



Instructions for Use

Adiponectin (Human) ELISA



REF EIA-4574



96



DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:



DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida dell'inserito del pacco a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis

1	INTENDED USE.....	2
2	STORAGE, EXPIRATION	2
3	INTRODUCTION.....	2
4	TEST PRINCIPLE	3
5	PRECAUTIONS	3
6	TECHNICAL HINTS	3
7	REAGENT SUPPLIED	4
8	MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	4
9	PREPARATION OF REAGENTS	4
10	PREPARATION OF SAMPLES	5
11	ASSAY PROCEDURE	6
12	CALCULATIONS.....	7
13	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	8
14	DEFINITION OF THE STANDARD	11
15	PRELIMINARY POPULATION AND CLINICAL DATA.....	11
16	METHOD COMPARISON	12
17	TROUBLESHOOTING AND FAQS	12
1	VERWENDUNGSZWECK.....	13
2	LAGERUNG, HALTBARKEIT	13
3	EINLEITUNG.....	13
4	TESTPRINZIP	14
5	VORSICHTSMAßNAHMEN	14
6	TECHNISCHE HINWEISE	14
7	MITGELIEFERTE REAGENZIEN.....	15
8	BENÖTIGTE, NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN	15
9	VORBEREITUNG DER REAGENZIEN.....	15
10	VORBEREITUNG DER PROBEN	16
11	DURCHFÜHRUNG DES TESTS.....	17
12	AUSWERTUNG	18
13	LEISTUNGSMERKMALE	19
14	DEFINITION DES STANDARDS.....	22
15	NORMALWERTE (VORLÄUFIG) UND KLINISCHE DATEN	22
16	METHODENVERGLEICH	23
17	FEHLERBEHEBUNG UND HÄUFIGE FRAGEN (FAQS)	23
18	REFERENCES/LITERATURE / LITERATUR.....	24
19	PLATE LAYOUT.....	28
	SYMBOLS USED	29

1 INTENDED USE

The Adiponectin (Human) ELISA is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative measurement of human adiponectin.

Features

- **European Union: for in vitro diagnostic use.**
- The total assay time is less than 3 hours.
- The kit measures total adiponectin in serum and plasma (EDTA, citrate, heparin).
- Assay format is 96 wells.
- Quality Controls are human serum based.
- Standards are recombinant adiponectin based.
- Components of the kit are provided ready to use or concentrated.

2 STORAGE, EXPIRATION

Store the complete kit at 2 °C - 8 °C. Under these conditions, the kit is stable until the expiration date (see label on the box).

For stability of opened reagents see Chapter 9.

3 INTRODUCTION

Adiponectin, also referred to as Acrp30, AdipoQ and GBP-28, is a recently discovered 244 aminoacid protein, the product of the *apM1* gene, which is physiologically active and specifically and highly expressed in adipose cells. The protein belongs to the soluble defence collagen superfamily; it has a collagen-like domain structurally homologous with collagen VIII and X and complement factor C1q-like globular domain. Adiponectin forms homotrimers, which are the building blocks for higher order complexes found circulating in serum. Together, these complexes make up approximately 0.01% of total serum protein. Adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 have been recently cloned; AdipoR1 is abundantly expressed in skeletal muscle, whereas AdipoR2 is predominantly expressed in the liver.

Paradoxically, adipose tissue-expressed adiponectin levels are inversely related to the degree of adiposity. Adiponectin concentrations correlate negatively with glucose, insulin, triglyceride concentrations, liver fat content and body mass index and positively with high-density lipoprotein-cholesterol levels, hepatic insulin sensitivity and insulin-stimulated glucose disposal. Adiponectin has been shown to increase insulin sensitivity and decrease plasma glucose by increasing tissue fat oxidation.

Clinical studies have shown that low adiponectin levels are associated with insulin resistance and precede the onset of type 2 diabetes. Diabetic patients have low levels of adiponectin and even lower levels of adiponectin were observed in patients with poorly controlled type 2 diabetes and in diabetic patients with coronary heart disease. Hypoadiponectinemia is also closely associated with the metabolic syndrome and with the hypertriglyceridemic waist. Non-alcoholic fatty liver disease is described as part of the metabolic syndrome and levels of adiponectin have inverse association with liver enzymes and fatty liver disease. The key finding is that low adiponectin serum levels predict type 2 diabetes independent of other risk factors.

Adiponectin also inhibits the inflammatory processes of atherosclerosis suppressing the expression of adhesion and cytokine molecules in vascular endothelial cells and macrophages, respectively. This adipokine plays a role as a scaffold of newly formed collagen in myocardial remodelling after ischaemic injury and also stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signalling in endothelial cells. Low serum adiponectin levels are found in patients with coronary artery disease.

Moreover, high circulating levels of adiponectin are associated with decreased risk of myocardial infarction, independent of other factors.

Altogether, monitoring of adiponectin levels and monitoring of processes that affect its production or its receptors are promising targets for prevention and treatment of obesity, insulin resistance, hyperlipidemia and atherosclerosis.

Areas of investigation:

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

4 TEST PRINCIPLE

In the Adiponectin (Human) ELISA, standards, quality controls and samples are incubated in microplate wells pre-coated with recombinant human adiponectin together with polyclonal anti-human adiponectin antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP). After a washing step, the HRP conjugate bound to the adiponectin immobilized on the wells is allowed to react with the substrate solution (TMB). The reaction is stopped by addition of acidic solution and absorbance of the resulting yellow product is measured.

The absorbance is inversely proportional to the adiponectin concentration. A standard curve is constructed by plotting absorbance values against adiponectin of standards, and concentrations of unknown samples are determined using this standard curve.

5 PRECAUTIONS

- For professional use only.
- Wear gloves and laboratory coats when handling immunodiagnostic materials.
- Do not drink, eat or smoke in the areas where immunodiagnostic materials are being handled.
- This kit contains components of human origin. These materials were found non-reactive for HBsAg, HCV antibody and for HIV 1/2 antigen and antibody. However, these materials should be handled as potentially infectious, as no test can guarantee the complete absence of infectious agents.
- This kit contains components of animal origin. These materials should be handled as potentially infectious
- Avoid contact with the acidic Stop Solution and Substrate Solution, which contains hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine (TMB). Wear gloves and eye and clothing protection when handling these reagents. Stop and/or Substrate Solutions may cause skin/eyes irritation. In case of contact with the Stop Solution and the Substrate Solution wash skin/eyes thoroughly with water and seek medical attention, when necessary.
- The materials must not be pipetted by mouth.

6 TECHNICAL HINTS

- Reagents with different lot numbers should not be mixed.
- Use thoroughly clean glassware.
- Use deionized (distilled) water, stored in clean containers.
- Avoid any contamination among samples and reagents. For this purpose, disposable tips should be used for each sample and reagent.
- Substrate Solution should remain colourless until added to the plate. Keep Substrate Solution protected from light.
- Stop Solution should remain colourless until added to the plate. The colour developed in the wells will turn from blue to yellow immediately after the addition of the Stop Solution. Wells that are green in colour indicate that the Stop Solution has not mixed thoroughly with the Substrate Solution.
- Dispose of consumable materials and unused contents in accordance with applicable national regulatory requirements.

7 REAGENT SUPPLIED

Kit Components	State	Quantity
Antigen Coated Microtiter Strips	ready to use	96 wells
Conjugate Solution	ready to use	7 mL
Set of Standards	concentrated	7 x 0.22 mL
Quality Control High	ready to use	0.4 mL
Quality Control Low	ready to use	0.4 mL
Dilution Buffer	ready to use	2 x 13 mL
Wash Solution Conc. (10x)	concentrated	100 mL
Substrate Solution	ready to use	2 x 13 mL
Stop Solution	ready to use	9 mL
Product Data Sheet + Certificate of Analysis		1 pc

8 MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Deionized (distilled) water
- Test tubes for diluting samples
- Glassware (graduated cylinder and bottle) for Wash Solution (Dilution Buffer)
- Precision pipettes to deliver 10-1000 µL with disposable tips
- Multichannel pipette to deliver 50-200 µL with disposable tips
- Absorbent material (e.g. paper towels) for blotting the microtiter plate after washing
- Vortex mixer
- Orbital microplate shaker capable of approximately 300 rpm
- Microplate washer (optional). [Manual washing is possible but not preferable.]
- Microplate reader with 450 ± 10 nm filter preferably with reference wavelength 630 nm (alternatively another one from the interval 550 - 650 nm)
- Software package facilitating data generation and analysis (optional)

9 PREPARATION OF REAGENTS

All reagents need to be brought to room temperature prior to use.

Always prepare only the appropriate quantity of reagents for your test.

Do not use components after the expiration date marked on their label.

Assay reagents supplied ready to use:**Antigen Coated Microtiter Strips****Stability and storage:**

Return the unused strips to the provided aluminium zip-sealed bag with desiccant and seal carefully. Remaining Microtiter Strips are stable 3 months stored at 2 °C - 8 °C and protected from the moisture.

Conjugate Solution**Dilution Buffer****Substrate Solution****Stop Solution****Stability and storage:**

Opened reagents are stable 3 months when stored at 2 °C - 8 °C.

Quality Controls High, Low**Refer to the Certificate of Analysis for current Quality Control concentration!!!**

Quality Controls are ready to use, do not dilute them. (Quality Controls are supplied diluted 30x).

Stability and storage

Opened Quality controls are stable 3 months when stored at 2 °C - 8 °C.

Note:

Concentration of analyte in Quality Controls need not be anyhow associated with normal and/or pathological concentrations in serum or another body fluid. Quality Controls serve just for control that the kit works in accordance with the user's manual and Certificate of Analysis and that ELISA test was carried out properly.

Assay reagents supplied concentrated:

Human Adiponectin Standards

Dilute each concentration of Standards 3x with the Dilution Buffer just prior to the assay, e.g. 50 µL of Standard + 100 µL of Dilution Buffer for duplicates. Mix well (not to foam).

Stability and storage:

Opened standards are stable 3 months when stored at 2 °C - 8 °C

Do not store the diluted Standard solutions.

Wash Solution Conc. (10x)

Dilute Wash Solution Concentrate (10x) ten-fold in distilled water to prepare a 1x working solution.

Example: 100 mL of Wash Solution Concentrate (10x) + 900 mL of distilled water for use of all 96-wells.

Stability and storage:

The diluted Wash Solution is stable 1 month when stored at 2 °C - 8 °C. Opened Wash Solution Concentrate (10x) is stable 3 months when stored at 2 °C - 8 °C.

10 PREPARATION OF SAMPLES

The kit measures adiponectin in serum and plasma (EDTA, citrate, heparin).

Samples should be assayed immediately after collection or should be stored at -20°C. Mix thoroughly thawed samples just prior to the assay and avoid repeated freeze/thaw cycles, which may cause erroneous results. Avoid using hemolyzed or lipemic samples.

Dilute samples 30x with Dilution Buffer just prior to the assay

e.g. 10 µL of sample + 290 µL of Dilution Buffer for duplicates. **Mix well** (not to foam). Vortex is recommended.

Stability and storage:

Samples should be stored at -20 °C, or preferably at -70 °C for long-term storage. Avoid repeated freeze/ thaw cycles.

Do not store the diluted samples.

See Chapter 13 for stability of serum and plasma samples when stored at 2 °C - 8 °C, effect of freezing/thawing and effect of sample matrix (serum/plasma) on the concentration of adiponectin.

Note: It is recommended to use a precision pipette and a careful technique to perform the dilution in order to get precise results.

11 ASSAY PROCEDURE

1. Pipet **50 µL** of diluted Standards, samples, Quality Controls and Dilution Buffer (=Blank), preferably in duplicates, into the appropriate wells. See Figure 1 for example of work sheet.
2. Add **50 µL** of Conjugate Solution into each well.
3. Incubate the plate at room temperature (ca. 25 °C) for **2 hours**, shaking at ca. 300 rpm on an orbital microplate shaker.
4. Wash the wells **3-times** with Wash Solution (0.35 mL per well). After final wash, invert and tap the plate strongly against paper towel.
5. Add **200 µL** of Substrate Solution into each well. Avoid exposing the microtiter plate to direct sunlight. Covering the plate with e.g. aluminium foil is recommended.
6. Incubate the plate for **10-15 minutes** at room temperature. The incubation time may be extended [up to 20 minutes] if the reaction temperature is below than 20 °C. Do not shake the plate during the incubation.
7. Stop the colour development by adding **50 µL** of Stop Solution.
8. Determine the absorbance of each well using a microplate reader set to 450 nm, preferably with the reference wavelength set to 630 nm (acceptable range: 550 - 650 nm). Subtract readings at 630 nm (550 - 650 nm) from the readings at 450 nm.
The absorbance should be read within 5 minutes following step 7.

Note: If some samples and standard/s have absorbances above the upper limit of your microplate reader, perform a second reading at 405 nm. A new standard curve, constructed using the values measured at 405 nm, is used to determine adiponectin concentration of off-scale standards and samples. The readings at 405 nm should not replace the readings for samples that were "in range" at 450 nm.

Note 2: Manual washing: Aspirate wells and pipet 0.35 mL Wash Solution into each well. Aspirate wells and repeat twice. After final wash, invert and tap the plate strongly against paper towel. Make certain that Wash Solution has been removed entirely

	strip 1+2	strip 3+4	strip 5+6	strip 7+8	strip 9+10	strip 11+12
A	Standard 10	QC High	Sample 7	Sample 15	Sample 23	Sample 31
B	Standard 5	QC Low	Sample 8	Sample 16	Sample 24	Sample 32
C	Standard 2	Sample 1	Sample 9	Sample 17	Sample 25	Sample 33
D	Standard 1	Sample 2	Sample 10	Sample 18	Sample 26	Sample 34
E	Standard 0.5	Sample 3	Sample 11	Sample 19	Sample 27	Sample 35
F	Standard 0.2	Sample 4	Sample 12	Sample 20	Sample 28	Sample 36
G	Standard 0.1	Sample 5	Sample 13	Sample 21	Sample 29	Sample 37
H	Blank	Sample 6	Sample 14	Sample 22	Sample 30	Sample 38

Figure 1: Example of a work sheet.

12 CALCULATIONS

Most microplate readers perform automatic calculations of analyte concentration. The standard curve is constructed by plotting the mean absorbance (Y) of Standards against the known concentration (X) of Standards in logarithmic scale, using the four-parameter algorithm. Results are reported as concentration of adiponectin $\mu\text{g/mL}$ in samples.

Alternatively, the *logit log* function can be used to linearize the standard curve, i.e. logit of the mean absorbance (Y) is plotted against log of the known concentration (X) of Standards.

The measured concentration of samples and Quality Controls calculated from the standard curve must be multiplied by a dilution factor of 10, because as standards are diluted 3x and samples and Quality Controls are diluted 30x, e.g. $1.05 \mu\text{g/mL}$ (from standard curve) $\times 10$ (dilution factor) = $10.5 \mu\text{g/mL}$.

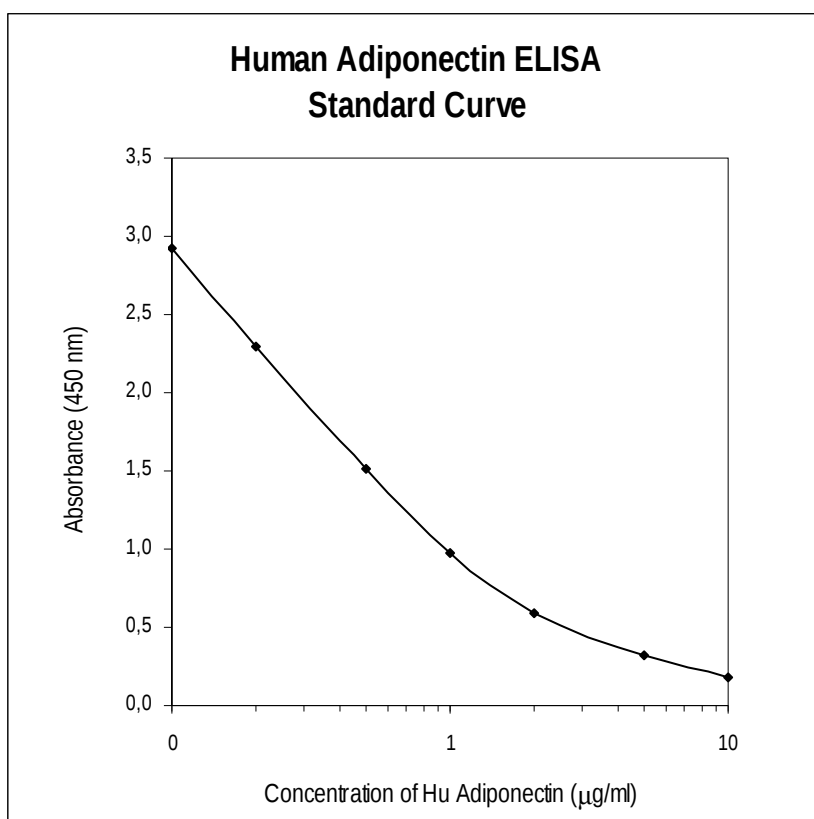


Figure 2: Typical Standard Curve for Adiponectin (Human) ELISA.

13 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Typical analytical data of Adiponectin (Human) ELISA are presented in this chapter.

13.1 Sensitivity

Limit of Detection (LOD) (defined as concentration of analyte giving absorbance lower than mean absorbance of blank* minus three standard deviations of the absorbance of blank: $A_{\text{blank}} - 3 \times \text{SD}_{\text{blank}}$) is calculated from the real adiponectin values in wells and is 26 ng/mL.

*Dilution Buffer is pipetted into blank wells.

13.2 Limit of assay

Results exceeding adiponectin level of 100 µg/mL should be repeated with more diluted samples (e.g. 60x). Dilution factor needs to be taken into consideration in calculating the adiponectin concentration.

13.3 Specificity

The antibodies used in this ELISA are specific for human adiponectin. The assay recognizes natural and recombinant human adiponectin (full-length protein, mutation-modified trimer-only-forming protein, and globular domain).

Determination of adiponectin does not interfere with hemoglobin (1 mg/mL), bilirubin (170 mmol/L) and triglycerides (5.0 mmol/L).

Adiponectin was measured in some of adipose tissue extracts, however most of the extract adiponectin levels were below the assay detection limit. No cross reactivity has been observed for human leptin, leptin receptor and resistin at 100 ng/mL.

Sera of several mammalian species were measured in the assay. See results below.

For details please contact us at drg@drq-diagnostics.de.

Mammalian serum sample	Observed cross reactivity
Bovine	no
Cat	no
Dog	no
Goat	no
Hamster	no
Horse	no
Monkey	yes
Mouse	no
Pig	no
Rabbit	no
Rat	no
Sheep	no

- Presented results are multiplied by respective dilution factor

13.4 Precision

Intra-assay (Within-Run) (n=8)

Sample	Mean (µg/mL)	SD (µg/mL)	CV (%)
1	11.71	0.69	5.9
2	12.28	0.48	3.9

Inter-assay (Run-to-Run) (n=8)

Sample	Mean (µg/mL)	SD (µg/mL)	CV (%)
1	8.23	0.52	6.3
2	19.86	1.39	7.0

13.5 Spiking Recovery

Serum samples were spiked with different amounts of human adiponectin and assayed.

Sample	Observed (µg/mL)	Expected (µg/mL)	Recovery O/E (%)
1	5.10	-	-
	10.39	10.10	102.9
	15.57	15.10	103.1
	23.19	25.10	92.4
2	10.94	-	-
	16.18	15.94	101.5
	21.14	20.94	101.0
	30.02	30.94	100.3

13.6 Linearity

Serum samples were serially diluted with Dilution Buffer and assayed.

Sample	Dilution	Observed (µg/mL)	Expected (µg/mL)	Recovery O/E (%)
1	-	18.05	-	-
	2x	9.28	9.02	102.8
	4x	4.39	4.51	97.3
	8x	2.53	2.26	112.7
2	-	23.56	-	-
	2x	10.15	11.78	86.2
	4x	5.64	5.89	95.8
	8x	3.08	2.94	104.5

13.7 Effect of sample matrix

EDTA, citrate and heparin plasmas were compared to respective serum samples from the same 10 individuals.

Results are shown below:

Volunteer No.	Serum (µg/mL)	Plasma (µg/mL)		
		EDTA	Citrate	Heparin
1	7.37	6.01	5.52	6.23
2	5.52	6.71	4.97	6.19
3	4.57	3.84	3.63	3.67
4	6.57	7.87	6.98	9.05
5	12.89	11.54	11.88	11.83
6	13.72	15.42	13.20	16.32
7	5.82	4.88	3.95	4.81
8	15.29	14.74	15.66	16.97
9	11.43	10.03	9.95	10.44
10	5.93	5.71	6.05	5.39
Mean (µg/mL)	8.9	8.7	8.2	9.4
Mean Plasma/Serum (%)	-	97.4	91.8	105.6
Coefficient of determination R²	-	0.92	0.96	0.91

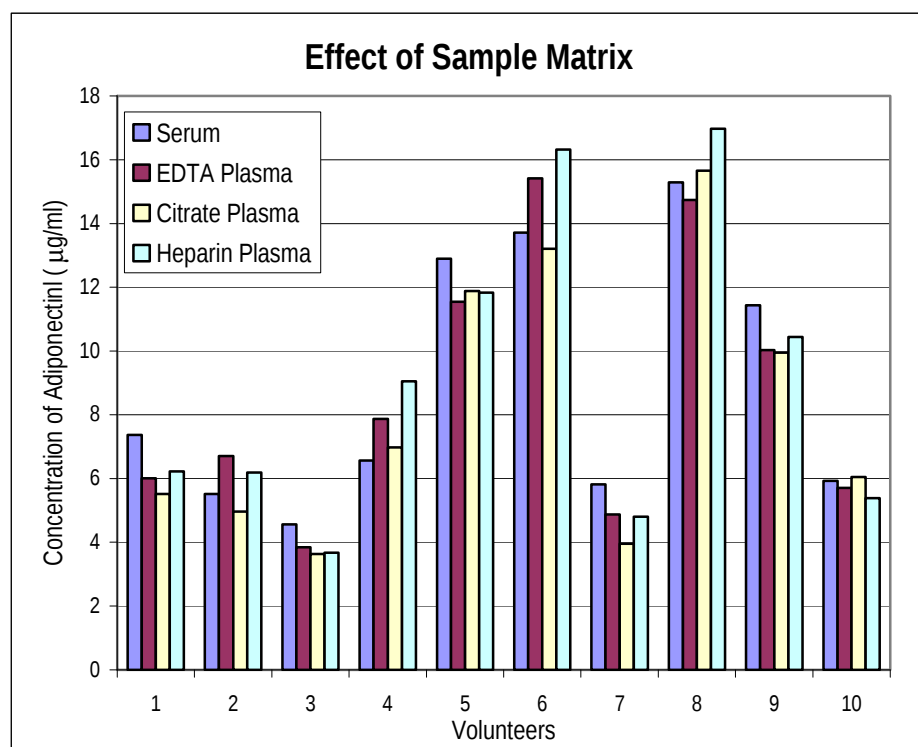


Figure 3: Adiponectin levels measured using Adiponectin (Human) ELISA from 10 individuals using serum, EDTA, citrate and heparin plasma, respectively.

13.8 Stability of samples stored at 2 °C - 8 °C

Samples should be stored at -20 °C. However, no significant decline in concentration of human adiponectin was observed in serum and plasma samples after 7 days when stored at 2 °C - 8 °C. To avoid microbial contamination, samples were treated with ϵ -aminocaproic acid and sodium azide, resulting in the final concentration of 0.03% and 0.1%, respectively.

Sample	Incubation Temp, Period	Serum ($\mu\text{g/mL}$)	Plasma ($\mu\text{g/mL}$)		
			EDTA	Citrate	Heparin
1	-20 °C	2.01	2.08	1.79	1.16
	2 °C - 8 °C, 1 day	2.07	1.89	1.69	1.85
	2 °C - 8 °C, 7 days	1.86	1.89	1.64	1.67
2	-20 °C	7.30	6.76	6.56	5.78
	2 °C - 8 °C, 1 day	7.24	6.83	6.39	6.20
	2 °C - 8 °C, 7 days	7.10	7.07	5.87	6.20
3	-20 °C	10.72	15.13	11.75	11.02
	2 °C - 8 °C, 1 day	10.99	13.65	12.36	10.89
	2 °C - 8 °C, 7 days	12.16	13.38	10.59	10.48

13.9 Effect of Freezing/Thawing

No significant decline was observed in concentration of human adiponectin in serum and plasma samples after repeated (5x) freeze/thaw cycles. However it is recommended to avoid unnecessary repeated freezing/thawing of the samples.

Sample	Number of f/t cycles	Serum ($\mu\text{g/mL}$)	Plasma ($\mu\text{g/mL}$)		
			EDTA	Citrate	Heparin
1	1x	7.17	7.88	6.25	7.47
	3x	7.38	8.99	7.88	8.98
	5x	6.87	10.31	7.98	10.57
2	1x	10.86	13.16	10.83	10.60
	3x	13.53	14.47	13.21	11.51
	5x	11.23	11.22	8.64	10.96
3	1x	10.66	8.80	8.66	9.17
	3x	9.52	10.34	9.09	8.75
	5x	10.13	8.54	9.26	8.89

14 DEFINITION OF THE STANDARD

The recombinant human adiponectin is used as the Standard. The recombinant human adiponectin is produced in HEK293 cell line and contains 225 amino acid residues of the human adiponectin and 8 extra AA.

15 PRELIMINARY POPULATION AND CLINICAL DATA**Normal Values**

The following results were obtained when serum samples from 335 healthy donors were assayed with the Adiponectin (Human) ELISA (EIA-4574).

Gender	BMI (kg/m^2)	n	Mean ($\mu\text{g/mL}$)	SD ($\mu\text{g/mL}$)
Men	< 25	41	10.9	4.0
	25-30	52	8.8	4.0
	> 30	23	8.3	2.8
	total	115	9.5	3.9
Women	< 25	92	13.6	5.4
	25-30	56	13.9	8.6
	> 30	57	11.4	3.8
	total	220	13.2	6.1

Reference Range

The data quoted in these instructions should be used for guidance only. It is recommended that each laboratory include its own panel of control samples in the assay. Each laboratory should establish its own normal and pathological reference ranges for adiponectin levels with the assay.

16 METHOD COMPARISON

The Adiponectin (Human) ELISA was compared to the other commercial immunoassays, by measuring of 35 or 38 serum samples, in two different ELISA. The following correlation graphs were obtained.

Competitor ELISA 1 versus EIA-4574:

$$y = 0.8476x - 1.3736, R^2 = 0.9135, n = 38$$

Competitor ELISA 2 versus EIA-4574:

$$y = 1.0034x + 0.0068, R^2 = 0.938, n = 38$$

A Adiponectin (Human) ELISA, High Sensitivity (a sandwich ELISA,) was compared with the Adiponectin (Human) ELISA (a competitive ELISA, EIA-4574), by measuring of 33 serum samples. The following correlation graph was obtained.

High Sensitivity ELISA versus EIA-4574:

$$y = 0.9346x + 1.3619, R^2 = 0.9119, n = 33$$

17 TROUBLESHOOTING AND FAQs

Weak signal in all wells

Possible explanations:

- Omission of a reagent or a step
- Improper preparation or storage of a reagent
- Assay performed before reagents were allowed to come to room temperature
- Improper wavelength when reading absorbance

High signal and background in all wells

Possible explanations:

- Improper or inadequate washing
- Overdeveloping; incubation time with Substrate Solution should be decreased before addition of Stop Solution
- Incubation temperature over 30 °C

High coefficient of variation (CV)

Possible explanation:

- Improper or inadequate washing
- Improper mixing Standards, Quality Controls or samples

1 VERWENDUNGSZWECK

Der Adiponectin (Human) ELISA ist ein kompetitiver Enzym-gebundener Immuntest für die quantitative Messung von humanem Adiponectin.

Eigenschaften

- **Europäische Union: Für in-vitro-Diagnostik.**
- Die gesamte Testdauer beträgt weniger als drei Stunden.
- Der Testkit misst den Gesamtgehalt an Serum- oder Plasma-Adiponectin (EDTA, Zitrat, Heparin).
- Das Testformat ist eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen.
- Die Qualitätskontrollen basieren auf Humanserum.
- Die Standards basieren auf rekombinantem Adiponectin.
- Die Testkomponenten sind gebrauchsfertig oder Konzentrate.

2 LAGERUNG, HALTBARKEIT

Lagern Sie den Kit bei 2 °C - 8 °C. Unter diesen Bedingungen kann er bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum (Etikett auf der Verpackung) verwendet werden.

Die Haltbarkeit von geöffneten Reagenzien ist in Kapitel 9 beschrieben.

3 EINLEITUNG

Adiponectin, auch bekannt als Acrp30, AdipoQ and GBP-28, ist ein kürzlich entdecktes, aus 244 Aminosäuren bestehendes, Protein. Es ist das Produkt des *apM1* Gens, das physiologisch aktiv und sowohl spezifisch als auch hoch exprimiert in Fettzellen (Adipozyten) vorkommt. Das Protein gehört zu der Überfamilie der löslichen "Defence"-Kollagene". Es verfügt über eine kollagenähnliche Domäne, die strukturell homolog ist mit Collagen VIII und X und der Komplementfaktor C1q-ähnlichen globulären Domäne. Adiponectin bildet Homotrimere, die Bausteine sind für höhere Komplexe, die im Serum zirkulieren. Zusammengenommen machen diese Komplexe etwa 0,01 % des Gesamtserumproteins aus. Die Adiponectin-Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 wurden erst vor kurzem kloniert; AdipoR1 wird reichlich in Skelettmuskelzellen exprimiert, während AdipoR2 vor allem in der Leber exprimiert wird.

Paradoxerweise sind die im Fettgewebe exprimierten Adiponectin-Werte umgekehrt proportional zum Grad der Adipositas. Adiponectin-Konzentrationen korrelieren negativ mit Glucose-, Insulin-, Triglycerid-Konzentrationen, Leberfett und dem body-mass-index (BMI) sowie positiv mit high-density Lipoprotein-Cholesterin-Werten, Insulinsensitivität der Leber und Insulin-stimuliertem Glucose Abbau. Es konnte gezeigt werden, dass Adiponectin die Insulinsensitivität erhöht und die Plasma-Glukosekonzentration verringert indem es die Fettverbrennung im Gewebe erhöht. Von besonderem Interesse ist, dass die Adiponectin-Serumwerte eine Erkrankung an Typ 2 Diabetes Mellitus vorhersagen, unabhängig von anderen Risikofaktoren. Adiponectin hemmt auch entzündliche Prozesse bei Atherosklerose indem es die Expression von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen in vaskulären Endothelzellen bzw. Makrophagen hemmt.

Dieses Adipokin spielt eine Rolle als Gerüstbaustein für neu entstehendes Kollagen beim Wiederaufbau des Herzmuskels nach ischämischen Ereignissen und stimuliert ebenso die Angiogenese durch Unterstützung der Wechselwirkung zwischen AMP-aktivierter Proteinkinase und Akt Signalübertragung in Endothelzellen. Man findet niedrige Adiponectinspiegel bei Patienten mit koronaren Herzerkrankungen. Außerdem besteht bei hohen Werten an zirkulierendem Adiponektin ein verringertes Herzinfarktrisiko, unabhängig von anderen Faktoren.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass Adiponectin ein großes Potential besitzt, sich zu einem Parameter mit hoher klinischer Relevanz zur Diagnose von Diabetes Typ 2 Atherosklerose und metabolischem Syndrom zu entwickeln.

Klinische Anwendungen und Forschungsgebiete: Energiemetabolismus und Gewichtsregulation
Metabolisches Syndrom
Typ 2 Diabetes
Koronare Herzerkrankungen
Atherosklerose

4 TESTPRINZIP

Beim Adiponectin (Human) ELISA werden Standards, Qualitätskontrollen und die Proben zusammen mit einem Meerrettich-Peroxidase konjugiertem, polyklonalen anti-Adiponectin Antikörper (Konjugat) in Mikrotiterplatten inkubiert, die mit rekombinantem humanem Adiponectin beschichtet sind. Nach gründlichem Waschen lässt man das Konjugat, das an die Adiponectin beschichteten Vertiefungen gebunden hat, mit der Substratlösung (TMB) reagieren. Die Reaktion wird durch Zugabe einer Säure gestoppt und die Absorption des entstandenen gelben Reaktionsprodukts gemessen. Die Absorption ist umgekehrt proportional zur Adiponectinkonzentration. Die Standardkurve wird erstellt, indem man die Absorptionswerte gegen die Adiponectin Konzentrationen der Standards aufträgt. Die Konzentrationen in den unbekannten Proben können dann mithilfe dieser Standardkurve ermittelt werden.

5 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur für sachkundige Anwender.
- Tragen Sie Handschuhe und Laborkittel beim Umgang mit immundiagnostischen Materialien.
- Trinken, essen oder rauchen Sie nicht am Arbeitsplatz.
- Dieser Testkit enthält Komponenten humaner Herkunft. Dieses Material reagiert bei Tests nicht mit HbsAg (Hepatitis Oberflächen Antigen), HCV Antikörper und HIV 1/2 Antikörpern und Antigen. Dennoch sollte dieses Material, weil kein Test die vollständige Abwesenheit von infektiösen Agenzien garantieren kann, als potentiell infektiös gehandhabt werden.
- Der Kit enthält Komponenten mit tierischem Ursprung. Dieses Material sollte als potentiell infektiös gehandhabt werden.
- Vermeiden Sie den Kontakt mit der sauren Stopp Lösung und der Substrat Lösung (TMB), die Wasserstoffperoxid enthält. Wenn Sie mit diesen Reagenzien arbeiten, sollten Sie Handschuhe und eine Schutzbrille tragen. Die Stopp- und/oder Substratlösung kann Haut- oder Augenreizungen hervorrufen. Sollten Sie doch einmal mit der Stopplösung oder der Substratlösung in Kontakt kommen, so waschen Sie die Stelle gründlich mit Wasser und suchen gegebenenfalls einen Arzt auf.
- Die Lösungen dürfen nicht mit dem Mund pipettiert werden.

6 TECHNISCHE HINWEISE

- Reagenzien mit unterschiedlichen Chargennummern sollten nicht gemischt werden.
- Benutzen Sie nur gründlich gereinigte Glasbehälter.
- Benutzen Sie deionisiertes (destilliertes) Wasser aus sauberen Behältern.
- Vermeiden Sie jegliche Kontamination zwischen den Proben und den Reagenzien. Verwenden Sie deshalb Einmalpipetten für jede Probe und jedes Reagenz.
- Die Substratlösung sollte farblos sein bevor sie in die Platte pipettiert wird. Das Substrat muss vor Licht geschützt werden.
- Die Stopplösung sollte farblos sein bevor sie in die Platte pipettiert wird. Die Farbe wechselt von Blau nach Gelb unmittelbar nach Zugabe der Stopplösung. Vertiefungen mit grünlicher Farbe deuten auf unzureichende Vermischung zwischen der Substratlösung und der Stopplösung hin.
- Entsorgen Sie die Verbrauchsmaterialien und nicht gebrauchte Reagenzien entsprechend den geltenden nationalen Vorschriften.

7 MITGELIEFERTE REAGENZIEN

	Kit Komponenten	Beschaffenheit	Menge
Coated Microtiter Strips	Antigen-beschichtete Mikrotiterstreifen	gebrauchsfertig	96 wells
Conjugate Solution	Konjugatlösung	gebrauchsfertig	7 mL
Standards	Ein Satz Human Adiponectin Standards	Konzentrate	7 x 0.22 mL
Quality Control High	Kontrollserum Hoch	gebrauchsfertig	0.4 mL
Quality Control Low	Kontrollserum Niedrig	gebrauchsfertig	0.4 mL
Dilution Buffer	Verdünnungspuffer	gebrauchsfertig	2 x 13 mL
Wash Solution	Waschlösung (10x-Konzentrat)	Konzentrat	100 mL
Substrate Solution	Substratlösung	gebrauchsfertig	2 x 13 mL
Stop Solution	Stopplösung	gebrauchsfertig	9 mL
	Testanleitung + Analysenzertifikat		1 St.

8 BENÖTIGTE, NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN

- Deionisiertes (destilliertes) Wasser
- Teströhrchen zur Probenverdünnung
- Glasgefäße (Messzylinder und Flasche) für die Waschlösung (Verdünnungspuffer)
- Präzisionspipetten zum Pipettieren von 10-1000 µL und Einmalspitzen
- Multikanalpipette 50 - 200 µL und Einmalspitzen
- Saugfähiges Material zum Ausschlagen und Abtupfen der Mikrotiterplatte nach dem Waschen.
- Vortex Mixer
- Orbital Mikrotiterplatten Schüttler mit ca. 300 upm
- Mikrotiterplatten Waschgerät (optional).
(Manuelles Waschen ist möglich, aber nicht zu empfehlen)
- Mikrotiterplatten Reader mit 450 ± 10 nm Filter, vorzugsweise mit einer Referenzwellenlänge von 630 nm (alternativ 550-650 nm)
- Software zur Datenerfassung und -analyse (optional)

9 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien müssen vor der Verwendung Raumtemperatur erreicht haben.

Stellen Sie nur die jeweils benötigte Menge an Reagenzien her.

Verwenden Sie keine Komponenten mit überschrittenem Haltbarkeitsdatum.

Gebrauchsfertige Testreagenzien:**Antigen-beschichtete Mikrotiterstreifen**Haltbarkeit und Lagerung:

Nicht verbrauchte Streifen sollten im beiliegenden Aluminiumbeutel gut verschlossen aufbewahrt werden. Vor Feuchtigkeit geschützt sind sie 3 Monate bei 2 °C - 8 °C haltbar.

Konjugatlösung**Verdünnungspuffer****Substratlösung****Stopplösung**Haltbarkeit und Lagerung:

Die geöffneten Reagenzien sind 3 Monate bei 2 °C - 8 °C haltbar.

Kontrollseren, Hoch und Niedrig**Die Konzentrationen der Kontrollseren entnehmen Sie bitte dem Analysenzertifikat!!!**

Die Kontrollseren sind gebrauchsfertig, bitte nicht verdünnen. (Sie werden 30-fach verdünnt geliefert).

Haltbarkeit und Lagerung

Die geöffneten Qualitätskontrollen sind 3 Monate bei 2 °C - 8 °C haltbar.

Anmerkung:

Die Analytkonzentration in den Kontrollseren kann nicht mit normalen- oder pathologischen Konzentrationen im Serum oder anderen Körperflüssigkeiten in Verbindung gebracht werden. Die Kontrollseren dienen lediglich der Kontrolle, ob der Test entsprechend Gebrauchsanleitung und Analysenzertifikat funktioniert und der ELISA richtig durchgeführt wurde

Testreagenzien die als Konzentrat geliefert werden:

Human Adiponectin Standards

Verdünnen Sie die konzentrierten Standards 3x mit Verdünnungspuffer vor der Verwendung, z.B. 50 µL Standard + 100 µL Verdünnungspuffer für Duplikate. Gut mischen ohne Schaumbildung.

Haltbarkeit und Lagerung

Die geöffneten Qualitätskontrollen sind 3 Monate bei 2 °C - 8 °C haltbar.

Die verdünnten Standards dürfen nicht gelagert werden.

Waschlösung (10x Konzentrat)

Verdünnen Sie die Waschlösung 10-fach (10x) mit destilliertem Wasser um die Gebrauchslösung herzustellen. Beispiel: 100 mL 10x-Waschlösung (Konzentrat) + 900 mL destilliertes Wasser für die gesamte Platte (alle 96 Vertiefungen).

Haltbarkeit und Lagerung:

Die verdünnte Waschlösung ist 1 Monat bei 2 °C - 8 °C haltbar. Das geöffnete Waschlösungskonzentrat (10x) ist 3 Monate bei 2 °C - 8 °C haltbar.

10 VORBEREITUNG DER PROBEN

Der Test misst Adiponectin in Serum oder Plasma (EDTA, Zitrat, Heparin).

Die Proben sollten entweder sofort nach der Gewinnung gemessen, oder bei -20 °C gelagert werden. Mischen Sie die aufgetauten Proben vor der Verwendung gründlich und vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen. Dies könnte zu falschen Ergebnissen führen. Vermeiden Sie die Verwendung von hämolytischen oder lipämischen Proben.

Verdünnen Sie die Proben unmittelbar vor Testdurchführung 30x mit Verdünnungspuffer, z.B. 10 µL Probe + 290 µL Verdünnungspuffer für Duplikate. **Gut mischen** und Schaumbildung vermeiden. Vortexen wird empfohlen.

Haltbarkeit und Lagerung:

Die Proben sollten bei mindestens -20 °C gelagert werden, für Langzeitlagerung ist -70 °C vorzuziehen. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.

Verdünnte Proben sollten nicht gelagert werden

In Kapitel 13 ist die Stabilität von Serum- und Plasmaproben bei 2 °C - 8 °C, der Einfluss von wiederholtem Einfrieren und Auftauen sowie der Einfluss der Probenmatrix (Serum/Plasma) auf die Adiponectinkonzentration beschrieben.

Wichtig: Die Benutzung von Präzisionspipetten und sorgfältiges Arbeiten beim Verdünnen der Proben ist Voraussetzung um präzise Ergebnisse zu erzielen.

11 DURCHFÜHRUNG DES TESTS

1. Pipettieren Sie **50 µL** verdünnte Standards, Proben, Kontrollseren und Verdünnungspuffer (=Blank), am besten als Duplikate, in die vorgesehenen Vertiefungen der Mikrotiterplatte.
2. In jede Vertiefung **50 µL** Konjugatlösung zugeben.
3. Inkubieren Sie die Platte bei Raumtemperatur (25 °C) **2 Stunden** lang unter Bewegung bei etwa 300 upm auf einem Orbitalschüttler für Mikrotiterplatten.
4. Waschen Sie die Platte **dreimal** mit Waschlösung (0,35 mL pro Vertiefung). Anschließend die Platte umdrehen und kräftig auf ein saugfähiges Papierhandtuch klopfen.
5. In jede Vertiefung **200 µL** Substratlösung pipettieren. Schützen Sie die Platte vor direkter Sonneneinstrahlung, z.B. durch Bedecken mit Aluminiumfolie.
6. Inkubieren Sie die Platte für **10-15 Minuten** bei Raumtemperatur. Die Inkubationszeit kann verlängert werden (bis zu 20 Minuten), wenn die Raumtemperatur unter 20 °C liegt. Während dieser Inkubation darf die Platte nicht geschüttelt werden.
7. Stoppen Sie die Farbreaktion durch Zugabe von **50 µL** Stopplösung.
8. Bestimmen Sie die Absorption jeder Vertiefung mit einem Mikrotiterplatten Reader bei 450 nm, vorzugsweise mit einer Referenzwellenlänge von 630 nm (550-650 nm sind akzeptabel). Subtrahieren Sie die Werte der Referenzwellenlänge von denen bei 450 nm. **Die Absorption sollte innerhalb von 5 Minuten nach Schritt 7 gemessen werden.**

Anmerkung 1: Wenn der Mikrotiterplatten Reader nicht in der Lage ist die Absorption des niedrigsten Standards zu lesen, führt man eine zweite Messung bei 405 nm durch. Die neue Standardkurve, die man aus den Werten der Messung bei 405 nm erstellt, wird verwendet um die Adiponectin-Konzentration von Proben zu bestimmen, die außerhalb des Bereichs der Standards lagen. Die Messung bei 405nm sollten aber nicht die eigentlichen Messungen bei 450nm ersetzen.

Anmerkung 2: Manuelles Waschen: Saugen Sie alle Vertiefungen leer und geben 0,35 mL Waschlösung zu. Wiederholen diesen Vorgang zweimal. Anschließend die Platte umdrehen und kräftig auf einem Papierhandtuch ausklopfen. Stellen Sie sicher, dass die Waschlösung vollständig entfernt wurde.

	Streifen 1+2	Streifen3+4	Streifen5+6	Streifen7+8	Streifen9+10	Streifen11+12
A	Standard 10	QC High	Probe 7	Probe 15	Probe 23	Probe 31
B	Standard 5	QC Low	Probe 8	Probe 16	Probe 24	Probe 32
C	Standard 2	Probe 1	Probe 9	Probe 17	Probe 25	Probe 33
D	Standard 1	Probe 2	Probe 10	Probe 18	Probe 26	Probe 34
E	Standard 0.5	Probe 3	Probe 11	Probe 19	Probe 27	Probe 35
F	Standard 0.2	Probe 4	Probe 12	Probe 20	Probe 28	Probe 36
G	Standard 0.1	Probe 5	Probe 13	Probe 21	Probe 29	Probe 37
H	Blank	Probe 6	Probe 14	Probe 22	Probe 30	Probe 38

Abb. 1: Beispiel für ein Arbeitsblatt

12 AUSWERTUNG

Die meisten Mikrotiterplatten Reader berechnen automatisch die Konzentration des Analyts. Die Eichkurve wird erstellt, indem man die Absorption bei 450 nm der Standards (Y) gegen den Logarithmus (log) der bekannten Konzentrationen der Standards (X) aufträgt, unter Verwendung der Vier-Parameter-Funktion. Die Ergebnisse werden als Adiponectin-Konzentration ($\mu\text{g/mL}$) in den Proben angegeben.

Alternativ kann die *logit log* Funktion verwendet werden, um die Kalibrierungskurve zu linearisieren (z. B. logit der Absorption (Y) wird gegen den log der bekannten Konzentrationen (X) der Standards aufgetragen).

Die aus der Standardkurve errechneten Konzentrationen der Proben und Kontrollseren müssen mit 10 multipliziert werden, da die Standards 3-fach, die Proben und Kontrollen 30-fach verdünnt wurden. Beispiel: Ein Wert von 1,05 $\mu\text{g/mL}$ (aus der Standardkurve) $\times 10$ ergeben eine tatsächliche Konzentration von 10,5 $\mu\text{g/mL}$.

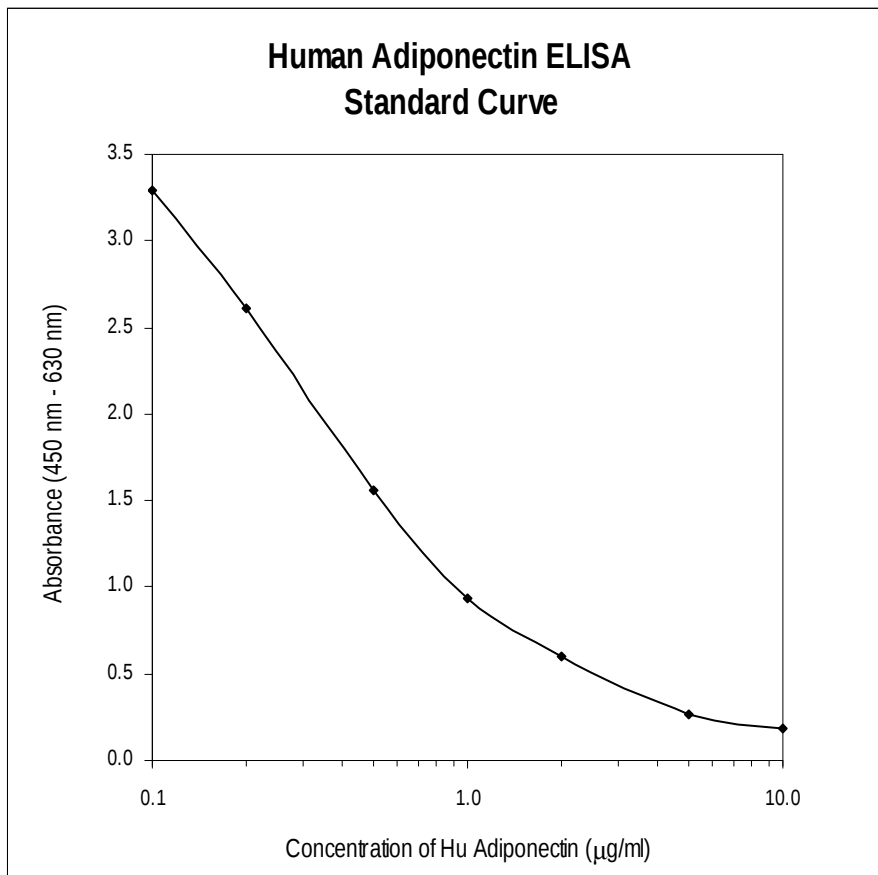


Abb. 2: Typische Standardkurve des Adiponectin (Human) ELISA.

13 LEISTUNGSMERKMALE

In diesem Abschnitt werden typische analytische Daten des Adiponectin (Human) ELISA beschrieben.

13.1 Sensitivität

Die Nachweisgrenze (definiert als die Konzentration an Human-Adiponectin, die einen höheren Absorptionswert zeigt als die mittlere Absorption des Blanks* minus drei Standardabweichungen der Blankabsorption:

$A_{\text{blank}} - 3 \times \text{SD}_{\text{blank}}$) bezieht sich auf die tatsächlichen Konzentration in den Vertiefungen und beträgt 26 ng/mL.

*nur Verdünnungspuffer in den Blank-Vertiefungen

13.2 Limitierung des Tests

Ergebnisse mit einer Adiponectinkonzentration von über 100 µg/mL sollten mit einer höheren Probenverdünnung wiederholt werden (z.B. 60x). Der höhere Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

13.3 Spezifität

Die in diesem Test verwendeten Antikörper sind spezifisch für humanes Adiponectin. Der Test erkennt natürliches und rekombinantes Human-Adiponectin (vollständiges Protein, trimeres (mutiertes) Protein und die globuläre Domäne des Adiponectins).

Eine Beeinflussung des Tests durch Hämoglobin (1,0 mg/mL), Bilirubin (170 µmol/L) und Triglyceride (5,0 mmol/L) wurde nicht beobachtet.

Adiponectin konnte in einigen Extrakten von Fettgewebe gemessen werden, allerdings lagen die Pegel der meisten Extrakte unterhalb der Nachweisgrenze. Es wurde keine Kreuz-Reaktivität mit humanem Leptin, Leptin-Rezeptor und Resistin bei 100 ng/mL festgestellt.

Seren verschiedener Tiere wurden gemessen (siehe folgende Tabelle).

Für Details kontaktieren Sie uns bitte unter drg@drg-diagnostics.de.

Tierserum von	Kreuzreaktivität
Rind	nein
Katze	nein
Hund	nein
Ziege	nein
Hamster	nein
Pferd	nein
Affe	ja
Maus	nein
Schwein	nein
Kaninchen	nein
Ratte	nein
Schaf	nein

- Die angegebenen Werte wurden mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert

13.4 Genauigkeit

Intra-Assay (innerhalb eines Testansatzes) (n=8)

Probe	Mittelwert (µg/mL)	SD (µg/mL)	CV (%)
1	11.71	0.69	5.9
2	12.28	0.481	3.9

Inter-Assay (Vergleich verschiedener Testansätze) (n=8)

Probe	Mittelwert (µg/mL)	SD (µg/mL)	CV (%)
1	8.23	0.52	6.3
2	19.86	1.39	7.0

13.5 Wiederfindungstests (Spiking Recovery)

Serumproben wurden mit unterschiedlichen Mengen Human Adiponectin versetzt und getestet.

Probe	Gemessen (µg/mL)	Erwartet (µg/mL)	Wiederfindung G/E (%)
1	5.10	-	-
	10.39	10.10	102.9
	15.57	15.10	103.1
	23.19	25.10	92.4
2	10.94	-	-
	16.18	15.94	101.5
	21.14	20.94	101.0
	30.02	30.94	100.3

13.6 Verdünnungslinearität

Serumproben wurden seriell mit Verdünnungspuffer verdünnt und dann getestet.

Probe	Verdünnung	Gemessen (µg/mL)	Erwartet (µg/mL)	Wiederfindung G/E (%)
1	-	18.05	-	-
	2x	9.28	9.02	102.8
	4x	4.39	4.51	97.3
	8x	2.53	2.26	112.7
2	-	23.56	-	-
	2x	10.15	11.78	86.2
	4x	5.64	5.89	95.8
	8x	3.08	2.94	104.5

13.7 Einfluss der Probenmatrix

EDTA-, Zitrat- und Heparin-Plasmen wurden mit den entsprechenden Serumproben von 10 Probanden verglichen. Die Ergebnisse sind nachfolgend aufgeführt:

Proband Nr.	Serum (µg/mL)	Plasma (µg/mL)		
		EDTA	Zitrat	Heparin
1	7.37	6.01	5.52	6.23
2	5.52	6.71	4.97	6.19
3	4.57	3.84	3.63	3.67
4	6.57	7.87	6.98	9.05
5	12.89	11.54	11.88	11.83
6	13.72	15.42	13.20	16.32
7	5.82	4.88	3.95	4.81
8	15.29	14.74	15.66	16.97
9	11.43	10.03	9.95	10.44
10	5.93	5.71	6.05	5.39
Mittelwert (µg/mL)		8.9	8.2	9.4
Mittelwert Plasma/Serum (%)		97.4	91.8	105.6
Bestimmtheitsmaß R ²		0.92	0.96	0.91

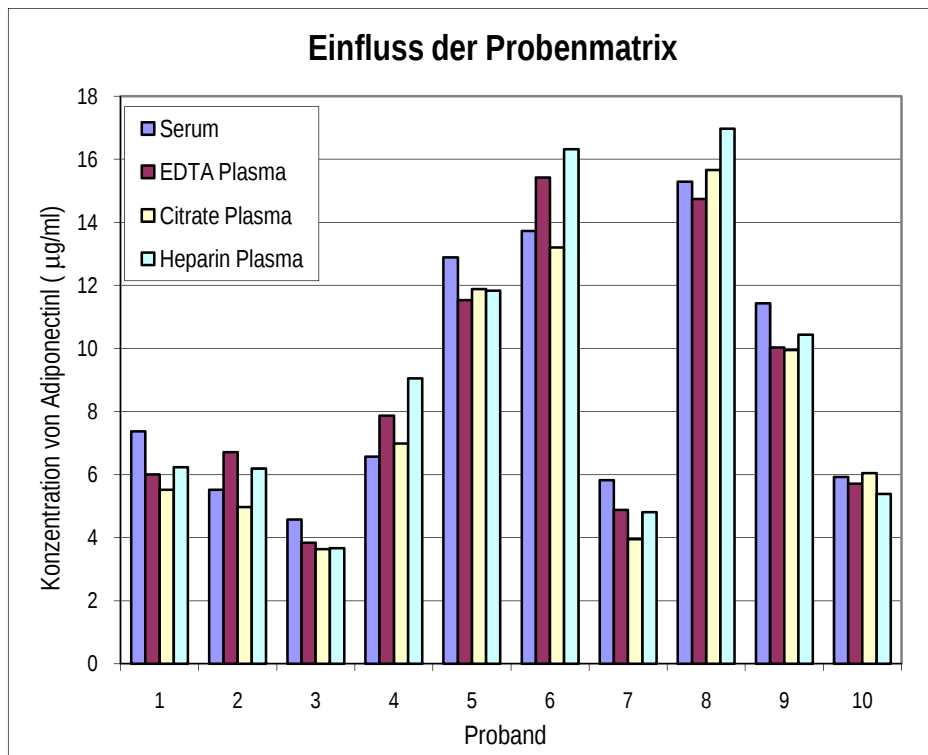


Abb. 3: Entsprechende Adiponectin-Konzentrationen in Serum, EDTA-, Zitrat- und Heparin-Plasmen von 10 Probanden, gemessen mit dem Adiponectin (Human) ELISA.

13.8 Haltbarkeit von Proben bei 2 °C - 8 °C

Proben sollten bei -20 °C gelagert werden. Allerdings konnte nach 7 Tage Lagerung bei 2 °C - 8 °C kein signifikanter Abfall der Adiponectin-Konzentration beobachtet werden. Um eine mikrobielle Kontamination zu verhindern wurden die Proben mit ϵ -Aminocaprönsäure (0,03%) und Natriumazid (0,1%) versetzt.

Probe	Inkubationstemp., Zeit	Serum ($\mu\text{g/mL}$)	Plasma ($\mu\text{g/mL}$)		
			EDTA	Zitrat	Heparin
1	-20 °C	2.01	2.08	1.79	1.16
	2 °C - 8 °C, 1 Tag	2.07	1.89	1.69	1.85
	2 °C - 8 °C, 7 Tage	1.86	1.89	1.64	1.67
2	-20 °C	7.30	6.76	6.56	5.78
	2 °C - 8 °C, 1 Tag	7.24	6.83	6.39	6.20
	2 °C - 8 °C, 7 Tage	7.10	7.07	5.87	6.20
3	-20 °C	10.72	15.13	11.75	11.02
	2 °C - 8 °C, 1 Tag	10.99	13.65	12.36	10.89
	2 °C - 8 °C, 7 Tage	12.16	13.38	10.59	10.48

13.9 Einfluss von Einfrieren/Auftauen

Nach wiederholtem (5x) Einfrieren und Auftauen von Serum- und Plasmaproben konnte kein signifikanter Abfall der Adiponectin-Konzentration beobachtet werden. Trotzdem wird empfohlen, unnötiges Einfrieren und Auftauen der Proben zu vermeiden.

Probe	Anzahl f/t Zyklen	Serum ($\mu\text{g/mL}$)	Plasma ($\mu\text{g/mL}$)		
			EDTA	Zitrat	Heparin
1	1x	7.17	7.88	6.25	7.47
	3x	7.38	8.99	7.88	8.98
	5x	6.87	10.31	7.98	10.57
2	1x	10.86	13.16	10.83	10.60
	3x	13.53	14.47	13.21	11.51
	5x	11.23	11.22	8.64	10.96
3	1x	10.66	8.80	8.66	9.17
	3x	9.52	10.34	9.09	8.75
	5x	10.13	8.54	9.26	8.89

14 DEFINITION DES STANDARDS

In diesem Test wird rekombinantes humanes Adiponectin als Standard verwendet. Das rekombinante humane Adiponectin wurde in HEK293 Zellen produziert und enthält 225 Aminosäuren von humanem Adiponectin und 8 zusätzliche Aminosäuren.

15 NORMALWERTE (VORLÄUFIG) UND KLINISCHE DATEN

Normalwerte

Die folgenden Ergebnisse wurden erzielt, indem Serumproben von 335 gesunden Personen mit dem Adiponectin (Human) ELISA (EIA-4574) gemessen wurden.

Geschlecht	BMI (kg/m^2)	n	Mittelwert ($\mu\text{g/mL}$)	SD ($\mu\text{g/mL}$)
Männer	< 25	41	10.9	4.0
	25-30	52	8.8	4.0
	> 30	23	8.3	2.8
	Gesamt	115	9.5	3.9
Frauen	< 25	92	13.6	5.4
	25-30	56	13.9	8.6
	> 30	57	11.4	3.8
	Gesamt	220	13.2	6.1

Referenzbereiche

Die hier angegebenen Daten sollten nur als Richtwerte dienen. Es wird jedem Labor empfohlen, zusätzlich eigene Kontrollseren einzusetzen. Jedes Labor sollte eigene Normalwerte und pathologische Referenzbereiche für diesen Test ermitteln.

16 METHODENVERGLEICH

Der Adiponectin (Human) ELISA (EIA-4574) wurde mit zwei anderen kommerziellen Immuntests verglichen. Die jeweils gemessenen 38 Proben ergaben folgende Korrelationen:

Vergleich ELISA 1 versus EIA-4574:

$$y = 0.8476x - 1.3736, R^2 = 0.9135, n = 38$$

Vergleich ELISA 2 versus EIA-4574:

$$y = 1.0034x + 0.0068, R^2 = 0.938, n = 38$$

Ein Adiponectin (Human) ELISA, High Sensitivity (Sandwich ELISA) wurde mit dem Adiponectin (Human) ELISA (einem kompetitiven ELISA, EIA-4574) verglichen. Die Messung von 33 Serumproben ergab folgende Korrelation:

High Sensitivity ELISA versus EIA-4574:

$$y = 0.9346x + 1.3619, R^2 = 0.9119, n = 33$$

17 FEHLERBEHEBUNG UND HÄUFIGE FRAGEN (FAQS)

Schwaches Signal in allen Vertiefungen

Mögliche Erklärung:

- Ein Reagenz oder Arbeitsschritt wurde ausgelassen
- Falsche Vorbereitung oder Lagerung eines Reagenz
- Der Test wurde durchgeführt, bevor alle Reagenzien Raumtemperatur erreicht hatten
- Es wurde bei einer falschen Wellenlänge gemessen

Starkes Signal und Hintergrund in allen Vertiefungen

Mögliche Erklärung:

- Falsches oder unzureichendes Waschen
- Überentwicklung: Die Inkubationszeit mit der Substratlösung vor Zugabe der Stopplösung sollte verkürzt werden
- Inkubationstemperatur über 30 °C

Hoher Variationskoeffizient (CV)

Mögliche Erklärung:

- Falsches oder unzureichendes Waschen
- Unzureichendes Mischen von Standards, Kontrollseren oder Proben

18 REFERENCES/LITERATURE / LITERATUR

- Zhu W, Cheng KK, Vanhoutte PM, Lam KS, Xu A. Vascular effects of adiponectin: molecular mechanisms and potential therapeutic intervention. *Clin Sci (Lond)*. 2008 Mar;114(5):361-74.
- Takemura Y, Walsh K, Ouchi N. Adiponectin and cardiovascular inflammatory responses. *Curr Atheroscler Rep*. 2007 Sep;9(3):238-43.
- Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N. The physiological and pathophysiological role of adiponectin and adiponectin receptors in the peripheral tissues and CNS. *FEBS Lett*. 2008 Jan 9;582(1):74-80. Epub 2007 Dec 3.
- Wang ZV, Scherer PE. Adiponectin, cardiovascular function, and hypertension. *Hypertension*. 2008 Jan;51(1):8-14. Epub 2007 Nov 12.
- Behre CJ. Adiponectin, obesity and atherosclerosis. *Scand J Clin Lab Invest*. 2007;67(5):449-58.
- Whitehead JP, Richards AA, Hickman IJ, Macdonald GA, Prins JB. Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab*. 2006 May;8(3):264-80.
- Berner HS, Lyngstadaas SP, Spahr A, Monjo M, Thommesen L, Drevon CA, Syversen U., Reseland J.E.: Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells. *Bone* 2004; 35: 842-849
- Takahashi T, Zhu SJ, Sumino H, Saegusa S, Nakahashi T, Iwai K, Morimoto S, Kanda T: Inhibition of cyclooxygenase-2 enhances myocardial damage in a mouse model of viral myocarditis. *Life Sci* 2005
- Blüher M, Fasshauer M, Kralisch S, Schön MR, Krohn K, Paschke R: Regulation of adiponectin receptor R1 and R2 gene expression in adipocytes of C57BL/6 mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329: 1127-1132
- Pilz S, Maerz W, Weihrauch G, Sargsyan K, Almer G, Nauck M, Boehm BO, Winkelmann BR, Mangge H: Adiponectin serum concentrations in men with coronary artery disease: The Ludwigshafen Risk in Cardiovascular Health (LURIC) study. *Clin Chim Acta* 2005
- Haluzik M, Colombo C, Gavrilo O, Chua S, Wolf N, Chen M, Stannard B, Dietz KR, Le Roith D, Reitman ML. Genetic background (C57BL/6J versus FVB/N) strongly influences the severity of diabetes and insulin resistance in ob/ob mice. *Endocrinology* 2004; 145: 3258-3264
- Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Sato K, Inoue T, Funahashi T, Walsh K. Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2004; 279: 1304-1309
- Ishikawa Y, Akasaka Y, Ishii T, Yoda-Murakami M, Choi-Miura NH, Tomita M, Ito K, Zhang L, Akishima Y, Ishihara M, Muramatsu M, Taniyama M. Changes in the distribution pattern of gelatin-binding protein of 28 kDa (adiponectin) in myocardial remodelling after ischaemic injury. *Histopathology*. 2003; 42: 43-52
- Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, Hara K, Hada Y, Vasseur F, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem*. 2003; 278: 40352-40363
- Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 2003; 423: 762-769
- Combs TP, Pajvani UB, Berg AH, Lin Y, Jelicks LA, Laplante M, Nawrocki A, Rajala MW, Parlow AF, Cheeseboro L, Ding Y, Russell RG, Lindemann D, Hartley A, Baker GR, Obici S, Deshaies Y, Ludgate ME, Rossetti L, Scherer PE. A transgenic mouse with deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. *Endocrinology* 2003
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K, Uchida S, Ito Y, Takakuwa K, Matsui J, Takata M, Eto K, Terauchi Y, Komeda K, Tsunoda M, Murakami K, Ohnishi Y, Naitoh T, Yamamura K, Ueyama Y, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T. Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem*. 2003; 278: 2461-2468
- Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schulthess T, Engel J, Brownlee M, Scherer PE. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem*. 2003; 278: 9073-9085
- Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet*. 2003; 361: 226-228
- Kondo H, Shimomura I, Matsukawa Y, Kumada M, Takahashi M, Matsuda M, Ouchi N, Kihara S, Kawamoto T, Sumitsuji S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Association of adiponectin mutation with type 2 diabetes: a candidate gene for the insulin resistance syndrome. *Diabetes*. 2002; 51: 2325-2328
- Wang Y, Xu A, Knight C, Xu LY, Cooper GJ. Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin. Potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity. *J Biol Chem*. 2002; 277: 19521-19529
- Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med*. 2001; 7: 947-953
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama – Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilu O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai

- R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med.* 2001; 7: 941-946
- Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets - Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 2005-2010
 - Das K, Lin Y, Widen E, Zhang Y, Scherer PE. Chromosomal localization, expression pattern, and promoter analysis of the mouse gene encoding adipocyte-specific secretory protein Acrp30. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 280: 1120-1129
 - Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 257: 79-83
 - Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (adipose most abundant gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 221: 286-289
 - Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev.* 2005 May;26(3):439-51. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem.* 1995; 270: 26746-26749
 - Marinoni E, Letizia C, Ciardo F, Corona G, Moscarini M, Di Iorio R. Effects of prenatal betamethasone administration on leptin and adiponectin concentrations in maternal and fetal circulation. *Am J Obstet Gynecol.* 2008 Aug;199 (2):141.e1-6
 - Serelis J, Kontogianni MD, Katsiogiannis S, Bletsis M, Tektonidou MG, Skopouli FN. Effect of anti-TNF treatment on body composition and serum adiponectin levels of women with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2008 Jun;27 (6):795-7
 - Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Pastor C, Rotellar F, Silva C, Rodriguez A, Gil MJ, Cienfuegos JA, Salvador J, Vendrell J, Fruhbeck G. Influence of morbid obesity and insulin resistance on gene expression levels of AQP7 in visceral adipose tissue and AQP9 in liver. *Obes Surg.* 2008 Jun;18 (6):695-701
 - Polak J, Kovacova Z, Holst C, Verdich C, Astrup A, Blaak E, Patel K, Oppert JM, Langin D, Martinez JA, Sorensen TI, Stich V. Total adiponectin and adiponectin multimeric complexes in relation to weight loss-induced improvements in insulin sensitivity in obese women: the NUGENOB study. *Eur J Endocrinol.* 2008 Apr;158 (4):533-41
 - Vaverkova H, Karasek D, Novotny D, Jackuliakova D, Halenka M, Lukes J, Frohlich J. Positive association of adiponectin with soluble vascular cell adhesion molecule sVCAM-1 levels in patients with vascular disease or dyslipidemia. *Atherosclerosis.* 2008 Apr;197 (2):725-31
 - Golledge J, Jayalath R, Oliver L, Parr A, Schurgers L, Clancy P. Relationship between CT anthropometric measurements, adipokines and abdominal aortic calcification. *Atherosclerosis.* 2008 Mar;197 (1):428-34
 - Benedict C, Kern W, Schultes B, Born J, Hallschmid M. Differential sensitivity of men and women to anorexigenic and memory-improving effects of intranasal insulin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Apr;93 (4):1339-44
 - Chalvatzas N, Dafopoulos K, Kosmas G, Kallitsaris A, Pournaras S, Messinis IE. Effect of ovarian hormones on serum adiponectin and resistin concentrations. *Fertil Steril.* 2008 Mar 4;
 - Schnabel R, Messow CM, Lubos E, Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Bickel C, Sinning C, Tzikas S, Keller T, Genth-Zotz S, Lackner KJ, Munzel TF, Blankenberg S. Association of adiponectin with adverse outcome in coronary artery disease patients: results from the AtheroGene Study. *Eur Heart J.* 2008 Mar;29 (5):649-57
 - Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Rodriguez A, Silva C, Rotellar F, Gil MJ, Cienfuegos JA, Salvador J, Fruhbeck G. Expression of caveolin-1 in human adipose tissue is upregulated in obesity and obesity-associated type 2 diabetes mellitus and related to inflammation. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008 Feb;68 (2):213-9
 - Lamounier-Zepter V, Bornstein SR, Kunes J, Zicha J, Krsek M, Ehrhart-Bornstein M, Ziegler CG, Kiessling A, Funk RH, Haluzik M. Adrenocortical changes and arterial hypertension in lipoatrophic A-ZIP/F-1 mice. *Mol Cell Endocrinol.* 2008 Jan 2;280 (1-2):39-46
 - Avignon A, Sultan A, Piot C, Mariano-Goulart D, Thuan Dit Dieudonne JF, Cristol JP, Dupuy AM. Osteoprotegerin: a novel independent marker for silent myocardial ischemia in asymptomatic diabetic patients. *Diabetes Care.* 2007 Nov;30 (11):2934-9
 - Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Ramirez B, Rotellar F, Pastor C, Silva C, Rodriguez A, Gil MJ, Cienfuegos JA, Fruhbeck G. Proinflammatory cytokines in obesity: impact of type 2 diabetes mellitus and gastric bypass. *Obes Surg.* 2007 Nov;17 (11):1464-74
 - Cabre A, Lázaro I, Girona J, Manzanares J, Marimon F, Plana N, Heras M, Masana L. Retinol-binding protein 4 as a plasma biomarker of renal dysfunction and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *J Intern Med.* 2007 Oct;262 (4):496-503

- Gomez-Ambrosi J, Catalan V, Ramirez B, Rodriguez A, Colina I, Silva C, Rotellar F, Mugueta C, Gil MJ, Cienfuegos JA, Salvador J, Fruhbeck G . Plasma osteopontin levels and expression in adipose tissue are increased in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* . Sep;92(9):3719-27 (2007)
- Westphal S, Borucki K, Taneva E, Makarova R, Luley C. Extended-release niacin raises adiponectin and leptin. *Atherosclerosis*. 2007 Aug;193 (2):361-5
- Saely CH, Risch L, Hoefle G, Rein P, Muendlein A, Marte T, Aczel S, Langer P, Drexel H . Low serum adiponectin is independently associated with both the metabolic syndrome and angiographically determined coronary atherosclerosis. *Clin Chim Acta* . Aug;383(1-2):97-102 (2007)
- Vitkova M, Klimcakova E, Kovacikova M, Valle C, Moro C, Polak J, Hanacek J, Capel F, Viguerie N, Richterova B, Bajzova M, Hejnova J, Stich V, Langin D . Plasma levels and adipose tissue messenger ribonucleic acid expression of retinol-binding protein 4 are reduced during calorie restriction in obese subjects but are not related to diet-induced changes in insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* . Jun;92(6):2330-5 (2007)
- Otto C, Otto B, Frost RJ, Vogeser M, Pfeiffer AF, Spranger J, Parhofer KG. Short-term therapy with atorvastatin or fenofibrate does not affect plasma ghrelin, resistin or adiponectin levels in type 2 diabetic patients with mixed hyperlipoproteinaemia. *Acta Diabetol*. 2007 Jun;44 (2):65-8
- Moro C, Klimcakova E, Lolmede K, Berlan M, Lafontan M, Stich V, Bouloumie A, Galitzky J, Arner P, Langin D . Atrial natriuretic peptide inhibits the production of adipokines and cytokines linked to inflammation and insulin resistance in human subcutaneous adipose tissue. *Diabetologia* . May;50(5):1038-47 (2007)
- Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Rotellar F, Silva C, Gil MJ, Rodriguez A, Cienfuegos JA, Salvador J, Fruhbeck G . The obestatin receptor (GPR39) is expressed in human adipose tissue and is down-regulated in obesity-associated type 2 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf)* . Apr;66(4):598-601 (2007)
- Shin MJ, Kang SM, Jang Y, Lee JH, Oh J, Chung JH, Chung N. Serum retinol binding protein 4 levels are associated with serum adiponectin levels in non-diabetic, non-obese subjects with hypercholesterolemia. *Clin Chim Acta*. 2007 Mar;378 (1-2):227-9
- Risch L, Saely C, Hoefle G, Rein P, Langer P, Gouya G, Marte T, Aczel S, Drexel H. Relationship between glomerular filtration rate and the adipokines adiponectin, resistin and leptin in coronary patients with predominantly normal or mildly impaired renal function. *Clin Chim Acta*. 2007 Feb;376 (1-2):108-13
- Dieplinger B, Poelz W, Haltmayer M, Mueller T. Association of adiponectin and amino terminal proBNP in peripheral arterial disease. *Clin Chim Acta*. 2007 Feb;377 (1-2):192-7
- Mojiminiyi OA, Abdella NA, Al Arouj M, Ben Nakhi A. Adiponectin, insulin resistance and clinical expression of the metabolic syndrome in patients with Type 2 diabetes. *Int J Obes (Lond)*. 2007 Feb;31 (2):213-20
- Delfini E, Petramala L, Caliumi C, Cotesta D, De Toma G, Cavallaro G, Panzironi G, Diacinti D, Minisola S, D'Erasmus E, Mazzuoli GF, Letizia C . Circulating leptin and adiponectin levels in patients with primary hyperparathyroidism. *Metabolism* . Jan;56(1):30-6 (2007)
- Bobbert T, Wegewitz U, Brechtel L, Freudenberg M, Mai K, Mohlig M, Diederich S, Ristow M, Rochlitz H, Pfeiffer AF, Spranger J. Adiponectin oligomers in human serum during acute and chronic exercise: relation to lipid metabolism and insulin sensitivity. *Int J Sports Med*. 2007 Jan;28 (1):1-8
- Risch L, Guenter H, Saely C, Berchthold S, Weber M, Gouya G, Rein P, Langer P, Marte T, Aczel S, Drexel H . Evaluation of two fully automated novel enzyme-linked immunosorbent assays for the determination of human adiponectin in serum. *Clin Chim Acta* . Nov;373(1-2):121-6 (2006)
- Pilz S, Mangge H, Wellnitz B, Seelhorst U, Winkelmann BR, Tiran B, Boehm BO, Marz W . Adiponectin and mortality in patients undergoing coronary angiography. *J Clin Endocrinol Metab* . Nov;91(11):4277-86 (2006)
- Bersinger NA, Birkhauser MH, Wunder DM . Adiponectin as a marker of success in intracytoplasmic sperm injection/embryo transfer cycles. *Gynecol Endocrinol* . Sep;22(9):479-83 (2006)
- Baranova A, Gowder SJ, Schlauch K, Elariny H, Collantes R, Afendy A, Ong JP, Goodman Z, Chandhoke V, Younossi ZM. Gene expression of leptin, resistin, and adiponectin in the white adipose tissue of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Obes Surg*. 2006 Sep;16 (9):1118-25
- Senolt L, Pavelka K, Housa D, Haluzik M . Increased adiponectin is negatively linked to the local inflammatory process in patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine* . Sep;35(5-6):247-52 (2006)
- Giri S, Rattan R, Hag E, Khan M, Yasmin R, Won JS, Key L, Singh AK, Singh I . AICAR inhibits adipocyte differentiation in 3T3L1 and restores metabolic alterations in diet-induced obesity mice model. *Nutr Metab (Lond)* . Aug 10;3:31 (2006)
- Shin MJ, Lee JH, Jang Y, Park E, Oh J, Chung JH, Chung N : Insulin resistance, adipokines, and oxidative stress in nondiabetic, hypercholesterolemic patients: leptin as an 8-epi-prostaglandin F2alpha determinant. *Metabolism* . Jul;55(7):918-22 (2006)
- Stejskal D, Proskova J, Solichova P. Adiponectin added into the plasma of healthy probands does not affect platelet aggregability. *Biomed Pap Med Fac Univ Palack*. 2006 Jul;150 (1):89-90
- von Eynatten M, Hamann A, Twardella D, Nawroth PP, Brenner H, Rothenbacher D . Relationship of adiponectin with markers of systemic inflammation, atherogenic dyslipidemia, and heart failure in patients with coronary heart disease. *Clin Chem* . May;52(5):853-9 (2006)

- Weickert MO, Mohlig M, Schofl C, Arafat AM, Otto B, Viehoff H, Koebnick C, Kohl A, Spranger J, Pfeiffer AF. Cereal fiber improves whole-body insulin sensitivity in overweight and obese women. *Diabetes Care* . Apr;29(4):775-80 (2006)
- Otto C, Otto B, Goke B, Pfeiffer AF, Lehrke M, Vogeser M, Spranger J, Parhofer KG . Increase in adiponectin levels during pioglitazone therapy in relation to glucose control, insulin resistance as well as ghrelin and resistin levels. *J Endocrinol Invest* . Mar;29(3):231-6 (2006)
- Mohlig M, Freudenberg M, Bobbert T, Ristow M, Rochlitz H, Weickert MO, Pfeiffer AF, Spranger J . Acetylsalicylic acid improves lipid-induced insulin resistance in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* . Mar;91(3):964-7 (2006)
- Pilz S, Maerz W, Weihrauch G, Sargsyan K, Almer G, Nauck M, Boehm BO, Winkelmann BR, Mangge BR . Adiponectin serum concentrations in men with coronary artery disease: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study. *Clin Chim Acta* . Feb;364(1-2):251-5 (2006)
- Karaduman M, Sengul A, Oktenli C, Pekel A, Yesilova Z, Musabak U, Sanisoglu SY, Gunay C, Baysan O, Kocar IH, Tatr H, Ozata M . Tissue levels of adiponectin, tumour necrosis factor-alpha, soluble intercellular adhesion molecule-1 and heart-type fatty acid-binding protein in human coronary atherosclerotic plaques. *Clin Endocrinol (Oxf)* . Feb;64(2):196-202 (2006)
- Spranger J, Verma S, Gohring I, Bobbert T, Seifert J, Sindler AL, Pfeiffer A, Hileman SM, Tschop M, Banks WA . Adiponectin does not cross the blood-brain barrier but modifies cytokine expression of brain endothelial cells. *Diabetes* . Jan;55(1):141-7 (2006)
- Chu MC, Cosper P, Orio F, Carmina E, Lobo RA. Insulin resistance in postmenopausal women with metabolic syndrome and the measurements of adiponectin, leptin, resistin, and ghrelin. *Am J Obstet Gynecol*. 2006 Jan;194 (1):100-4
- Dieplinger B, Poelz W, Haltmayer M, Mueller T . Hypoadiponectinemia is associated with symptomatic atherosclerotic peripheral arterial disease. *Clin Chem Lab Med* . 44(7):830-3 (2006)
- Tsioufis C, Dimitriadis K, Chatzis D, Vasiliadou C, Tousoulis D, Papademetriou V, Toutouzas P, Stefanadis C, Kallikazaros I . Relation of microalbuminuria to adiponectin and augmented C-reactive protein levels in men with essential hypertension. *Am J Cardiol* . Oct 1;96(7):946-51 (2005)
- Bobbert A, Rochlitz H, Wegewitz U, Akpulat S, Mai K, Weickert MO, Mohlig M, Pfeiffer AF, Spranger J. Changes of adiponectin oligomer composition by moderate weight reduction. *Diabetes* . Sep;54(9):2712-9 (2005)
- Avignon A, Sultan A, Piot C, Elaerts S, Cristol JP, Dupuy AM . Osteoprotegerin is associated with silent coronary artery disease in high-risk but asymptomatic type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* . Sep;28(9):2176-80 (2005)
- Pilz S, Horejsi R, Moller R, Almer G, Schrnagl H, Stojakovic T, Dimitrova R, Weihrauch G, Borkenstein M, Maerz W, Schauenstein K, Mangge H. Early atherosclerosis in obese juveniles is associated with low serum levels of adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Aug;90 (8):4792-6
- Stejskal D, Ruzicka V, Fanfrdlova G, Kolar V, Bartek J . High adiponectin and TNF-alpha levels in moderate drinkers suffering from liver steatosis: comparison with non drinkers suffering from similar hepatopathy. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* . Jun;149(1):93-9 (2005)
- Bersinger NA, Smarason AK . Pre-eclampsia: increased, unchanged, and decreased serum markers in comparison to healthy third trimester pregnancy. A synopsis. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* . 20: 353-359 (2005)
- Stejskal D, Ruzicka V, Adamovska S, Jurakova R, Proskova J, Jedelsky L, Bartek J . Adiponectin concentrations as a criterion of metabolic control in persons with type 2 diabetes mellitus?. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* . Dec;147(2):167-72 (2003)
- Stejskal D, Bartek J . Adiponectin in patients with various stages of coronary heart disease - comparison of its concentration in coronary arteries and peripheral venous circulation. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* . Dec;147(2):161-6 (2003)

19 PLATE LAYOUT

12								
11								
10								
9								
8								
7								
6								
5								
4								
3								
2								
1								
	A	B	C	D	E	F	G	H

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
IVD	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Diagnostica in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostic in vitro
REF	Catalogue number *	Artikelnummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence
LOT	Batch code *	Chargencode *	Lotto no	Número de lote	No. de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
RUO	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité