

Product information

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



Adiponectin human ELISA



DEE009



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

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..... | 6 |
| 8 | TESTDURCHFÜHRUNG..... | 8 |
| 9 | QUALITÄTSKONTROLLE | 9 |
| 10 | AUSWERTUNG..... | 9 |
| 11 | REFERENZWERTE..... | 10 |
| 12 | ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG..... | 12 |
| 13 | VERGLEICHSTUDIEN | 15 |
| 14 | WISSENSCHAFTLICHE ANWENDUNGEN | 15 |
| | | |
| 1 | INTENDED USE | 16 |
| 2 | INTRODUCTION | 16 |
| 3 | ASSAY PRINCIPLE..... | 16 |
| 4 | WARNINGS AND PRECAUTIONS | 17 |
| 5 | SAMPLES..... | 18 |
| 6 | MATERIALS..... | 19 |
| 7 | TECHNICAL NOTES | 19 |
| 8 | ASSAY PROCEDURE..... | 21 |
| 9 | QUALITY CONTROL..... | 22 |
| 10 | EVALUATION OF RESULTS | 22 |
| 11 | REFERENCE VALUES | 23 |
| 12 | PERFORMANCE CHARACTERISTICS..... | 26 |
| 13 | COMPARISON STUDIES..... | 29 |
| 14 | SCIENTIFIC APPLICATION..... | 29 |
| 15 | LITERATUR / REFERENCES | 30 |
| | | |
| | SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS | 32 |

| Adiponektin human ELISA DEE009 | 96 Bestimmungen |
|---------------------------------------|---|
| Testprinzip | Enzyme-linked Immunoassay |
| Dauer (Inkubationszeit) | 1,75 h |
| Antikörper | Monoklonale Antikörper |
| Puffer | Gebrauchsfertig und 20-fach Konzentrat |
| Kalibratoren | 5 Einzelkalibratoren: 2 - 100 µg/L, natives humanes Adiponektin |
| Assay-Bereich | 0,27 – 31000 µg/L |
| Kontrolle | 2 Kontrollen, gefriergetrocknet |
| Proben | humanes Serum / Plasma |
| Erforderliches Probenvolumen | 10 µL |
| Probenverdünnung | 1:310 |
| Analytische Sensitivität | $\sigma \leq 0,27 \mu\text{g/L}$ |
| Intra- / Interassay Varianz | $\sigma < 10\%$ |

1 ZWECKBESTIMMUNG

Quantitative Messung von humanem Adiponektin in menschlichem Serum oder Plasma.

2 EINFÜHRUNG

Adiponektin ist ein 30 kDa Protein, das in hoher Konzentration im Serum vorliegt (0,01%). Die Synthese des Proteins erfolgt hauptsächlich durch Adipocyten, aber auch Muskelzellen und Leberzellen sind in der Lage Adiponektin zu synthetisieren. Es besteht aus einer Kollagen-ähnlichen N-terminalen und einer globulären C-terminalen Domäne [1]. In vivo tritt Adiponektin in unterschiedlichen Oligomeren auf. Neben dem Trimer und dem Dimer 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 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 Koronarentzündungen [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 Diagnostics GmbH kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht, soweit keine gesetzliche Regelung anderes besagt. Ein Sicherheitsdatenblatt ist auf Anforderung verfügbar.

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

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

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

Menschliches Serum:

in folgenden Komponenten enthalten: **Kontrollen CONTROL 1 LYO und CONTROL 2 LYO**

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 CAL A – E LYO, ENZ CONJ, DIL, WASH SOLN 20x

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

Substrat SUB TMB

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+ P338 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

Stopplösung STOP SOLN

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/ Schutzbekleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
- P301+P330+ P331 BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbeiführen.
- P305+P351+ P338 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. 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 Adiponektinwerten 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 **5mg/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 **DIL**
- Beispiel: **10 µL** Probe werden zu **300 µL** Verdünnungspuffer **DIL** in PE-/PP-Gefäß gegeben (Verdünnung 1:31). In ein weiteres PE-/PP-Gefäß **900 µL** Verdünnungspuffer **DIL** vorlegen und **100 µL** von der gutdurchmischten ersten Verdünnung geben (Verdünnung 1:10). Nach dem Mischen werden von dieser Lösung mit einer Endverdünnung von 1:310 **2×100 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 Kalibrationskurve.

| | | |
|--|---|--------------------------------|
| SORB MT | Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, beschichtet mit Maus-anti-Adiponektin-Antikörper. Die Vertiefungen sind einzeln abbrechbar. | (8x12) Vertiefungen |
| CAL A - E LYO | Kalibratoren , lyophilisiert (natives humanes Adiponektin), die Konzentrationen sind auf dem Qualitätszertifikat in ng/mL angegeben. | 5 x 750 µL |
| CONTROL 1 LYO | Kontrolle 1 , lyophilisiert, (humanes Serum), die Konzentration ist auf dem Qualitätszertifikat in ng/mL angegeben. | 1 x 500 µL |
| CONTROL 2 LYO | Kontrolle 2 , lyophilisiert, (humanes Serum), die Konzentration ist auf dem Qualitätszertifikat in ng/mL angegeben. | 1 x 500 µL |
| ENZ CONJ | Antikörper-POD-konjugat , gebrauchsfertig, Maus-anti-hAdiponektin-Antikörper biotinyliert + Streptavidin Peroxidase-Konjugat | 1 x 12 mL |
| DIL | Verdünnungspuffer , gebrauchsfertig | 1 x 125 mL |
| WASH SOLN 20x | Waschpuffer WB , 20fach konzentrierte Lösung | 1 x 50 mL |
| SUB TMB | Substrat , gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase (POD)-Substrat, stabilisiertes Tetramethylbenzidin. | 1 x 12 mL |
| STOP SOLN | Stopplösung , 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** (Kalibratoren **CAL** **A** - **E** **LYO** und Kontrollen **CONTROL** **1** **LYO** und **CONTROL** **2** **LYO**) 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 **WASH** **SOLN** **20x** ist nur 4 Wochen haltbar.

Vorbereitung der Reagenzien

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

Rekonstitution

Die Kalibratoren **CAL A – E LYO** und Kontrollen **CONTROL 1 LYO** und **CONTROL 2 LYO** werden mit dem im Kit enthaltenen Probenpuffer **DIL** rekonstituiert. Es empfiehlt sich zum Rekonstituieren die Reagenzien 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen zu lassen und sie anschließend kräftig mit einem Vortex-Mixer zu mischen. Schaumbildung sollte jedoch vermieden werden.

Verdünnung

Nach der Rekonstitution werden die Kontrollen **CONTROL 1 LYO** und **CONTROL 2 LYO** im gleichen Verhältnis (1:310) wie die Proben mit dem Verdünnungspuffer **DIL** verdünnt.

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

Inkubation

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

Testdurchführung

Die Messungen (Leerwert, Kalibratoren **CAL A – E LYO**, Kontrollen **CONTROL 1 LYO** und **CONTROL 2 LYO** und Proben) sollten stets in Doppelbestimmung durchgeführt werden. Um optimale Ergebnisse zu erhalten, ist auf genaues Pipettieren und strikte Befolgung des Testprotokolls zu achten. Bei der Testdurchführung sollten Kalibratoren **CAL A – E LYO**, Kontrollen **CONTROL 1 LYO**, **CONTROL 2 LYO** und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden z.B. in 15 Minuten). Das Antikörper-POD-Konjugat **ENZ CONJ** sowie nachfolgend das Substrat **SUB TMB** und die Stopplösung **STOP SOLN** sollten in der gleichen Reihenfolge und in dem gleichen Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

Schütteln

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

Waschen

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

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

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

8 TESTDURCHFÜHRUNG**Vorbereitung der Reagenzien**

| Reagenzpräparation: | | Rekonstitution: | Verdünnung: |
|--|--|--|-----------------------------------|
| CAL A - E LYO | Kalibratoren | in 750 µL Verdünnungspuffer DIL | - |
| CONTROL 1 LYO & CONTROL 2 LYO | Kontrollen | in 500 µL Verdünnungspuffer DIL | 1:310 mit DIL |
| WASH SOLN 20x | Waschpuffer | - | 1:20 mit Aqua dest. |
| Proben mit Verdünnungspuffer DIL 1:310 verdünnen. | | | |
| Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen. | | | |
| Testdurchführung in Doppelbestimmung: | | | |
| Pipettieren | Reagenzien | Position | |
| 100 µL | Verdünnungspuffer DIL (Leerwert) | A1/A2 | |
| 100 µL | Kalibrator A (2 ng/mL) | B1/B2 | |
| 100 µL | Kalibrator B (10 ng/mL) | C1/C2 | |
| 100 µL | Kalibrator C (30 ng/mL) | D1/D2 | |
| 100 µL | Kalibrator D (70 ng/mL) | E1/E2 | |
| 100 µL | Kalibrator E (100 ng/mL) | F1/F2 | |
| 100 µL | Kontrolle CONTROL 1 LYO (1:310 verdünnt) | G1/G2 | |
| 100 µL | Kontrolle CONTROL 2 LYO (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 (verdünnt)/ Vertiefung waschen. | In jede Vertiefung | |
| 100 µL | Antikörper-POD-Konjugat ENZ CONJ | 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 (verdünnt)/ Vertiefung waschen. | In jede Vertiefung | |
| 100 µL | Substrat SUB TMB | In jede Vertiefung | |
| Substrat S Inkubation: 15 Minuten im Dunklen bei 20-25°C | | | |
| 100 µL | Stopplösung STOP SOLN | In jede Vertiefung | |
| Messung der Absorption innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm). | | | |

9 QUALITÄTSKONTROLLE

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

9.1 Qualitätskriterien

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

10 AUSWERTUNG

10.1 Erstellung der Kalibrationskurve

Die bereitgestellten Kalibratoren enthalten folgende Adiponektinkonzentrationen:

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

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

10.2 Beispiel einer typischen Kalibrationskurve

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

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

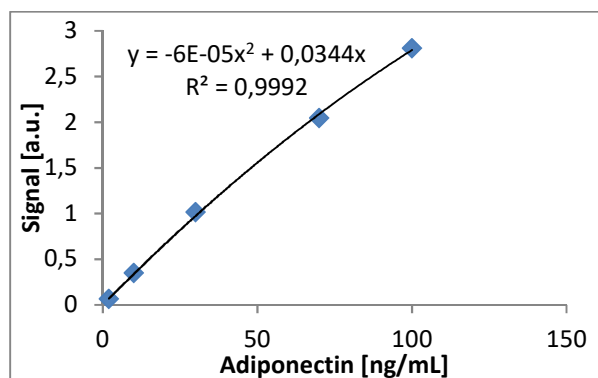


Abbildung 1 Exemplarische Kalibrationskurve

10.3 Beispielhafte Berechnung der Adiponektin-Konzentration

Probenverdünnung: 1:310

Gemessene Extinktion der Probe: 0,408

Gemessene Extinktion des Leerwertes: 0,008

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

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

und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (**1:310**) somit eine Adiponektin-Konzentration 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 Adiponektin 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 Adiponektin-Serumwerte vom Alter sowie vom Geschlecht der Probanden, die Abhängigkeit vom jeweiligen BMI fällt dagegen wesentlich weniger signifikant aus. Bei Neugeborenen werden sehr hohe Werte gefunden. Nachfolgend sind verschiedene Gruppierungen der Daten statistisch analysiert worden, je nach Fragestellung können die am besten geeigneten Bereiche verwendet werden (Tab.1).

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

| Geschlecht | n | Mittelwert [$\mu\text{g/ml}$] | Median [$\mu\text{g/ml}$] | Standard- abweichung | 5. Perzentile [$\mu\text{g/ml}$] | 95. Perzentile [$\mu\text{g/ml}$] |
|---------------|-----|------------------------------------|--------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|---|
| Frauen | 101 | 10,2 | 9,1 | 4,6 | 4,0 | 19,4 |
| Männer | 125 | 6,8 | 6,1 | 4,1 | 2,0 | 13,9 |
| Gesamt | 226 | 8,3 | 7,5 | 4,6 | 2,4 | 19,3 |

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

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

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

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

Tabelle 1d

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

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

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

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

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 Größenausschluss-Chromatographie von human Serum, bestimmt mit dem Demeditec DEE009 Adiponectin ELISA, angezeigt.

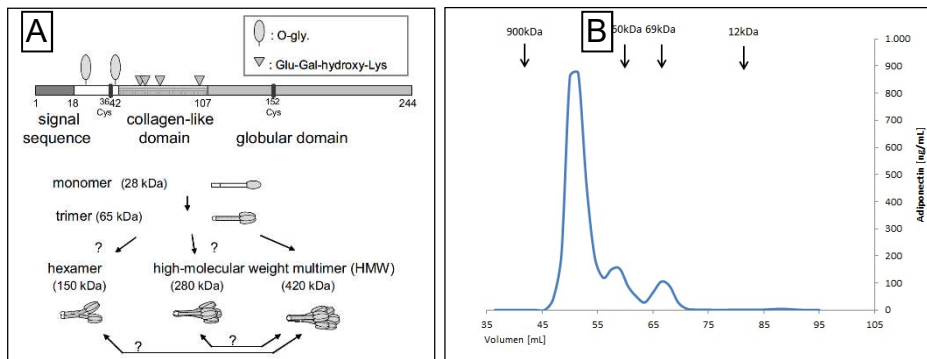


Abbildung 2 Adiponectin Struktur (A) proteinartigen Struktur des menschlichen Adiponectin einschließlich posttranslationaler Modifikationen und multimeren Formen (von Nakano et al). (B) Ergebnisse einer Serumentrennung mittels Größenausschluss-Chromatographie. Die Probe wurde fraktioniert und der Adiponectingehalt jeder Fraktion wurde durch Demeditec DEE009 gemessen. Zum Vergleich werden die entsprechenden Größen in kDa durch die schwarzen Pfeile angedeutet. Die Ergebnisse in 2b zeigen, dass Demeditec DEE009 Adiponectin ELISA alle Formen von im menschlichen Serum vorhandenen Adiponectin erfasst: das Trimer bei 65 kDa, das Hexamer in 150 kDa und die Formen mit hohem Molekulargewicht von > 280 kDa. Demeditec DEE009 Adiponectin ELISA misst daher total Adiponectin.

12.3 Präzision

Intra-Assay Varianz

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

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

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

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

Inter-Assay-Varianz und Genauigkeit

Serumproben wurden in unabhängigen Tests gemessen. Im Durchschnitt betrug der Variationskoeffizient 7,5% (SD 1,6). Die Ergebnisse von 5 verschiedenen Proben, deren Adiponectingehalt 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 Adiponectingehalt aller Verdünnungen.

Tabelle 4 Linearität. Serumproben wurden mit Verdünnungspuffer **DIL** verdünnt und der Adiponectingehalt wurde zurückberechnet.

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

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

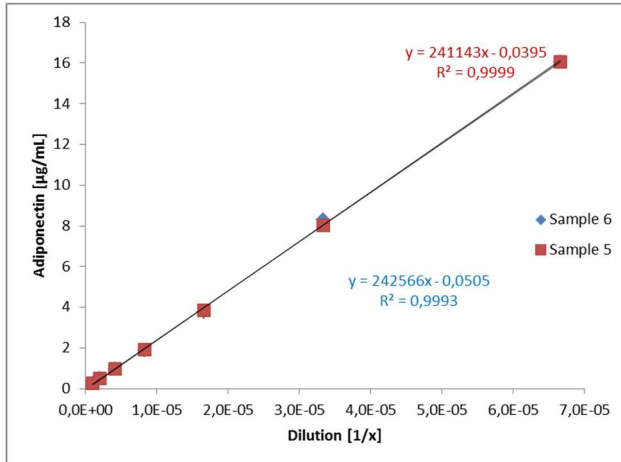


Abbildung 3 Linearität. Zur Bestimmung der Linearität wurden zwei Serumproben in einem Bereich von 1:1500 bis 1:96000 verdünnt und die Adiponektinkonzentration in den jeweiligen Verdünnungen gemessen.

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

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

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 Lösungsmittels ohne jede Substanz auch zu Serum zugegeben. Die Messwerte in Tabelle 6 zeigen, dass weder Bilirubin noch Triglyzeride oder Hämoglobin einen Einfluss auf die Messung von Adiponektin in humanem Serum haben.

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

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

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.

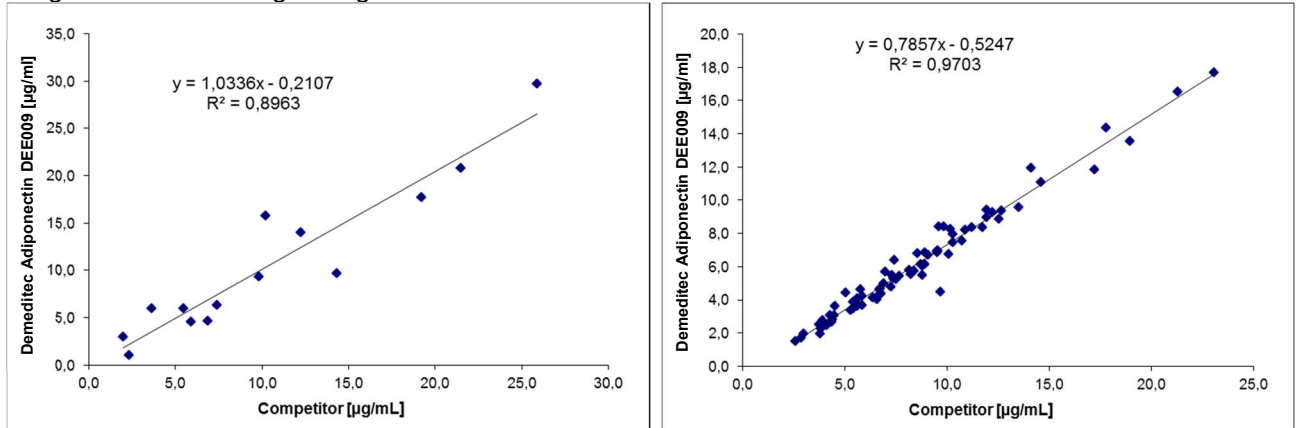


Abbildung 4 Assay Vergleich mit kommerziell verfügbaren Testsystemen (links) Radioimmunoassay (n=14) und (rechts) ELISA (n=76).

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 **DIL** 1:310.

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

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

| Matrix Verdünnung | Urin | Speichel | Muttermilch | Zellkulturmedium m 10% FCS | Zellkultur- 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 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.

| Adiponectin human 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 |
| Calibrator | 5 single calibrators: 2 - 100µg/L, native human Adiponectin |
| Assay Range | 0.27 - 31000µg/L |
| Control | 2 controls freeze-dried |
| Sample | human serum / plasma |
| Required sample volume | 10 µL |
| Sample dilution | 1:310 |
| Analytical sensitivity | $\emptyset \leq 0.27 \mu\text{g/L}$ |
| Intra- / Interassay Variance | $\emptyset < 10 \%$ |

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: **Controls** **CONTROL 1 LYO** and **CONTROL 2 LYO**, and **Calibrators** **CAL A – E LYO**.

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

Reagents **CAL A – E LYO**, **ENZ CONJ**, **DIL**, **WASH SOLN 20x**

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 **SUB TMB**

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. |

Stop Solution **STOP SOLN**

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

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

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 **DIL**
- Dilute for example **300 µL** Dilution Buffer **DIL** in PE-/PP-Tubes (application of a multi-stepper is recommended in larger series), add **10 µL** Serum- or Plasma (dilution: 1:31). Add **900 µL** Dilution Buffer **DIL** in another PE-/PP-tube and **100 µL** of the thoroughly mixed first dilution. After mixing, use 2×100 µL from this **1:310** diluted sample in the assay.
- 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 calibration curve.

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

6.2 Materials required, but not provided

- Distilled (Aqua destillata) or deionized water for dilution of the Washing Buffer **WASH** **SOLN** **20x** (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** calibrators **CAL** **A - E** **LYO** and Controls **CONTROL** **1** **LYO** and **CONTROL** **2** **LYO** 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 **WASH** **SOLN** **20x** is 4 weeks stable at 2-8°C.

Preparation of reagents

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

Reconstitution

The Calibrators **A – E** and Controls **CONTROL 1 LYO** and **CONTROL 2 LYO** are reconstituted with the Dilution Buffer **DIL**. It is recommended to keep reconstituted reagents at room temperature for 15 minutes and then to mix them thoroughly but gently (no foam should result) with a Vortex mixer.

Dilution

After reconstitution dilute the Controls **CONTROL 1 LYO** and **CONTROL 2 LYO** with the Dilution Buffer **DIL** in the same ratio (1:310) as the sample. The required volume of Washing Buffer **WASH SOLN 20x** is prepared by 1:20 dilution of the provided 20fold concentrate with Aqua dest.

Assay Procedure

When performing the assay, Blank, Calibrators **CAL A – E LYO**, Controls **CONTROL 1 LYO**, **CONTROL 2 LYO** 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 **ENZ CONJ** as well as the succeeding Substrate **SUB TMB** should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples. Stop Solution **STOP SOLN** should be added to the plate in the same order as Substrate **SUB TMB**. All determinations (Blank, Calibrators **CAL A – E LYO**, Controls **CONTROL 1 LYO**, **CONTROL 2 LYO** 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 **SUB TMB**, 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 **WASH SOLN 20x** 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 multistep 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 |
|--|--|---|-----------------------------|
| CAL A - E LYO | Calibrators | in 750 µL Dilution Buffer DIL | - |
| CONTROL 1 LYO & CONTROL 2 LYO | Control 1 Control 2 | in 500 µL Dilution Buffer DIL | 1:310 with DIL |
| WASH SOLN 20x | Washing Buffer | - | 1:20 with Aqua dest. |
| Sample dilution: with Dilution Buffer DIL 1:310 | | | |
| Before assay procedure bring all reagents to room temperature 20-25°C . | | | |
| Assay Procedure in Double Determination: | | | |
| Pipette | Reagents | Position | |
| 100 µL | Dilution Buffer DIL (Blank) | A1/A2 | |
| 100 µL | Calibrator A (2 ng/mL) | B1/B2 | |
| 100 µL | Calibrator B (10 ng/mL) | C1/C2 | |
| 100 µL | Calibrator C (30 ng/mL) | D1/D2 | |
| 100 µL | Calibrator D (70 ng/mL) | E1/E2 | |
| 100 µL | Calibrator E (100 ng/mL) | F1/F2 | |
| 100 µL | Control CONTROL 1 LYO (1:310 diluted) | G1/G2 | |
| 100 µL | Control CONTROL 2 LYO (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 (diluted) / well | In each well | |
| 100 µL | Antibody-HRP-Conjugate ENZ CONJ | 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 (diluted) / well | In each well | |
| 100 µL | Substrate SUB TMB | In each well | |
| Incubation: 15 Minutes in the Dark at 20-25°C | | | |
| 100 µL | Stop Solution STOP SOLN | 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 calibrators and kit controls must be found within the acceptable ranges as stated on the QC Certificate. If the criteria are not met, the run is not valid and should be repeated. Each laboratory should use known samples as further controls.

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

10 EVALUATION OF RESULTS

10.1 Establishing of the calibration curve

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

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

10.2 Example of a typical calibration curve

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

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

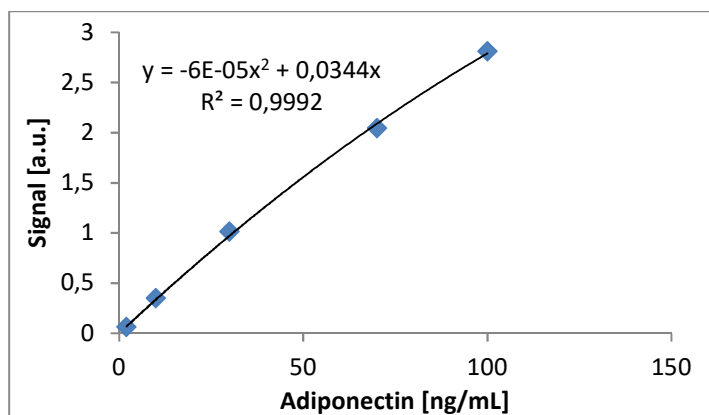


Figure 1 Exemplary calibration curve

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

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 program 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:

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

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

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

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

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 and analysed by Prof. Dr. J. Kratzsch, Department of Laboratory Medicine, University Hospital Leipzig, are given below (Tab. 1).

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

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

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

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

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

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

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

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

| Female | | | Adiponectin ($\mu\text{g/ml}$): | | | |
|---------------------------|----|---------------------|-------------------------------------|---------|-------------------------|--------------|
| 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 blank. Based on the twofold standard deviation of the blank the mean analytical sensitivity is < 0.27 ng/mL (Range 0.094 to 0.59 ng/mL).

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.

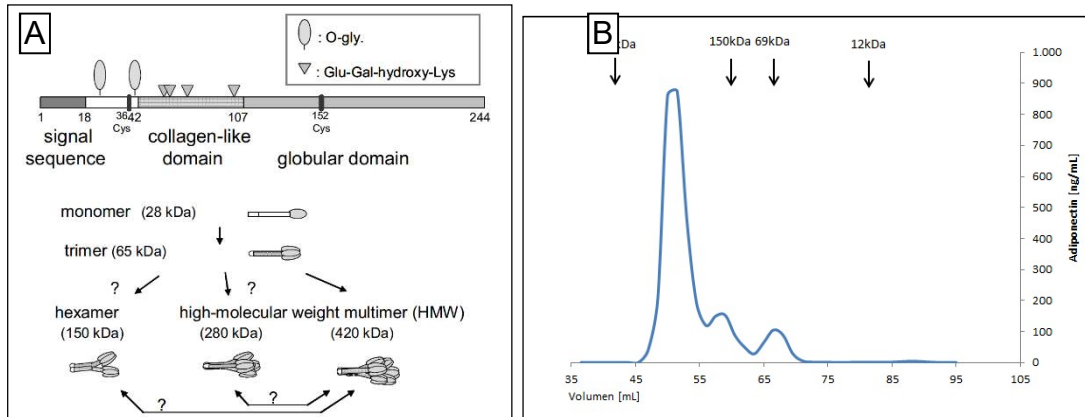


Figure 2 Adiponectin Structure (A) proteinaceous structure of human adiponectin including posttranslational modifications and multimeric forms (taken from Nakano et al¹). (B) Results of a serum separation by size-exclusion chromatography. The sample was fractionated and the adiponectin content of each fraction was measured by Demeditec DEE009 Adiponectin, for comparison the corresponding seize 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 sample were diluted in **DIL** and adiponectin content was recalculated. Measurements results are shown in [mg/L]. No deviation of the mean >30% was detected.

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

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

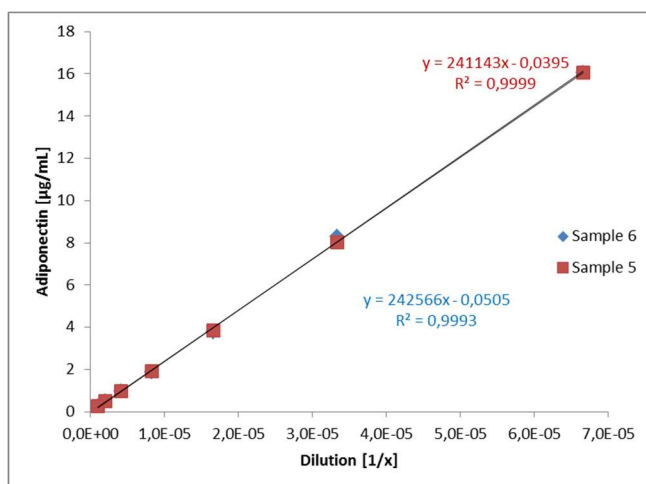


Figure 3 Linearity. Adiponectin concentration was measured in two human samples diluted 1:1500 to 1:96000.

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 | DIL | Serum | Recovery |
|---|-------|---------|------------|
| ng/mL | ng/mL | ng/mL | % |
| 0 | 0 | 0.00778 | --- |
| 75 | 87.92 | 95.71 | 109 |
| 37.5 | 51.84 | 59.98 | 116 |
| 18.75 | 26.55 | 26.7 | 101 |
| 9.375 | 13.35 | 15.15 | 113 |

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.

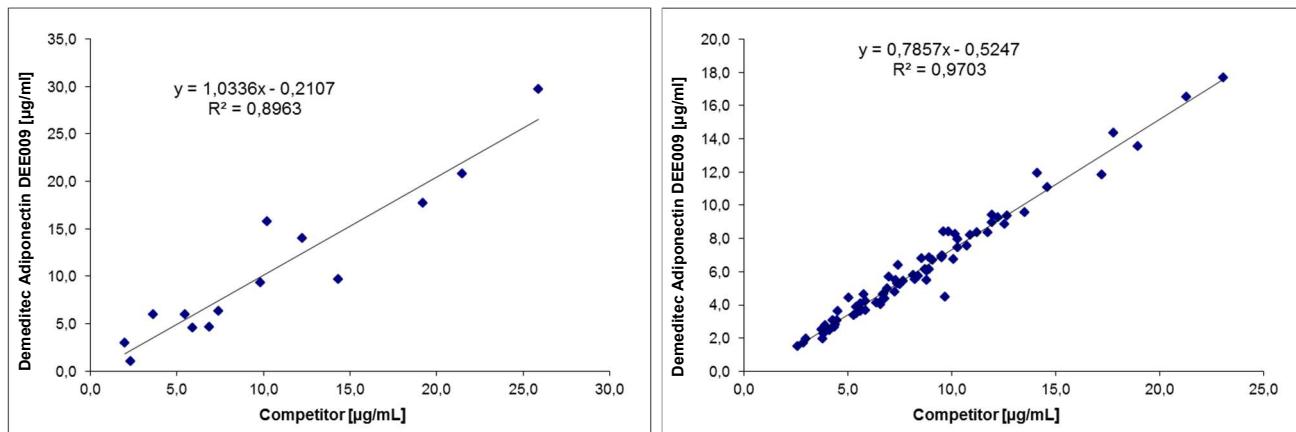


Figure 4 Comparison of Demeditec DEE009 with commercially available test systems (left) radioimmunoassay (n=14) and (right) ELISA (n=84)

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 **DIL** (1:310).

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

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

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

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.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

| Symbol | English | Deutsch | Française | 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 | utilisation 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 catalogo |
|  | 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 advertencias y precauciones | Annoti avvisi e le precauzioni |
|  | Storage Temperature | Lagerungstemperatur | Température 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> | Distributed by | Vertrieb durch | Distribution par | Distribución por | Distribuzione da parte di |
|  | Version | Version | Version | Versión | Versione |
|  | Single-use | Einmalverwendung | À usage unique | Uso único | Uso una volta |