

Product information

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



User's Manual

Adiponectin ELISA



DEE009



96 wells

INHALTSVERZEICHNIS / TABLE OF CONTENTS

1	ZWECKBESTIMMUNG	3
2	EINFÜHRUNG	3
3	TESTPRINZIP	3
4	WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	4
5	PROBEN	5
6	MATERIALIEN	6
7	TECHNISCHE HINWEISE	7
8	TESTDURCHFÜHRUNG	9
9	QUALITÄTSKONTROLLE.....	10
10	AUSWERTUNG	10
11	EINSCHRÄNKUNGEN.....	12
12	REFERENZWERTE	12
13	ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG	14
14	VERGLEICHSTUDIEN	18
15	WISSENSCHAFTLICHE ANWENDUNGEN	19
	ENGLISH Instructions for use	21
	LITERATUR / REFERENCES	37
	Internationale Assay Description.....	38

DEUTSCH Gebrauchsanweisung

Adiponektin ELISA DEE009	96 Bestimmungen
Testprinzip	Enzyme-linked Immunoassay
Dauer (Inkubationszeit)	1,75 h
Antikörper	Monoklonale Antikörper
Puffer	Gebrauchsfertig und 20-fach Konzentrat
Standards	5 Einzelstandards: 2 - 100 µg/L, natives humanes Adiponektin
Assay-Bereich	0,27 – 31000 µg/L
Kontrolle	2 Kontrollseren, gefriergetrocknet
Proben	humanes Serum / Plasma
Erforderliches Probenvolumen	10 µL
Probenverdünnung	1:310
Analytische Sensitivität	≤ 0,27 µg/L
Intra- / Interassay Varianz	< 10%

1 ZWECKBESTIMMUNG

Quantitative Messung von humanem Adiponektin in menschlichem Serum oder Plasma.

2 EINFÜHRUNG

Adiponektin ist ein 30kDa 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 Demeditec DEE009 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].

3 TESTPRINZIP

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.

4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Demeditec 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. 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: **Kontrollserum KS1 und KS2**

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, AK, VP, WP

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.

Substratlösung (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 (SL)

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.

4.1 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.

5 PROBEN

5.1 Probenmaterial

Serum und Plasma

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

5.2 Probenentnahme

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

5.3 Erforderliches Probenvolumen: 10 µL

5.4 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.

5.5 Interferenz

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

5.6 Probenverdünnung

- Verdünnung: **1:310** mit Verdünnungspuffer **VP**
- Beispiel: **10 µL** Probe werden zu **300 µL** Verdünnungspuffer **VP** in PE-/PP-Gefäß gegeben (Verdünnung 1:31). In ein weiteres PE-/PP-Gefäß **900 µL** Verdünnungspuffer **VP** 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.

6 MATERIALIEN

6.1 Inhalt der Testpackung

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

SORB MT	MTP	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, beschichtet mit Maus-anti-Adiponektin-Antikörper. Die Vertiefungen sind einzeln abbrechbar.	(8x12) Vertiefungen
CAL	A-E	Standards A-E , lyophilisiert (native humanes Adiponektin), die Konzentrationen sind auf dem Qualitätszertifikat in ng/mL angegeben.	5 x 750 µL
Control 1	KS1	Kontrollserum 1, KS1 lyophilisiert, (humanes Serum), die Konzentration ist auf dem Qualitätszertifikat in ng/mL angegeben.	1 x 500 µL
Control 2	KS2	Kontrollserum 2, KS2 lyophilisiert, (humanes Serum), die Konzentration ist auf dem Qualitätszertifikat in ng/mL angegeben.	1 x 500 µL
ENZ CONJ	AK	Antikörper-POD-konjugat, AK gebrauchsfertig, Maus-anti-hAdiponektin-Antikörper biotinyliert + Streptavidin Peroxidase-Konjugat	1 x 12 mL
BUF	VP	Verdünnungspuffer VP , gebrauchsfertig	1 x 125 mL
WASH SOLN 20x	WP	Waschpuffer WP , 20fach konzentrierte Lösung	1 x 50 mL
SUB TMB	S	Substrat S , gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase (POD)-Substrat, stabilisiertes Tetramethylbenzidin.	1 x 12 mL
STOP SOLN	SL	Stopplösung SL , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure.	1 x 12 mL
-	-	Abdeckfolie für die Mikrotiterplatte	2 x
↓		Packungsbeilage	1 x
-	--	Qualitätszertifikat	1 x

6.2 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

7 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 (Standards **A – E** und Kontrollseren **KS1 und KS2**) 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 **WP** 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 Standards **A – E** und Kontrollseren **KS1 und KS2** werden mit dem im Kit enthaltenen Probenpuffer **VP** 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 Kontrollseren **KS1 und KS2** im gleichen Verhältnis (1:310) wie die Proben mit dem Verdünnungspuffer **VP** verdünnt.

Das benötigte Volumen des Waschpuffers **WP** 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**. Die Substratlösung **S**, stabilisiertes H₂O₂-Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich–Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

Testdurchführung

Die Messungen (Leerwert, Standards **A-E**, Kontrollseren **KS1 und KS2** 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 Standards **A-E**, Kontrollseren **KS1, KS2** und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden z.B. in 15 Minuten). Das Antikörper-POD-Konjugat **AK** sowie nachfolgend die Substratlösung **S** und die Stopplösung **SL** 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 fesselndem 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 fesselndem Zellstoff gründlich entfernt werden.

8 TESTDURCHFÜHRUNG**Vorbereitung der Reagenzien**

Reagenzpräparation:		Rekonstitution:	Verdünnung:
A-E	Standards	in 750 µL Verdünnungspuffer VP	-
KS	Kontrollserum	in 500 µL Verdünnungspuffer VP	1:310 mit VP
WP	Waschpuffer	-	1:20 mit Aqua dest.
Proben mit Verdünnungspuffer VP 1:310 verdünnen.			
Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen.			

Testdurchführung in Doppelbestimmung:

Pipettieren	Reagenzien	Position
100 µL	Verdünnungspuffer VP (Leerwert)	A1/A2
100 µL	Standard A (2 ng/mL)	B1/B2
100 µL	Standard B (10 ng/mL)	C1/C2
100 µL	Standard C (30 ng/mL)	D1/D2
100 µL	Standard D (70 ng/mL)	E1/E2
100 µL	Standard E (100 ng/mL)	F1/F2
100 µL	Kontrollserum KS1 (1:310 verdünnt)	G1/G2
100 µL	Kontrollserum KS2 (1:310 verdünnt)	H1/H2
100 µL	Probe (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 WP / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µL	Antikörper-POD-Konjugat AK	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 WP / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µL	Substratlösung S	In jede Vertiefung
Substrat S Inkubation: 15 Minuten im Dunklen bei 20-25°C		
100 µL	Stopplösung SL	In jede Vertiefung
Messung der Absorption innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm).		

9 QUALITÄTSKONTROLLE

GLP erfordert, dass mit jeder Standardkurve 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.

9.1 Qualitätskriterien

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

10 AUSWERTUNG

10.1 Erstellung der Standardkurve

Die bereitgestellten Standards enthalten folgende Adiponektin-Konzentrationen:

Standard	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).
- 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) Die Multiplikation des jeweiligen für die Proben bzw. Kontrollen KS1 und KS2 berechneten Adiponektin-Gehaltes mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor der Proben ergibt die Adiponektin-Konzentration in ng/mL

10.2 Beispiel einer typischen Standardkurve

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

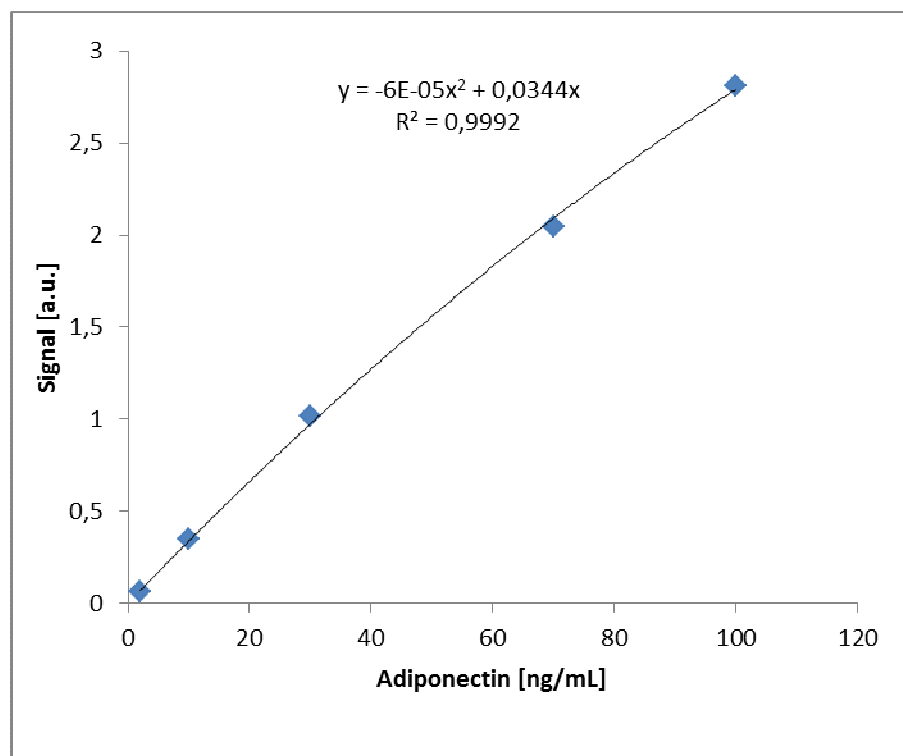


Abbildung 1 Exemplarische Standardkurve

10.3 Beispielhafte Berechnung der Adiponktin-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 Adiponectin-Konzentration der verdünnten Probe durch Auflösen der Gleichung aus Abb. 1 nach x. In diesem Fall ergibt sich eine Adiponectin-Konzentration in der verdünnten Probe von

$$\begin{aligned} 0,400 &= -6 \times 10^{-5}x^2 + 0,0344x \\ 11,89 &= x \end{aligned}$$

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

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

10.4 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.

10.5 Einschränkungen

Der Demeditec Adiponectin ELISA DEE009 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.

11 Referenzwerte

Die Erwartungswerte für Adiponectin wurden mit dem Demeditec ELISA DEE009 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 Adiponectin-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 Adiponectin 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 Adiponectin 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 Adiponectin, 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

12 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG

12.1 Sensitivität

Die analytische Sensitivität wurde basierend auf der zweifachen Standardabweichung des Null-Signals (Blank) berechnet. Sie beträgt für den Demeditec ELISA DEE009 im Mittel 0,27 ng/mL (Bereich 0.094 - 0,59 ng/ml).

12.2 Spezifität

Adiponectin existiert in verschiedenen oligomeren Molekulargewicht-Formen: die hohe, mittlere und niedrige Form. Eine unterschiedliche Anzahl von Adiponektin monomeren aggregieren spezifisch zu einem Komplex. In Figur 2a sind die fünf verschiedenen Formen des menschlichen Adiponektins schematisch dargestellt. Parallel werden die Ergebnisse einer Größen Ausschluss-Chromatographie von human Serum, bestimmt mit dem Demeditec DEE009 Adiponectin ELISA, angezeigt.

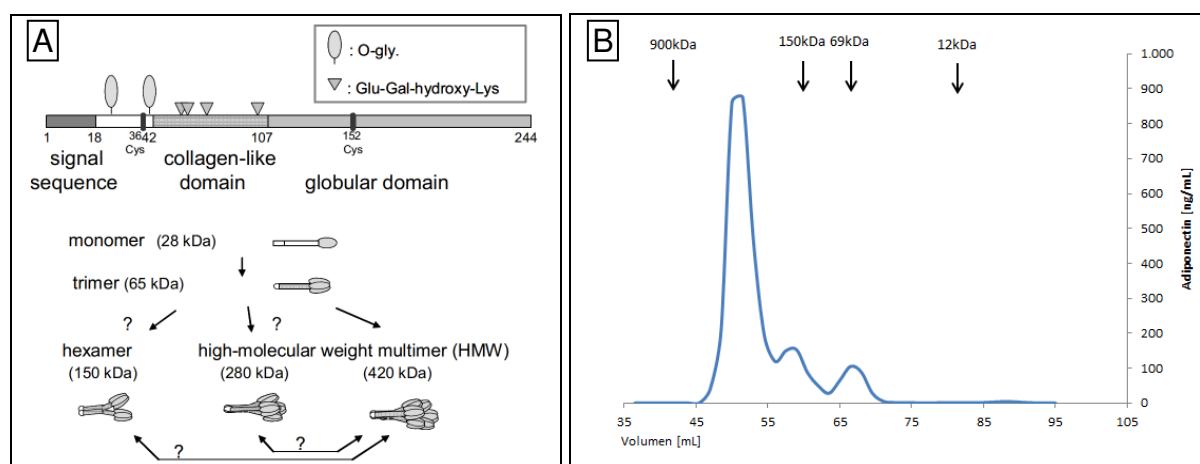


Abbildung 2 Adiponectin Struktur (A) proteinartigen Struktur des menschlichen Adiponektin einschließlich posttranslationale Modifikationen und multimeren Formen (von Nakano et al). (B) Ergebnisse einer Serumtrennung mittelsGrößen Ausschluss-Chromatographie. Die Probe wurde fraktioniert und der Adiponektin-Gehalt jeder Fraktion wurde durch Demeditec DEE009 gemessen, Zum Vergleich werden die entsprechenden Größen in kDa durch die schwarze Pfeile angedeutet.

Die Ergebnisse in 2b zeigen, dass Demeditec DEE009 Adiponectin ELISA alle Formen von im menschlichen Serum vorhandenen Adiponektin erfasst: das Trimer bei 65 kDa, das Hexamer in 150 kDa und die Formen mit hohem Molekulargewicht von > 280 kDa.

Demeditec DEE009 Adiponectin ELISA misst daher total Adiponektin.

12.3 Präzision

Intra-Assay Varianz

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

Tabelle 2 Intra-Assay-Variation. Rekombinantes Adiponektin 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

12.4 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 VP 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 erwarteten Adiponektinkonzentration betrug in den Verdünnungen weniger als 30%.

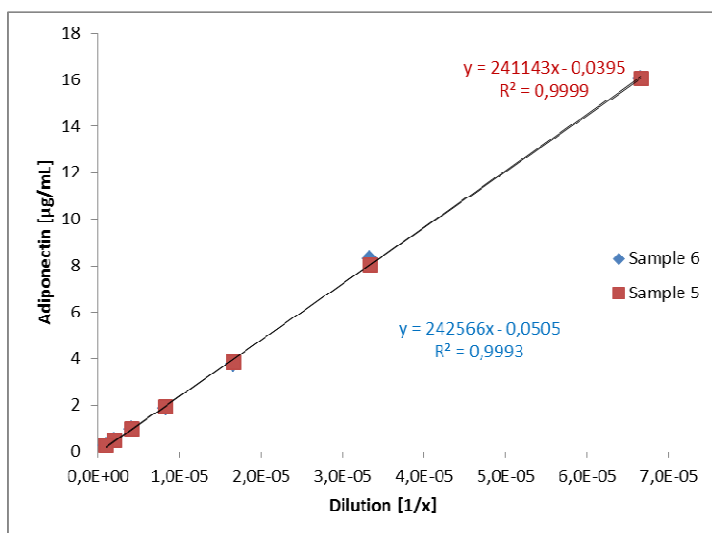


Abbildung 3 Linearität. Zur Bestimmung der Linearität wurden zwei Serumproben in einem Bereich von 1:1500 bis 1:96000 verdünnt und die Adiponektinkonzentration in den jeweiligen Verdünnungen gemessen.

12.5 Wiederfindung und Richtigkeit

Die Richtigkeit und Rückführbarkeit des Demeditec Adiponektin ELISA DEE009 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 VP berechnet.

VP 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

12.6 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 Lösungsmittles 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 nativen 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	--

13 VERGLEICHSTUDIEN

Demeditec Adiponectin, DEE009 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 Demeditec 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.

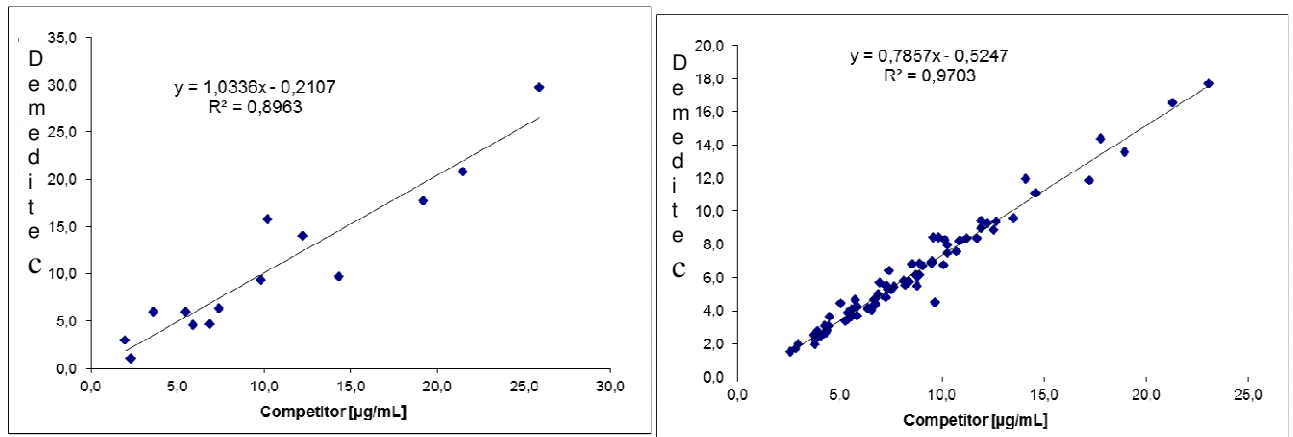


Abbildung 4 Assay Vergleich mit kommerziell verfügbaren Testsystemen (links) Radioimmunoassay (n=14) und (rechts) ELISA (n=76).

Gebrauchsinformation für wissenschaftliche Anwendungen

14 WISSENSCHAFTLICHE ANWENDUNGEN

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

14.1 Geeignete Proben für Forschungszwecke

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

Empfohlene Probenverdünnung von Serum und Plasma in Verdünnungspuffer **VP**: 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

14.2 Kreuzreaktivität

Die Kreuzreaktivitäten von mehreren handelsüblichen tierischen Seren wurden in diesem Assay getestet. Dazu wurden die Seren in verschiedenen Verdünnungen als Probe in den Demeditec Adiponectin ELISA DEE009 eingesetzt.

In den Seren der folgenden Arten wurde **KEIN SIGNAL** detektiert: Pferd, Rind, Huhn, Kaninchen, Hund, Meerschweinchen, Schaf, Maus, Ziege, Esel, Ratte, Katze, Schwein.

TABLE OF CONTENTS	20
ENGLISH Instructions for use	21
1 INTENDED USE.....	21
2 INTRODUCTION.....	21
3 ASSAY PRINCIPLE	21
4 WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	22
5 SAMPLES	23
6 MATERIALS	24
7 TECHNICAL NOTES.....	25
8 ASSAY PROCEDURE	27
9 QUALITY CONTROL	28
10 EVALUATION OF RESULTS.....	28
11 PERFORMANCE CHARACTERISTICS	32
12 COMPARISON STUDIES	35
13 SCIENTIFIC APPLICATION.....	36
14 LITERATUR / REFERENCES.....	37
Internationale Assay Description.....	38

ENGLISH Instructions for use

Adiponectin ELISA DEE009	96 Determinations
Principle of the test	Enzyme-linked Immunoassay
Duration (incubation period)	1.75 h
Antibodies	monoclonal antibodies
Buffer	Ready for use and 20fold concentrate
Standard	5 single standards: 2 - 100µg/L, native human Adiponectin
Assay Range	0.27 - 31000µg/L
Control	2 control sera, freeze-dried
Sample	human serum / plasma
Required sample volume	10 µL
Sample dilution	1:310
Analytical sensitivity	≤ 0.27 µg/L
Intra- / Interassay Variance	<10 %

1 INTENDED USE

The ELISA DEE009 is intended to be used for quantitative measurement of human Adiponectin in human serum and plasma samples.

2 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 Demeditec DEE009 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 disease [19, 20]. Beside this Adiponectin influences further physiological processes as for example the angiogenesis [21, 22].

3 ASSAY PRINCIPLE

The Demeditec ELISA for Adiponectin DEE009 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.

4 WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

The Demeditec 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. Demeditec 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: **Control Sera KS1 and KS2, and Standards A.E**
Source human serum for the control sera 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, AK, VP, WP

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 Solution (S)

The TMB-Substrate (S) contains 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine (<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.

Stopping Solution (SL)

The Stopping 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.

4.1 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.

5 SAMPLES

5.1 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.

5.2 Specimen collection

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

5.3 Required sample volume: 10 µL

5.4 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.

5.5 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.


5.6 Sample dilution

- Dilution: **1:310** with Dilution Buffer **VP**
- 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 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 **VP**.
- Sample stability after dilution of the sample: maximum 1 hour at 20-25°C.

6 MATERIALS

6.1 Materials provided

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

SORB MT	MTP	Microtiter plate , ready for use, coated with mouse-anti-Adiponectin-antibody. Wells are separately breakable.	(8x12) wells
CAL	A-E	Standards , lyophilized, (native human Adiponectin), concentrations are given on quality certificate in ng/mL.	5 x 750 µL
Control 1	KS1	Control Serum 1 , lyophilised, (human serum), concentration is given on quality certificate in ng/mL.	1 x 500 µL
Control 2	KS2	Control Serum 2 , lyophilised, (human serum), concentration is given on quality certificate in ng/mL.	1 x 500 µL
ENZ CONJ	AK	Antibody-HRP-Conjugate , ready for use, mouse-anti-hAdiponectin-antibody biotinylated + streptavidin horseradish peroxidase conjugate	1 x 12 mL
BUF	VP	Dilution Buffer , ready for use	1 x 125 mL
WASHSOLN 20x	WP	Washing Buffer , 20-fold concentrated solution	1 x 50 mL
SUB TMB	S	Substrate , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP) substrate, stabilised Tetramethylbencidine.	1 x 12 mL
STOP SOLN	SL	Stopping 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

6.2 Materials required, but not provided

- Distilled (Aqua destillata) or deionized water for dilution of the Washing Buffer **WP (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

7 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** standards **A-E** and Control Sera **KS1 and KS2** 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 **WP** 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 Standards **A – E** and Control Sera **KS1 and KS2** are reconstituted with the Dilution Buffer **VP**. 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 **KS1 and KS2** with the Dilution Buffer **VP** in the same ratio (1:310) as the sample. The required volume of Washing Buffer **WP** is prepared by 1:20 dilution of the provided 20fold concentrate with Aqua dest.

Assay Procedure

When performing the assay, Blank, Standards **A-E**, Controls **KS1, KS2** 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 **AK** as well as the succeeding Substrate Solution **S** should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples. Stopping Solution **SL** should be added to the plate in the same order as Substrate Solution **S**.

All determinations (Blank, Standards **A-E**, Controls **KS1, KS2** 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 Solution **S**, stabilised H₂O₂-Tetramethylbencidine, 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 **WP** 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.

8 ASSAY PROCEDURE

Preparation of reagents		Reconstitution:	Dilution
A-E	Standards	in 750 µL Dilution Buffer VP	-
KS1 and KS2	Control Sera	in 500 µL Dilution Buffer VP	1:310 with VP
WP	Washing Buffer	-	1:20 with Aqua dest.
Sample dilution: with Dilution Buffer VP 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 VP (Blank)	A1/A2
100 µL	Standard A (2 ng/mL)	B1/B2
100 µL	Standard B (10 ng/mL)	C1/C2
100 µL	Standard C (30 ng/mL)	D1/D2
100 µL	Standard D (70 ng/mL)	E1/E2
100 µL	Standard E (100 ng/mL)	F1/F2
100 µL	Control Serum KS1 (1:310 diluted)	G1/G2
100 µL	Control Serum KS2 (1:310 diluted)	H1/H2
100 µL	Sample (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 WP/ well	In each well
100 µL	Antibody-POD-Conjugate AK	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 WP/ well	In each well
100 µL	Substrate Solution S	In each well
Incubation: 15 Minutes in the Dark at 20-25°C		
100 µL	Stopping Solution SL	In each well
	Measure the absorbance within 30 min at 450 nm with ≥ 590 nm as reference wavelength.	

9 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 standards 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.

9.1 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 standard E should be above 1.00. Samples, which yield higher absorbance values than Standard E, should be re-tested with a higher dilution.

10 EVALUATION OF RESULTS

10.1 Establishing of the standard curve

Standard	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 standards
- 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 in ng/mL of the samples and controls **KS1** and **KS2** can be calculated by **multiplication** with the respective **dilution factor**.

10.2 Example of a typical standard 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

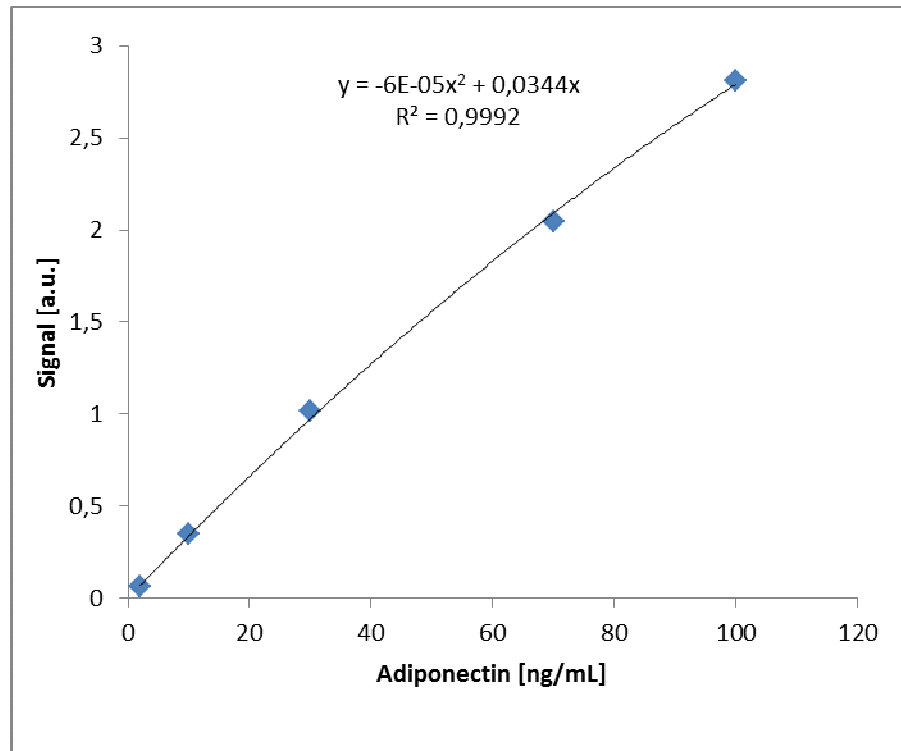


Figure 1 Exemplary standard curve

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

10.3 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 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!

10.4 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.

10.5 Limitation of procedure

The Demeditec sensitive human Adiponectin ELISA, DEE009 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.

11 REFERENCE VALUES

The expected values for serum adiponectin, which were determined with the Demeditec ELISA DEE009 in healthy donors 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. percentile 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. 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

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

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

12 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

12.1 Sensitivity

The analytical sensitivity of the ELISA DEE009 was measured by the variability of the signal of the null standard. 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).

12.2 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 Demeditec DEE009 Adiponectin ELISA are shown.

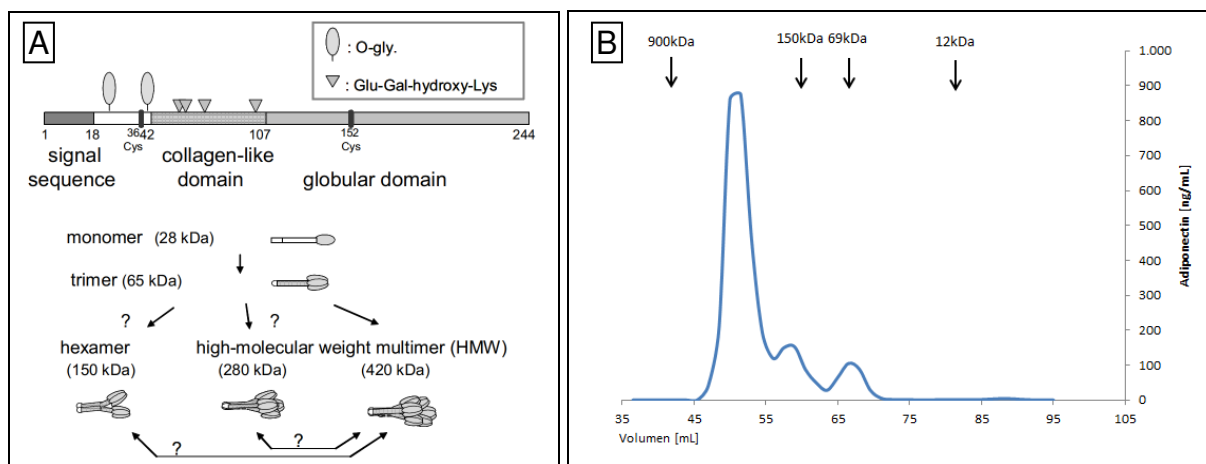


Figure 2 Adiponectin Structure (A) proteinaceous structure of human adiponectin including posttranslational modifications and multimeric forms (taken from Nakano et al¹). (B) Results of a serum separation by size-exclusion chromatography. The sample was fractionated and the adiponectin content of each fraction was measured by Demeditec DEE009 Adiponectin, for comparison the corresponding size in kDa is indicated by black arrows.

The results shown in Figure 2b clearly demonstrate that the Demeditec DEE009 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 Demeditec DEE009 Adiponectin ELISA therefore measures total Adiponectin.

12.3 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

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

12.4 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 samples were diluted in VP 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.

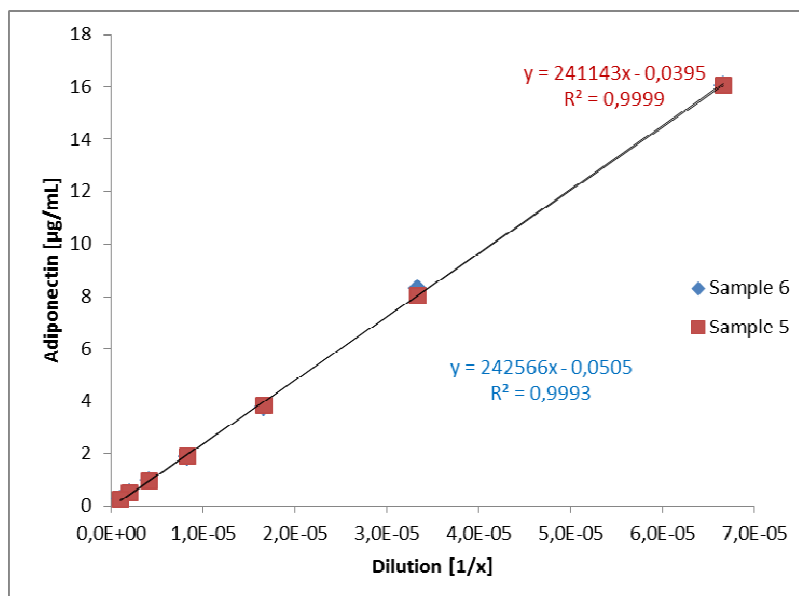


Figure 3 Linearity. Adiponectin concentration was measured in two human samples diluted 1:1500 to 1:96000.

12.5 Recovery

Trueness and traceability of the Demeditec Adiponectin ELISA DEE009 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	VP	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

12.6 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	--

13 COMPARISON STUDIES

Demeditec Adiponectin, DEE009 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 Demeditec DEE009 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.

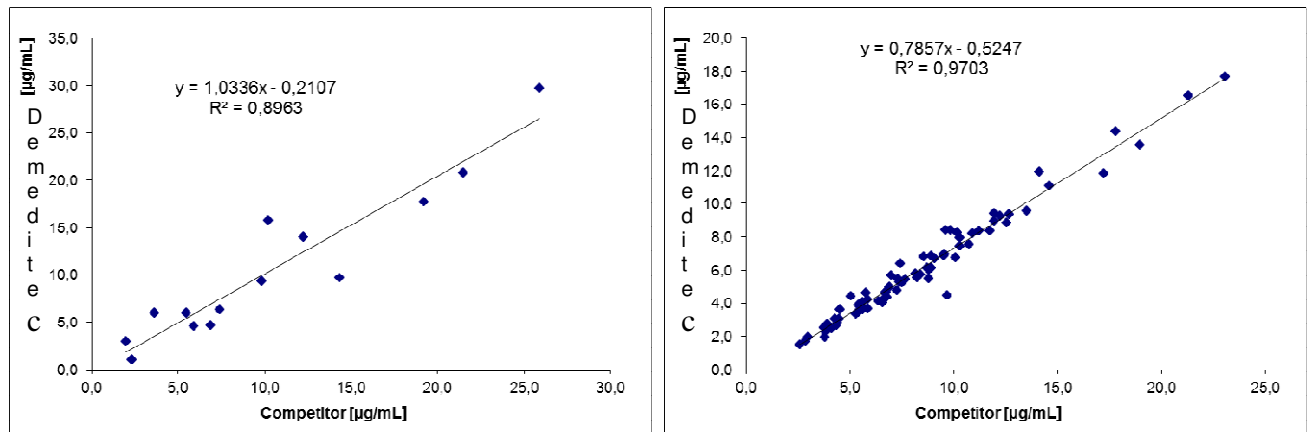


Figure 4 Comparison of Demeditec DEE009 with commercially available test systems (left) radioimmunoassay (n=14) and (right) ELISA (n=84)

Instructions for use for scientific application

14 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.

14.1 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 **VP: (1:310)**.

In the other samples, the Adiponectin levels can vary considerable, 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

14.2 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.









15 LITERATUR / REFERENCES

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.

Internationale Assay Description

A-E	CAL	Rec in 750 µL BUF VP	-
KS1	Control	Rec in 500 µL BUF VP	1:310 BUF VP
KS2	Control	Rec in 500 µL BUF VP	1:310 BUF VP
WP	WASH SOLN 20x	-	1:20 DILU A. dest.
-	SPE		1:310 BUF VP
-	°C 20-25 °C		
100 µL	BUF VP		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	CONTROL KS1 1:310 BUF VP		G1/G2
100 µL	CONTROL KS2 1:310 BUF VP		H1/H2
100 µL	SPE 1:310 BUF VP		
TAPE			
🕒 1 h °C 20-25 ↔ 350 rpm			
3x 300 µL	3x WASH SOLN WP		
100 µL	ENZ CONJ AK		
TAPE			
🕒 0.5 h °C 20-25 ↔ 350 rpm			
3x 300 µL	3x WASH SOLN WP		
100 µL	SUB TMB S		
🕒 0.25 h °C 20-25 🌟			
STOP SOLN SL			
MEASURE			

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta y advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore