

Adiponectin (total) ELISA Kit

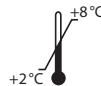
*Zur in-vitro-Bestimmung von humanem Adiponectin
in Serum und Plasma*

Adiponectin (total) ELISA Kit

*For the in vitro determination of human adiponectin
in serum and plasma*

Gültig ab / Valid from 2014-11-27

REF K 6250



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

| | |
|---|-----------|
| 1. VERWENDUNGSZWECK | 2 |
| 2. EINLEITUNG | 2 |
| 3. INHALT DER TESTPACKUNG | 3 |
| 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL | 3 |
| 5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZEN | 4 |
| 6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG | 4 |
| 7. TESTDURCHFÜHRUNG | 5 |
| <i>Testprinzip</i> | 5 |
| <i>Pipettierschema</i> | 5 |
| 8. ERGEBNISSE | 6 |
| 9. EINSCHRÄNKUNGEN | 7 |
| 10. QUALITÄTSKONTROLLE | 8 |
| <i>Referenzwerte</i> | 8 |
| 11. TESTCHARAKTERISTIKA | 8 |
| <i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i> | 8 |
| <i>Spike-Wiederfindung</i> | 9 |
| <i>Wiederfindung in der Verdünnung</i> | 9 |
| <i>Analytische Sensitivität</i> | 9 |
| 12. VORSICHTSMASSNAHMEN | 10 |
| 13. TECHNISCHE MERKMALE | 10 |
| 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST | 11 |
| 15. LITERATUR | 11 |

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) ist für die quantitative Bestimmung von humanem Adiponectin in Serum und Plasma geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Adiponectin besteht aus 244 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 30 kDa. Die Adiponectin-Konzentration im Blut beträgt 5–30 µg/ml, entsprechend ca. 0.01% der Proteine im Serum. Adiponectin besteht aus vier Domänen: Signalpeptid, einer variablen Domäne, einer Kollagen-ähnlichen N-terminalen und einer globulären C-terminalen Domäne. Adiponectin tritt in unterschiedlichen Oligomeren *in vivo* auf. Neben dem Trimer und dem Ditrimer existieren hochmolekulare Multimere. Die Synthese des Proteins erfolgt hauptsächlich durch Adipocyten, aber auch Muskel- bzw. Leberzellen können Adiponectin exprimieren. Der einzige bisher bekannte natürliche Induktor der Adiponectin-Synthese ist IGF-I. Zwei verschiedene Adiponectin-Rezeptoren sind bekannt, die ubiquitär exprimiert werden. Die Verteilung der Adiponectin-Rezeptoren in den Geweben ist jedoch unterschiedlich: Adiponectin Rezeptor 1 (AdipoR1) wird im Muskel- und AdipoR2 im Lebergewebe synthetisiert.

Die Adiponectin-Bedeutung für den menschlichen Organismus ist noch nicht völlig aufgeklärt. Studien zeigen, dass Adiponectin negativ mit dem BMI korreliert und somit an dem Energiestoffwechsel über die Regulation der Fettsäureoxidation beteiligt ist. Adiponectin beeinflusst weitere physiologische Prozesse wie Angiogenese. Es besteht auch ein Zusammenhang zwischen der Adiponectin-Konzentration und der Insulin-Resistenz und damit eine Verknüpfung zum Typ II Diabetes. Auch stellt Adiponectin eine Verbindung zwischen Glucose- und Fettstoffwechsel dar. Des Weiteren ist Adiponectin an inflammatorischen Prozessen beteiligt und von Bedeutung für die Entstehung von Arteriosklerose und Koronarenentzündungen. Blüher et al. (2007) berichten über Korrelation zwischen totalem Serum-Adiponectin und Insulinsensitivität und über die Möglichkeit zur Vorhersage von Insulinresistenz und gestörter Glukosetoleranz auf Grund der Spiegel von totalem Adiponectin in Serum. Erniedrigte Adiponectin-Konzentrationen führen zur Hemmung der Oxidation von Fettsäuren und sind assoziiert mit Insulinresistenz und metabolischem Syndrom sowie Atherosklerose.

Indikationen

- Energie-Metabolismus und Körpergewicht-Regulation
- Metabolisches Syndrom
- Typ 2 Diabetes
- Koronarerkrankungen
- Atherosklerose

3. INHALT DER TESTPACKUNG

| Art.-Nr. | Bezeichnung | Kit-Komponenten | Menge |
|----------|-------------|---|------------------------|
| K 6250 | PLATE | Mikrotitermodul, vorbeschichtet | 12 x 8 Vertiefungen |
| K 6250 | WASHBUF | ELISA-Waschpufferkonzentrat, 10x | 2 x 100 ml |
| K 6250 | SAMPLEBUF | Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig | 2 x 100 ml |
| K 6250 | STD | Standards, lyophilisiert (0; 1,4; 5,5; 22; 88 ng/ml) | 2 x 5 vials |
| K 6250 | CTRL | Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen) | 2 x 1 vial |
| K 6250 | CTRL | Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen) | 2 x 1 vial |
| K 6250 | CONJ | Konjugat, Peroxidase-markiert, gebrauchsfertig | 1 x 15 ml |
| K 6250 | SUB | TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig | 1 x 15 ml |
| K 6250 | STOP | ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig | 1 x 15 ml |

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

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

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

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** (Waschpuffer) ist bei **2–8°C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Die lyophilisierten STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrollen) sind bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Rekonstitutionsvorgaben für Standards und Kontrollen sind dem **Datenblatt** zu entnehmen.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8°C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Serum und Plasma

Vor Gebrauch die Probe **1:1000 in SAMPLEBUF** (Probenverdünnungspuffer) verdünnen. Zum Beispiel:

Verdünnung I:

25 µl Probe + 975 µl SAMPLEBUF = 1:40

Verdünnung II:

40 µl der Verdünnung I + 960 µl SAMPLEBUF = 1:25

100 µl der Verdünnung II im Test pro Vertiefung einsetzen.

Die Proben können **ein Jahr bei -20°C** gelagert werden und bis zu **drei Mal eingefroren und aufgetaut** werden.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der "Sandwich"-ELISA Technik. Es werden ein monoklonaler und ein polyklonaler Antikörper, die humanes Adiponectin erkennen, verwendet.

Teststandards, Kontrollen und verdünnte Patientenproben, die auf Adiponectin zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem hochaffinen monoklonalen anti-human Adiponectin Antikörper beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das Adiponectin aus der Probe von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Dann wird das Konjugat (Peroxidase markiert) zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper – humanes Adiponectin – Peroxidase Konjugat. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Adiponectin-Gehalt direkt proportional. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

Pipettierschema

Vor Gebrauch alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (15–30°C) bringen, gut mischen.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen, nicht verwendete können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8°C gelagert werden.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

| | |
|----|---|
| 1. | Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen 5x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. |
| 2. | 100 µl STD (Standard) SAMPLE (Probe) CTRL (Kontrollen) in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren. |
| 3. | Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30°C) unter Schütteln inkubieren. |

| | |
|-----|--|
| 4. | Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. |
| 5. | 100 µl CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren. |
| 6. | Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30°C) unter Schütteln inkubieren. |
| 7. | Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. |
| 8. | 100 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren. |
| 9. | 10–20 min.* bei Raumtemperatur (15–30°C) im Dunkeln inkubieren. |
| 10. | 100 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, mischen. |
| 11. | Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden. |

* Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden.

Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Im-mundiagnostik AG.

8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0,001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Serum- und Plasmaproben

Die ermittelte Adiponectin-Konzentration wird mit **1000** multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs müssen stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

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

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Standardkurve × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

Analytische Sensitivität × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

Über eine deutliche Abhängigkeit der Adiponectin-Serumwerte vom Alter sowie vom Geschlecht der Probanden wird berichtet; die Abhängigkeit vom jeweiligen BMI scheint dagegen wesentlich weniger signifikant zu sein.

Serum und Plasma (n= 80) = 8,79 µg/ml

Anhand einer laborinternen Studie bei Immundiagnostik mit Serum- und Plasma-proben von augenscheinlich Gesunden (n= 80) wurde ein Mittelwert von 8,79 µg/ml ermittelt.

| Firma | Adiponectin Mittelwert* [µg/mL] | | |
|------------|------------------------------------|---------------------------|----------------|
| | Normale Glukose Toleranz | Gestörte Glukose Toleranz | Typ 2 Diabetes |
| LINCO | 8.95 ± 0.55 | 3.38 ± 0.26 | 3.48 ± 0.42 |
| Mediagnost | 8.81 ± 3.43 | 3.51 ± 1.47 | 3.82 ± 2.16 |

*Werte aus Literaturstelle 1

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 30)

| Probe | Adiponectin [ng/ml] | VK [%] |
|-------|---------------------|--------|
| 1 | 5,25 | 3,2 |
| 2 | 5,92 | 3,4 |

Inter-Assay (n = 12)

| Probe | Adiponectin [ng/ml] | VK [%] |
|-------|---------------------|--------|
| 1 | 6,9 | 6,3 |
| 2 | 8,4 | 6,1 |

Spike-Wiederfindung

| Probe | Ungespikete Probe [ng/ml] | Spike [ng/ml] | Adiponectin erwartet [ng/ml] | Adiponectin gemessen [ng/ml] |
|-------|---------------------------|---------------|------------------------------|------------------------------|
| A | 3,8 | 2 | 5,8 | 6,1 |
| | 3,8 | 4 | 7,8 | 7,6 |
| | 3,8 | 6 | 9,8 | 9,2 |
| B | 2,1 | 5 | 7,1 | 8,1 |
| | 2,1 | 7 | 9,1 | 9,6 |
| | 2,1 | 9 | 11,1 | 10,8 |

Wiederfindung in der Verdünnung

| Probe | Verdünnung | Adiponectin erwartet [ng/ml] | Adiponectin gemessen [ng/ml] |
|-------|------------|------------------------------|------------------------------|
| A | 1 : 600 | 7,65 | 7,65 |
| | 1 : 1200 | 3,83 | 4,14 |
| | 1 : 2400 | 1,91 | 2,33 |
| | 1 : 4800 | 0,96 | 1,23 |
| B | 1 : 300 | 7,60 | 7,60 |
| | 1 : 600 | 3,80 | 3,87 |
| | 1 : 1200 | 1,90 | 2,11 |
| | 1 : 2400 | 0,95 | 1,17 |

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 20-mal der Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 0,338 ng/ml.

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST









- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

15. LITERATUR

1. Blüher (Blueher), M., et al. (2007) 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* 30(2): p. 280-5
2. Duntas LH, Popovic V and Panotopoulos G (2004) Adiponectin: Novelities in Metabolism and Hormonal Regulation. *Nutr Neurosci* 7:195-200
3. Fernandez-Real, J.M., et al. (2004) Adiponectin is associated with vascular function independent of insulin sensitivity. *Diabetes Care* 27(3): p. 739-45
4. Halperin F, Beckman JA, Patti ME, Trijillo ME, Garvin M, Craeger MA, Scherer PE and Goldfine AB (2005) The role of total and high-molecular-weight complex of adiponectin in vascular function in offspring whose parents both had type 2 diabetes. *Diabetologia* 48:2147-2154
5. Higashiura, K., et al. (2004) Correlations of adiponectin level with insulin resistance and atherosclerosis in Japanese male populations. *Clin Endocrinol (Oxf)* 61(6): p. 753-9
6. Koenig W, Khuseynova N, Baumert J, Meisinger C and Löwel H (2006) Serum Concentrations of Adiponectin and Risk of Type 2 Diabetes Mellitus and Coronary Heart Disease in Apparently Healthy Middle-Aged Men: Results From the 18-Year Follow-Up of a Large Cohort From Southern Germany. *JACC* 48:1369-1377

7. Lara-Castro C, Luo N, Wallace P, Klein RL and Garvey T (2006) Adiponectin Multimeric Complexes and the Metabolic Syndrome Trait Cluster. *Diabetes* 55:249-259
8. Meier U and Gressner AM (2004) Endocrine Regulation of Energy Metabolism: Review of Pathobiochemical and Clinical Aspects of Leptin, Ghrelin, Adiponectin, and Resistin. *Clin Chem* 50:1511-1525
9. Nakamura, Y., et al. (2004) Implications of plasma concentrations of adiponectin in patients with coronary artery disease. *Heart* 90(5): p. 528-33
10. Pajvani, U.B., et al. (2003) Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem* 278(11): p. 9073-85
11. Shibata, R., et al. (2004) Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 279(27): p. 28670-4

Verwendete Symbole:

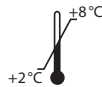
| | | | |
|---|-----------------------|---|--------------------------------------|
|  | Temperaturbegrenzung |  | Bestellnummer |
|  | In-Vitro-Diagnostikum |  | Zu verwenden mit |
|  | Hersteller |  | Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen |
|  | Chargenbezeichnung |  | Verwendbar bis |

Adiponectin (total) ELISA Kit

*For the in vitro determination of human adiponectin
in serum and plasma*

Valid from 2014-11-27

REF K 6250



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

| | |
|---|-----------|
| 1. INTENDED USE | 15 |
| 2. INTRODUCTION | 15 |
| 3. MATERIAL SUPPLIED | 16 |
| 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED | 16 |
| 5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS | 17 |
| 6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES | 17 |
| 7. ASSAY PROCEDURE | 18 |
| <i>Principle of the test</i> | 18 |
| <i>Test procedure</i> | 18 |
| 8. RESULTS | 19 |
| 9. LIMITATIONS | 20 |
| 10. QUALITY CONTROL | 20 |
| <i>Reference range</i> | 20 |
| 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS | 21 |
| <i>Precision and reproducibility</i> | 21 |
| <i>Spiking Recovery</i> | 21 |
| <i>Dilution recovery</i> | 22 |
| <i>Analytical Sensitivity</i> | 22 |
| 12. PRECAUTIONS | 22 |
| 13. TECHNICAL HINTS | 23 |
| 14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE | 23 |
| 15. REFERENCES | 24 |

1. INTENDED USE

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

2. INTRODUCTION

Adiponectin consists of 244 amino acids and has an approximate molecular weight of 30 kDa. The adiponectin concentration in blood is 5–30 µg/ml that accounts for about 0.01% of the total plasma proteins. Adiponectin has four domains: a signal peptide, a variable domain, a collagen-like N-terminal domain and a globular C-terminal domain. Adiponectin exists in different oligomer forms *in vivo*. Beside the trimer and dimer also high molecular multimers are present. Adiponectin is mainly expressed by adipocytes, but also muscle cells and hepatocytes can synthesize it. The only, until now known, natural inductor of the adiponectin synthesis is IGF-I. Two different adiponectin receptors are known. Both of them are ubiquitarily expressed, though their distribution in the tissues varies: Adiponectin Receptor 1 (AdipoR1) is synthesized in muscle and AdipoR2 in liver tissue. The adiponectin significance for the human organism is not completely clear until now. Studies show, that adiponectin correlates negatively with BMI and could participate at the energy metabolism through the regulation of fatty acid oxidation. Adiponectin influences further physiological processes like angiogenesis. It is also associated with glucose and lipid metabolism. Adiponectin levels are associated with insulin resistance and accordingly linked with Type II Diabetes. Furthermore, it is involved in inflammatory processes and therewith of importance for development of arteriosclerosis and coronary artery diseases. Blüher et al. (2007) showed a correlation of total serum adiponectin to insulin sensitivity and the ability of total serum adiponectin levels to predict insulin resistance and impaired glucose tolerance. Low adiponectin concentrations result in inhibition of fatty acid oxidation and are associated with insulin resistance and metabolic syndrome as well as arteriosclerosis.

Indications

- Energy metabolism and body weight regulation
- Metabolic syndrome
- Type 2 diabetes
- Coronary artery disease
- Atherosclerosis

3. MATERIAL SUPPLIED

| Cat. No. | Label | Kit components | Quantity |
|----------|-----------|--|--------------|
| K 6250 | PLATE | Precoated microtiter plate | 12 x 8 wells |
| K 6250 | WASHBUF | ELISA wash buffer concentrate 10x | 2 x 100 ml |
| K 6250 | SAMPLEBUF | Sample dilution buffer | 2 x 100 ml |
| K 6250 | STD | Adiponectin standards, lyophilized (0; 1.4; 5.5; 22; 88 ng/ml) | 2 x 5 vials |
| K 6250 | CTRL | Control, lyophilized (see specification for range) | 2 x 1 vial |
| K 6250 | CTRL | Control, lyophilized (see specification for range) | 2 x 1 vial |
| K 6250 | CONJ | Conjugate, ready to use | 15 ml |
| K 6250 | SUB | TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use | 15 ml |
| K 6250 | STOP | ELISA stop solution, ready to use | 15 ml |

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as purchase order number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 g
- Vortex
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

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

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted **1:10 in ultra pure water** before use (100 ml concentrate + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or 37°C before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Diluted buffer solution** (wash buffer) can be stored in a closed flask at **2–8°C for one month**.
- The **lyophilized STD (standards) and CTRL (controls)** are stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. Reconstitution details are given in the **data sheet**.
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8°C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Serum and Plasma

Samples are diluted **1:1000 in SAMPLEBUF** (sample dilution buffer) before use. E. g.:

Dilution I:

25 µl sample + 975 µl SAMPLEBUF = 1:40

Dilution II:

40 µl of dilution I + 960 µl SAMPLEBUF = 1:25

For analysis, pipette 100 µl of dilution II per well.

Samples can be stored for **one year at -20°C** and up to **three times frozen and thawed**.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

The assay utilizes the two-site “sandwich” technique with one monoclonal and one polyclonal antibody that bind to human Adiponectin.

Standards, controls and diluted patient samples which are assayed for human Adiponectin are added to wells of microplate coated with a high affine monoclonal anti-human Adiponectin antibody. During the first incubation step, Adiponectin in the samples is bound by the immobilized antibody. Then a peroxidase labeled conjugate is added to each well and the following complex is formed: capture antibody - human Adiponectin – Peroxidase conjugate. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as a substrate for peroxidase. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The color changes from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the Adiponectin concentration of sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from standard. Adiponectin present in the patient samples, is determined directly from this curve.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15–30°C) and mix well.

Take as many microtiter strips as needed from kit. Store unused strips covered at 2–8°C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

| | |
|----|---|
| 1. | Wash each well 5 x by dispensing 250 µl of diluted WASHBUF (washbuffer) into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper. |
| 2. | Add 100 µl of STD (standard) SAMPLE (sample) CTRL (controls) into respective well. |
| 3. | Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (15–30°C) on a horizontal shaker. |
| 4. | Discard the contents of each well. Wash each well 5 x by dispensing 250 µl of diluted WASHBUF (washbuffer) into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper. |
| 5. | Add 100 µl CONJ (conjugate) into each well. |

| | |
|-----|---|
| 6. | Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker. |
| 7. | Discard the contents of each well. Wash each well 5 x by dispensing 250 µl of diluted WASHBUF (washbuffer) into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper. |
| 8. | Add 100 µl of SUB (substrate) into each well. |
| 9. | Incubate for 10–20 min.* at room temperature (15–30 °C) in the dark. |
| 10. | Add 100 µl of STOP (stop solution) into each well, mix. |
| 11. | Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference. |

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

For automated ELISA processors the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform.

For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the "4 parameter algorithm".

1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero standard must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

2. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

Serum and plasma samples

To obtain the final Adiponectin concentration of the samples, multiply the estimated value by the dilution factor of **1000**.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result with the dilution factor used.

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range must be further diluted and re-assayed. Please consider this greater dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range cannot be clearly quantified.

The upper limit of the measurement range can be calculated as:

highest concentration of the standard curve × sample dilution factor to be used

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

Analytical sensitivity × sample dilution factor to be used

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

Reference range

A significant correlation between adiponectin serum values and age as well as gender of the probands is reported, in turn the correlation between the respective BMI seems to be less significant.

Serum and Plasma (n = 80): 8.79 µg/ml

Based on Immundiagnostik studies of apparently healthy individuals (n= 80) a mean value of 8.79 µg/ml stool was determined.

| Company | Adiponectin mean value* [µg/mL] | | |
|------------|------------------------------------|----------------------------|-----------------|
| | Normal glucose tolerance | Impaired glucose tolerance | Type 2 diabetes |
| LINCO | 8.95 ± 0.55 | 3.38 ± 0.26 | 3.48 ± 0.42 |
| Mediagnost | 8.81 ± 3.43 | 3.51 ± 1.47 | 3.82 ± 2.16 |

*Values from Reference 1.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 30)

| Sample | Adiponectin [ng/ml] | VK [%] |
|--------|---------------------|--------|
| 1 | 5.25 | 3.2 |
| 2 | 5.92 | 3.4 |

Inter-Assay (n = 12)

| Sample | Adiponectin [ng/ml] | VK [%] |
|--------|---------------------|--------|
| 1 | 6.9 | 6.3 |
| 2 | 8.4 | 6.1 |

Spiking Recovery

| Sample | Unspiked sample [ng/ml] | Spike [ng/ml] | Adiponectin expected [ng/ml] | Adiponectin measured [ng/ml] |
|--------|-------------------------|---------------|------------------------------|------------------------------|
| A | 3.8 | 2 | 5.8 | 6.1 |
| | 3.8 | 4 | 7.8 | 7.6 |
| | 3.8 | 6 | 9.8 | 9.2 |

| Sample | Unspiked sample [ng/ml] | Spike [ng/ml] | Adiponectin expected [ng/ml] | Adiponectin measured [ng/ml] |
|--------|-------------------------|---------------|------------------------------|------------------------------|
| B | 2.1 | 5 | 7.1 | 8.1 |
| | 2.1 | 7 | 9.1 | 9.6 |
| | 2.1 | 9 | 11.1 | 10.8 |

Dilution recovery

| Sample | Dilution | Adiponectin expected [ng/ml] | Adiponectin measured [ng/ml] |
|--------|----------|------------------------------|------------------------------|
| A | 1 : 600 | 7.65 | 7.65 |
| | 1 : 1200 | 3.83 | 4.14 |
| | 1 : 2400 | 1.91 | 2.33 |
| | 1 : 4800 | 0.96 | 1.23 |
| B | 1 : 300 | 7.60 | 7.60 |
| | 1 : 600 | 3.80 | 3.87 |
| | 1 : 1200 | 1.90 | 2.11 |
| | 1 : 2400 | 0.95 | 1.17 |

Analytical Sensitivity

The Zero-standard was measured 20 times. The detection limit was set as $B_0 + 2 \text{ SD}$ and estimated to be 0.338 ng/ml.

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.

- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analyzed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Blüher (Blueher), M., et al. (2007) 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* 30(2): p. 280-5
2. Duntas LH, Popovic V and Panotopoulos G (2004) Adiponectin: Novelties in Metabolism and Hormonal Regulation. *Nutr Neurosci* 7:195-200
3. Fernandez-Real, J.M., et al. (2004) Adiponectin is associated with vascular function independent of insulin sensitivity. *Diabetes Care* 27(3): p. 739-45
4. Halperin F, Beckman JA, Patti ME, Trijillo ME, Garvin M, Craeger MA, Scherer PE and Goldfine AB (2005) The role of total and high-molecular-weight complex of adiponectin in vascular function in offspring whose parents both had type 2 diabetes. *Diabetologia* 48:2147-2154
5. Higashiura, K., et al. (2004) Correlations of adiponectin level with insulin resistance and atherosclerosis in Japanese male populations. *Clin Endocrinol (Oxf)* 61(6): p. 753-9
6. Koenig W, Khuseynova N, Baumert J, Meisinger C and Löwel H (2006) Serum Concentrations of Adiponectin and Risk of Type 2 Diabetes Mellitus and Coronary Heart Disease in Apparently Healthy Middle-Aged Men: Results From the 18-Year Follow-Up of a Large Cohort From Southern Germany. *JACC* 48:1369-1377
7. Lara-Castro C, Luo N, Wallace P, Klein RL and Garvey T (2006) Adiponectin Multimeric Complexes and the Metabolic Syndrome Trait Cluster. *Diabetes* 55:249-259
8. Meier U and Gressner AM (2004) Endocrine Regulation of Energy Metabolism: Review of Pathobiochemical and Clinical Aspects of Leptin, Ghrelin, Adiponectin, and Resistin. *Clin Chem* 50:1511-1525
9. Nakamura, Y., et al. (2004) Implications of plasma concentrations of adiponectin in patients with coronary artery disease. *Heart* 90(5): p. 528-33
10. Pajvani, U.B., et al. (2003) Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem* 278(11): p. 9073-85
11. Shibata, R., et al. (2004) Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 279(27): p. 28670-4

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



To be used with



Manufacturer



Contains sufficient for <n> tests



Lot number



Use by