
100 µl	CAL E (100 ng/ml)	F1/2
100 µl	CONTROL KS1 1:310 DILU BUF VP	G1/2
100 µl	CONTROL KS2 1:310 DILU BUF VP	H1/2
100 µl	SPE 1:310 DILU VP	
TAPE		

1 h **°C** 20-25 350 rpm

3x 300 µl	3x WASHBUF WP
100 µl	ENZ CONJ AK
TAPE	

0.5 h **°C** 20-25 350 rpm

3x 300 µl	3x WASHBUF WP
100 µl	SUB TMB S

15 min **°C** 20-25

100 µl	STOP SOLN SL
MEASURE	