Українська

Інструкція з використання

Адипонектин ІФА

Імуноферментний аналіз для кількісного вимірювання адипонектину людини в сироватці та плазмі людини

REF **30126762**

Σ **96**

2-8°C

EU: IVD CE

I B L I N T E R N A T I O N A L G M B H

Flughafenstrasse 52a
D-22335 Гамбург, Німеччина
Телефон: +49 (0)40-53 28 91-0
Факс: +49 (0)40-53 28 91-11
IBL@IBL-International.com
www.IBL-International.com

Уповноважений представник: ТОВ «АЙ ВІ СЕТ», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@ivset.ua www.ivset.ua

Адипонектин ІФА	**96 визначень**
Принцип аналізу	Імуноферментний аналіз
Тривалість (інкубаційний період)	1,75 год
Антитіла	Моноклональні антитіла
Буфер	Готовий до використання та 20 кратно концентрований
стандарт	5 одиничних стандартів: 2 - 100 мкг / л, рідний адипонектин людини
Діапазон аналізу	0,27-31000 мкг/л
Контроль	2 контрольні сироватки,ліофілізовані
зразок	Людська сироватка/плазма
Необхідний об'єм зразка	10 мкл
Розведення зразка	1:310
Аналітична чутливість	$ø \leq 0.27$ мкг/л
В-/між аналізами варіабельність	$ø<10\%$
Референтні значення	Langkamp M, Pridzun P, Böttner A, Kiess W, Thiery J, Kratzsch J, Reference Intervals for Adiponectin Levels in Human Serum. 2005 DGKL Annual Meeting Jena.

1. ВИКОРИСТАННЯ ЗА ПРИЗНАЧЕННЯМ

Адипонектин ІФА призначений для кількісного вимірювання адипонектину людини в зразках сироватки та плазми людини.

2 ВСТУП

Адипонектин - це білок 30 кДа, відсоток його в сироваткових білках становить 0,01%. В основному синтезується адипоцитами, але також м'язові клітини та гепатоцити мають здатність синтезувати адипонектин. Він складається з колаген-подібного N-терміналу та сферичного С-кінцевого домену [1]. In vivo Адипонектин з'являється з різними олігомерами. Поряд з тримером та дитримером також існують високомолекулярні мультимери [1-3]. Відомо два різних рецептори, обидва рецептори експресуються повсюдно, хоча і розподіл в тканинах різниться. Адипонектиновий рецептор 1 (AdipoR1) особливо в м'язах і АдипоР2 в тканині печінки синтезуються [4].

Кілька досліджень показують, що адипонектин негативно співвідноситься з ІМТ, і, таким чином, він може бути актуальним для енергетичного обміну, наприклад, шляхом регулювання окислення жирних кислот. Окрім кореляції з ІМТ, рівень адипонектину пов'язаний з стійкістю до інсуліну [5-7], і так пов'язаний з діабетом II типу. Адипонектин асоціюється також з глюкозо- та ліпометаболізмом [8, 9].

Раніше запропоновану діагностичну цінність високомолекулярної форми адипонектину не було перевірено за допомогою наявної у продажу тестової системи для визначення адипонектину HMW [10].

Блюхер та ін. оцінювали ІФА Адипонектину щодо його діагностичного значення при діагностиці резистентності до інсуліну . Результати аналізу ROC показали площу під кривою 0,92, що вказує на діагностичне значення [10].

Крім того, адипонектин бере участь у запальних процесах [11-15] і внаслідок того важливий для появи артеріосклерозу [4, 5, 16] та коронариту [17, 18], таким чином визначення рівня адипонектину в плазмі може послужити для оцінки ризику ішемічної хвороби [19,
20]. Поряд з цим адипонектин впливає на подальші фізіологічні процеси, наприклад, на ангіогенез [21, 22].

3 ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Адипонектин ІФА - це так званий сендвіч-аналіз, що використовує два специфічні і високо афінні антитіла. Адипонектин у зразках зв'язується з першим антитілом, нанесеним на мікропланшет. На наступному етапі друге специфічне анти-Адипонектин-Антитіло пов'язується в свою чергу з іммобілізованим Адипонектином. Друге антитіло є біотинільованим і застосовуватиметься в суміші зі стрептавідин- пероксидаза-ферментним кон'югатом. У фінальній реакції субстрату поворот кольору буде каталізований кількісно залежно від рівня адипонектину у зразках.

4 Попередження та запобіжні заходи

Тільки для діагностичного використання in vitro. Тільки для професійного використання.

Адипонектин ІФА підходить тільки для діагностики in vitro, а не для внутрішнього застосування у людей і тварин. Дотримуйтесь суворо

протоколу тестування. Використовуйте дійсну версію інструкції, вкладеної в упаковку, що постачається в наборі. Будьте впевнені, що все зрозуміло. IBL не несе відповідальності за будь-які збитки (крім випадків, передбачених статутом), незалежно від того, що завдано,якщо виникає через недотримання наданих інструкцій. Інформаційний лист з безпеки матеріалів доступний на запит.

Не використовуйте очевидно пошкоджені або забруднені мікробами або розлиті матеріали.

Увага: Цей набір містить матеріали людського та / або тваринного походження. Тому всі компоненти та зразки пацієнтів слід розглядати як потенційно інфекційні.

При зберіганні, поводженні та утилізації реагентів набору необхідно використовувати відповідні запобіжні заходи та належну лабораторну практику . Утилізацію компонентів набору слід проводити відповідно до місцевих норм.

Сироватка людини

Наступні компоненти містять сироватку людини:

Контроль 1 і 2 та Стандарти A - E

Джерельна сироватки людини для контрольних сироваток, наданих у цьому наборі, була протестована і виявлено, що не реагує на поверхневий гепатиту-В антиген (HBsAg), вірус гепатиту С (HCV) та вірус 1 та 2 імунодефіциту людини (ВІЛ). Жоден відомий метод не може запропонувати повну безпеку відсутності інфекційних агентів; тому всі компоненти та зразки пацієнта слід розглядати як потенційно інфекційні.

Реагенти CAL A-E, ANTIBODY, DILBUF, WASHBUF

Як консервант містять суміш 5-хлор-2-метил-4-ізотіазолін-3-он та 2-метил-4-ізотіазолін-3-он (<0,015%)

H317 Може викликати алергічну шкірну реакцію.

P280 Носіть захисні рукавички / захисний одяг / захист очей / захист обличчя.

P272 Забруднений робочий одяг не слід випускати з робочого місця.

P261 Уникайте вдихання пилу / диму / газу / туману / пари / бризок.

P333 + P313 При виникненні подразнення шкіри або висипань: зверніться до лікаря.

P302 + P352 ЯКЩО НА КОЖІ: Вимийте великою кількістю мила та води.

P501 Утилізуйте вміст / контейнер відповідно до місцевих / регіональних / національних / міжнародних норм.

Розчин субстрату TMB SUBS

ТМБ-субстрат містить 3,3´, 5,5´ тетраметилбензидину (<0,05%)

H315 Викликає подразнення шкіри.

H319 Викликає серйозне подразнення очей.

H335 Може викликати роздратування дихання.

P261 Уникайте вдихання пилу / диму / газу / туману / пари / бризок.

P305 + P351 + ЯКЩО В ОЧАХ: Обережно промийте водою кілька хвилин.

P338 Зніміть контактні лінзи, якщо вони є і це легко зробити. Продовжуйте полоскання.

ТМБ стоп розчин TMB STOP

Стоп-розчин ТМБ містить 0,2 М сірчану кислоту кислоти (H_2SO_4)

H290 Може бути агресивним для металів.

H314 Викликає сильні опіки шкіри та пошкодження очей.

P280 Носіть захисні рукавички / захисний одяг / захист очей / захист обличчя.

P301 + P330 + ПРИ ПРОКОВТУВАННІ: прополоскати рот.

P331 НЕ викликайте блювоту.

P305 + P351 + ЯКЩО В ОЧАХ: Обережно промийте водою кілька хвилин.

P338 Зніміть контактні лінзи, якщо вони є і це легко зробити. Продовжуйте полоскання.

P309 + P310 ЯКЩО потрапляючи у небезпеку або якщо ви відчуваєте самопочуття: негайно викликайте ЦЕНТР отруєння або лікаря / терапевта.

4.1 Загальні процедури надання першої допомоги:
Контакт зі шкірою: негайно вимийте уражену ділянку, промийте великою кількістю води не менше 15 хвилин. Видаліть забруднені тканини і взуття.
Контакт з очима: У разі потрапляння в очі негайно промийте великою кількістю води не менше 15 хвилин. Для того, щоб упевнитись в
ефективному полосканні поширте повіки.
Поглинання: Після проковтування продукту, якщо постраждалий знаходиться у свідомості, промийте рот великою кількістю води: шукайте можливість негайно звернутися до лікаря за порадою.
5 Зразки

5.1 Тип зразка
Сироватка і плазма
Рівень у плазмі крові та гепарину порівняний. У зразках плазми EDTA- та цитратної були рівні знайдені бл. на 18% нижче, через відносно велику кількість антикоагулянту.

5.2 Збір зразків
Зразок крові для приготування сироватки повинен бути отриманий відповідно до стандартизованої процедури венепункції. Необхідно уникати гемолітичних реакцій.

5.3 Необхідний об'єм зразка: 10 мкл
5.4 Стабільність зразка
У щільно закритих флаконах для зразків
- Зберігання при 20-25 ° C: 2 дні
- Зберігання при -20 ° C: хв. 2 роки
- Цикли заморожування-відтавання макс. 3

Зберігання зразків протягом 2 років при температурі -20 ° C не показало впливу на показник.
Заморожування та розморожування зразків слід звести до мінімуму, три цикли заморожування-відтавання не показали впливу на
вимірювання концентрації адипонектину.
5.5 Вплив
Гемоглобін, тригліцерид та білірубін у зразку не впливають на концентрацію 5 мг / мл, 100 мг / мл і 100 мкг / мл відповідно. Однак використання гемолітичного, ліпемічного або жовтяничного
зразків повинні бути перевірені користувачем.
5.6 Розведення зразків
- Розведення: 1: 310 за допомогою буфера для розведення DILBUF
- Розвести, наприклад, 300 мкл буфера для розведення в пробірках PE- / PP-PP (застосування багатоступінчастого рекомендується для більш великих серій), додайте 10 мкл сироватки або плазми (розведення: 1:31).
- Додайте 900 мкл буфера для розведення в іншу пробірку PE- / PP і 100 мкл спочатку ретельно перемішати перше розведення. Після змішування використовують 2 × 100 мкл з цього розведеного зразка 1: 310 в аналізі.
- Альтернативно, якщо у вас є необхідне технічне обладнання, одно-крокове розведення 1: 301 можливо: Додайте 5 мкл проби до 1,5 мл буфера для розведення.
- Стабільність зразка після розведення зразка: максимум 1 годину при 20-25 ° C.

6 МАТЕРІАЛИ
6.1 Надані матеріали
Перерахованих нижче реагентів достатньо для 96 лунок, включаючи стандартну криву.

MTP	**Мікропланшет, готовий до використання, покритий мишачим анти-адипонектином-антитілом. Розбірні лунки.**	**(8x12) лунок**
CAL A-E LYO	Стандарти, ліофілізовані (рідний адипонектин людини), концентрації наведені на етикетках на флаконах та сертифікаті якості у нг / мл	5x750 мкл
CONTROL 1	Контроль 1, ліофілізований, (сироватка людини), концентрація наведена в сертифікаті якості в нг / мл	1x500 мкл

LYO		
CONTROL 2 LYO	Контроль 2, ліофілізований, (сироватка людини), концентрація наведена в сертифікаті якості в нг / мл	1x500 мкл
ANTIBODY	Антитіло-HRP-кон'югат, готовий до використання, миша-анти-hAdiponectin-антитіло, біотинільоване + стрептавідин пероксидази хрону кон'югат	1x14 мл
DILBUF	Розчинник буфера, готовий до використання	1x125 мл
WASHBUF CONC	Промивний буфер,20 кратний концентрований розчин	1x50 мл
TMB SUBS	ТМБ розчин субстрату, готовий до використання, пероксидази хрону (HRP) субстрат, стабілізований тетраметилбензидину	1x14 мл
TMB STOP	ТМБ стоп розчин, готовий до використання, 0,2 М сірчана кислота.	1x14мл
	Ущільнювальна стрічка для покриття мікропланшету	2x

6.2 Необхідні матеріали, але не надані

- Дистильована або дейонізована вода для розведення промивного буфера (А. Дист.), 950 мл.
- Прецизійні піпетки та багатоканальні піпетки з одноразовими пластиковими наконечниками
- Поліетиленові PE / поліпропіленові PP пробірки для розведення зразків
- Вихровий міксер
- Шейкер мікропланшетів (350 об / хв)
- Вошер мікропланшетів (рекомендується)
- Рідер мікропланшетів ("ІФА-рідер") з фільтром на 450 і ≥590 нм

7 ТЕХНІЧНІ ПРИМІТКИ

Умови зберігання

Зберігайте набір при температурі 2-8 ° С після отримання до закінчення терміну придатності. Ліофілізовані реагенти слід зберігати при температурі –20 ° С після відновлення. Уникайте повторного відтавання та замерзання.

Термін зберігання

Термін зберігання компонентів після первинного відкриття гарантується протягом 4 тижнів, зберігайте невикористані смужки і лунки мікропланшету герметично разом з осушувачем при 2-8 ° С в пакеті-фіксаторі, використовуйте в наданому тримачу. Відновлювані компоненти стандарти А-Е та контролі 1 і 2 повинні зберігатися при температурі –20 ° С (максимум 4 тижні). Для подальшого використання відтайте швидко, але обережно (уникайте підвищення температури над кімнатною температурою та уникайте надмірного вихору). До 3 циклів заморожування-відтавання не впливали на аналіз.
Розведений промивний буфер 1:20 стабільний протягом 4 тижнів при температурі 2-8 ° С.

Приготування реагентів

Перед використанням всі реагенти довести до кімнатної температури (20-25 ° С). Можливі осаджування в буферах перед застосуванням необхідно вирішити шляхом змішування та / або прогрівання. Реагенти з різними номерами лотів не можна змішувати.

Відновлення

Стандарти А - Е та контролі 1 і 2 відновлюються буфером для розведення. Рекомендується тримати відновлені реагенти при кімнатній температурі протягом 15 хвилин, а потім ретельно перемішати, але обережно (піни не повинно бути) за допомогою вихрового міксера .

Розведення

Після відновлення розбавляють контролі 1 і 2 буфером розріджувача в тому ж співвідношенні (1: 310), що і зразок.
Необхідний об'єм буфера для промивання готують шляхом розведення 1:20 отриманого 20-кратного концентрату з водою дистильованою.

Процедура аналізу
При виконанні аналізу, Бланк, стандарти A-E, контролі 1, 2 і зразки повинні бути піпетовані якомога більше (наприклад, <15 хвилин). Щоб уникнути спотворень через різницю в часі інкубації, Антитіла Кон'югат, а також наступний розчин субстрату слід додавати на планшет в тому ж порядку і в той же часовий проміжок, що і зразки. ТМБ стоп-розчин слід додати в планшет в такому ж порядку, як розчин субстрату. Усі визначення (Бланк, Стандарти A-E, Контролі 1, 2 та зразки) повинні бути проаналізовані у двох примірниках. Для оптимальних результатів, точне піпетування та дотримання протоколу рекомендуються.

Інкубація
Інкубація при кімнатній температурі означає: Інкубацію при 20 - 25 ° C. Розчин субстрату, стабілізований H2O2-тетраметилбенцидин, є світлочутливим - зберігають та інкубують у темряві.

Струшування
Етапи інкубації слід проводити із середньою частотою обертання особливо підходящого шейкеру мікропланшетів. Ми рекомендуємо 350 об / хв. Через певні технічні відмінності можуть виникати відхилення, у випадку, якщо частота обертання повинна бути відрегульована. Недостатнє струшування може призвести до неадекватного перемішування розчинів і, отже, до низької оптичної густини, великих коливань та / або помилкових значень, надмірне струшування може призводить до високої оптичної густини та / або помилкових значень.

Промивання
Правильне промивання має основне значення для надійного, надійного та точного виконання тесту. Неповне промивання є поширеним явищем і негативно вплине на результат тесту. Можливими наслідками можуть бути неконтрольовані неспецифічні зміни вимірюваних оптичних густин, що потенційно призводить до помилкових результатів розрахунків досліджуваних зразків. Такі ефекти, як високі фонові значення або великі зміни, можуть свідчити про проблеми з промивання.
Вся промивка повинна виконуватися за допомогою промивного буфера , розведеного до концентрації використання. Об'єм промивання на цикл промивання і лунку повинен бути не менше 300 мкл.
Необхідно враховувати небезпеку поводження з потенційно інфекційним матеріалом.
При використанні **автоматичного вошера мікропланшетів**, відповідні інструкції щодо використання повинні бути ретельно дотримані. Налаштування пристрою, наприклад для геометрії планшетів та передбачених параметрів промивання повинні бути виконані. Дозатор і аспіраційний колектор не повинні дряпати внутрішню поверхню лунки. Положення повинні бути зроблені таким чином, що об'єм залишкової рідини на кожному кроці відсмоктування був мінімізований. Слідом за останньою аспірацією на етапі кожного циклу промивання, це можна контролювати, а можливий залишок рідини потім можна видалити шляхом перевертання планшету та багаторазового натискання на суху не ворсисту абсорбентну тканину.

Ручне промивання - це адекватний альтернативний варіант. Буфер для промивання може видаватися через багатоступеневий пристрій, багатоканальну піпетку або пляшку-шприц. Рідина може бути видалена динамічним хитанням мікропланшету над тазом. Якщо використовуються аспіраційні пристрої, слід подбати про те, щоб внутрішня поверхня лунки не була подряпана. Після кожного етапу промивання решту рідини слід видалити, перевертаючи пластину і багаторазово постукуючи нею об суху не ворсисту абсорбентну тканину.

8 ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Підготовка реагентів		**відновлення**	**розведення**
CAL	**стандарти**	**В 750 мкл буфера для розведення DILBUF**	
CONTROL	**контролі**	**В 500 мкл буфера для розведення DILBUF**	**1:310 з DILBUF**
WASHBUF	**Промивний буфер**		**1:20 з дистильованою водою**
Розведення зразків: буфером для розрідження DILBUF 1: 310			
Перед процедурою аналізу всі реагенти доводять до кімнатної температури 20-25 ° C.			
Процедура аналізу в подвійному визначенні:			

Піпетування	Реагенти	Позиція
100 мкл	Буфер для розведення Бланк DILBUF	A1/A2
100 мкл	Стандарт A (2 нг/мл)	B1/B2
100 мкл	Стандарт B (10 нг/мл)	C1/C2
100 мкл	Стандарт C (30 нг/мл)	D1/D2
100 мкл	Стандарт D (70 нг/мл)	E1/E2
100 мкл	Стандарт E (100 нг/мл)	F1/F2
100 мкл	Контроль 1 (2:310 розведений)	G1/G2
100 мкл	Контроль 2 (1:310 розведений)	H1/H2
100 мкл	Зразок (1:310 розведений)	в решті лунок згідно вимоги
Накрийте лунки ущільнювальною стрічкою.		
Інкубація зразка : 1 год при 20-25 °C, 350 об/хв		
3x300 мкл	Аспірують вміст лунок і промивають 3 x 300 мкл розведеним промивним буфером / лунка	В кожну лунку
100 мкл	Антитіло- HRP кон'югат ANTIBODY	В кожну лунку
Накрийте лунки ущільнювальною стрічкою		
Інкубація: 30 хвилин при 20-25 ° C, 350 об / хв		
3x300 мкл	Аспірують вміст лунок і промивають 3 x 300 мкл розведеним промивним буфером / лунка	В кожну лунку
100 мкл	ТМБ розчин субстрату TMB SUBS	В кожну лунку
Інкубація: 15 хвилин у темряві при 20-25 ° C		
100 мкл	ТМБ розчин субстрату TMB SUBS	В кожну лунку
	Виміряйте поглинання протягом 30 хв при 450 нм при ≥ 590 нм як референтна довжина хвилі	В кожну лунку

9 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Належна лабораторна практика вимагає, щоб контроль було включено до кожного аналізу. Статистично значуща кількість контролів повинна бути проаналізована для встановлення середніх значень та прийнятних діапазонів для забезпечення належного виконання. Результати випробувань справедливі лише в тому випадку, якщо тест був виконаний після інструкції. Крім того, користувач повинен чітко дотримуватися правил НЛП (належної лабораторної практики) або інші застосовних федеральних, державних або місцевих стандартів / законів. Всі стандарти та контролі повинні бути знайдені в межах прийнятного діапазону, як зазначено в сертифікаті QC. Якщо критерії не виконані, пробіг не
дійсний і має бути повтореним. Кожна лабораторія повинна використовувати відомі зразки в якості подальшого контролю.

9.1 Критерії якості

Для оцінки аналізу потрібно, щоб значення поглинання бланка було нижче 0,25, а абсорбція стандарту E повинна бути вище 1,00.

Зразки, які дають більш високі значення поглинання, ніж стандарт E, повинні бути повторно випробувані з

більш високим розведенням.

10 ОЦІНКА РЕЗУЛЬТАТІВ

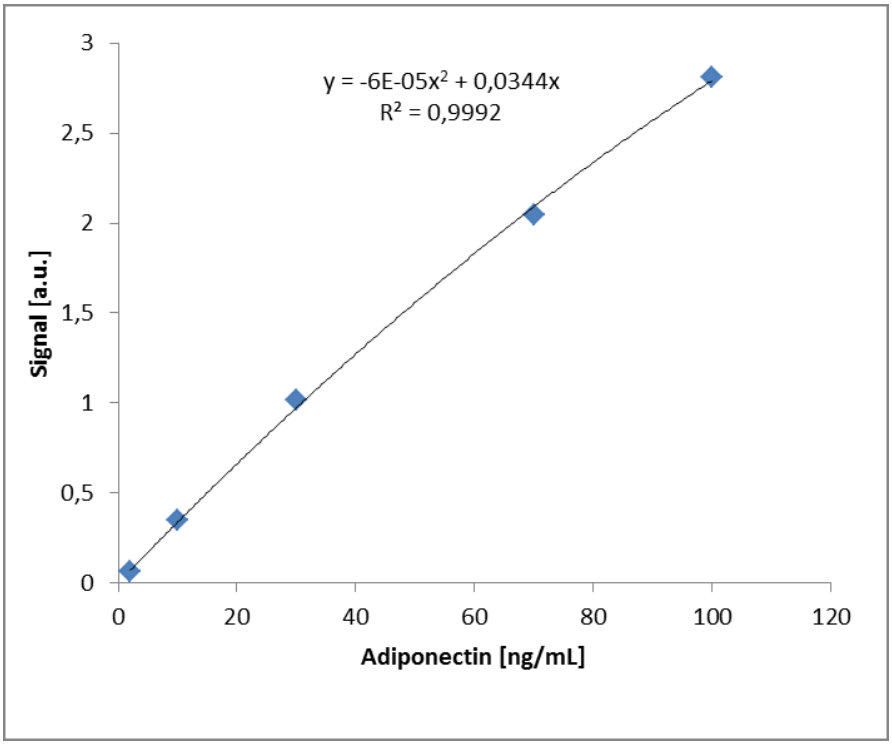
10.1 Встановлення стандартної кривої

стандарт	A	B	C	D	E
Нг/мл	2	10	30	70	100

1) Обчисліть середнє значення поглинання для проби з дубльованого визначення (лунка)A1 / A2).
2) Відняти середнє поглинання бланку від середніх поглинань усіх інших зразків та стандартів
3) Нанесіть стандартні концентрації на осі x проти середнього значення поглинання стандартів на осі y.
4) Рекомендація: Розрахунок стандартної кривої слід проводити за допомогою комп'ютерної програми, тому що крива взагалі (без відповідної трансформації) не ідеально описується лінійною регресією. Поліном вищого ґатунку, або чотири параметричні логістичні (4-PL) кривої відповідності або нелінійна регресія зазвичай підходять для оцінки (як це може бути) сплайн або вирівнювання в точці до точки в окремих випадках).
5) Концентрацію адипонектину в нг / мл зразків та контролі 1 і 2 можна розрахувати шляхом множення з відповідним коефіцієнтом розведення.

2) **10.2 Приклад типової стандартної кривої**
Зразкова показана стандартна крива на малюнку 1 не може бути використана для обчислення результатів тесту.
Ви повинні встановити стандартну криву для кожного проведеного вами тесту!

	бланк	A	B	C	D	E
Нг/мл	0,0	2	10	30	70	100
ОГ (450-620 нм)	0,008	0,071	0,357	1,022	2,053	2,817



10.3 Прикладний розрахунок концентрацій адипонектину

Розведення зразків: 1: 310
Виміряне затухання вашого зразка 0.408
Виміряне затухання бланку 0,008
Ваша програма вимірювання обчислить концентрацію адипонектину в розведеному зразку автоматично, використовуючи різницю зразка та бланка для розрахунку. Ви тільки повинні визначити найбільш підходящу криву відповідності (тут: многочлен 2-го ступеня).

У цьому прикладі наступне рівняння розв'язується програмою для обчислення концентрації адипонектину у зразку:
$0{,}400 = -6 \times 10^{-5}x^2 + 0{,}0344x$
$11{,}89 = x$
Якщо коефіцієнт розведення (1: 310) враховується в концентрації адипонектину в нерозведеному зразку
11,89 x 310 = 3685,9 нг / мл = 3,69 мкг / мл
Приклад стандартної кривої показаний на мал.1 не може бути використаний для обчислення результатів аналізу. Ви повинні встановити стандартну криву для кожного проведеного вами тесту!

10.4 Інтерпретація результатів
Результати аналізів не повинні бути єдиною базою для терапевтичних рішень. Результати повинні інтерпретуватися стосовно анамнезу, подальших клінічних спостережень та результатів інших діагностичних досліджень. Далі рекомендується встановити довідкові та граничні значення, що відповідають відповідній групі пацієнтів для кожної лабораторії.

10.5. Обмеження процедури
Адипонектин ІФА заснований на моноклональних антитілах. Взагалі, ця методика могла бути чутливою до гетерофільних антитіл або ревматичних факторів у зразку. Їх вплив зменшується на дизайн аналізу, але його не можна повністю виключити.

11 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ
Очікувані значення адипонектину в сироватці крові, які визначалися за допомогою ІФА Адипонектину в здорових донорів та проаналізовано проф. д-ром Дж. Крацшем, кафедра лабораторної медицини університету
Лікарня Лейпциг, наведенІ нижче (табл. 1).
Ці дані показують значну кореляцію між значеннями адипонектину-сироватки та віком та статю випадків, в свою чергу, кореляція між відповідними ІМТ здається менш вагомою. У зразках крові новонароджених виявлено дуже високі значення. Кілька різних статистичних аналізів
проводилися з метою адаптації до певних індивідуальних потреб. Найкращі дані можуть бути вибрані відповідно для інтерпретації власних вимірювань.

Таблиця 1a Очікувані значення для дорослих, середнє значення за статтю, а також медіана, 5 і 95. Процентилі представлені.

стать	**кількість**	**Середнє (мкг/мл)**	**Медіана (мкг/мл)**	**Стандартне відхилення**	**5% (мкг/мл)**	**95% (мкг/мл)**
жінки	101	10,2	9,1	4,6	4,0	19,4
чол	125	6,8	6,1	4,1	2,0	13,9
загалом	226	8,3	7,5	4,6	2,4	19,3

Таблиця 1b Очікувані значення для дітей, середнє значення за рівнем статі, а також медіана, 5 і 95. Процентилі представлені.

стать	**кількість**	**Середнє (мкг/мл)**	**Медіана (мкг/мл)**	**Стандартне відхилення**	**5% (мкг/мл)**	**95% (мкг/мл)**
жінки	131	8,71	8,18	4,32	3,05	15,6
чол	134	8,97	8,12	5,13	3,36	18,6
загалом	265	8,84	8,18	4,74	3,33	16,5

Таблиця 1c Очікувані значення для адипонектину, середнього віку, а також медіани 5 і 95. Процентилі представлені.

Вікова группа	кількість	Середнє (мкг/мл)	Медіана (мкг/мл)	5% (мкг/мл)	95% (мкг/мл)
< 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
	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
	226	**8,33**	7,5	2,41	19,29

Таблиця 1d Очікувані значення для адипонектину, віку, а також середньої статі та медіани, ІМТ та 25 років і 75. наводяться відсотки.

Жінки			**Адипонектин (мкг/мл)**			
Вік (років)	**Кіль кість**	**BMI: AV ± SD**	**AV ± SD:**	**медіан**	**Проценти 25-75**	**Мін-макс**
Новонароджені Кордова кров	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

Чоловіки			**Адипонектин (мкг/мл)**			
Вік (років)	**кількість**	**BMI: AV ± SD**	**AV ± SD:**	**медіан**	**Проценти 25-75**	**Мін-макс**
Новонароджені Кордова кров	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 = Кількість випробовуваних AV = Середнє значення IMT = Індекс маси тіла (кг / м²) CB = Стандартне відхилення

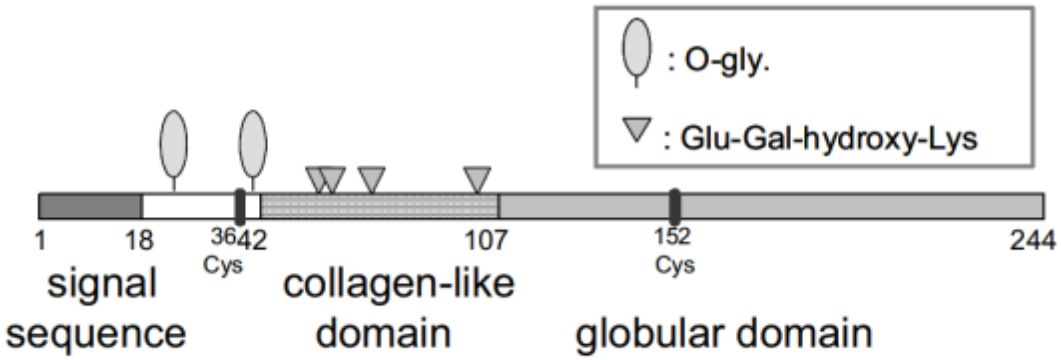
12 ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИКОНАННЯ

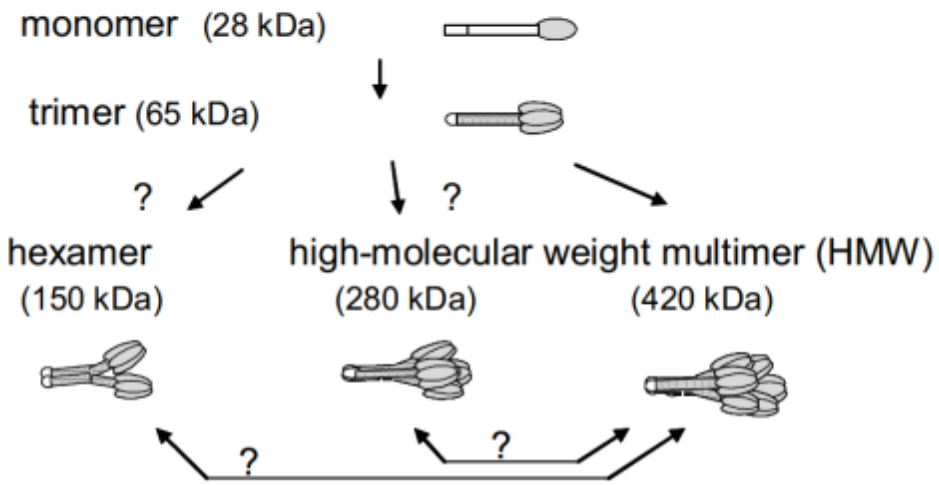
12.1 Чутливість

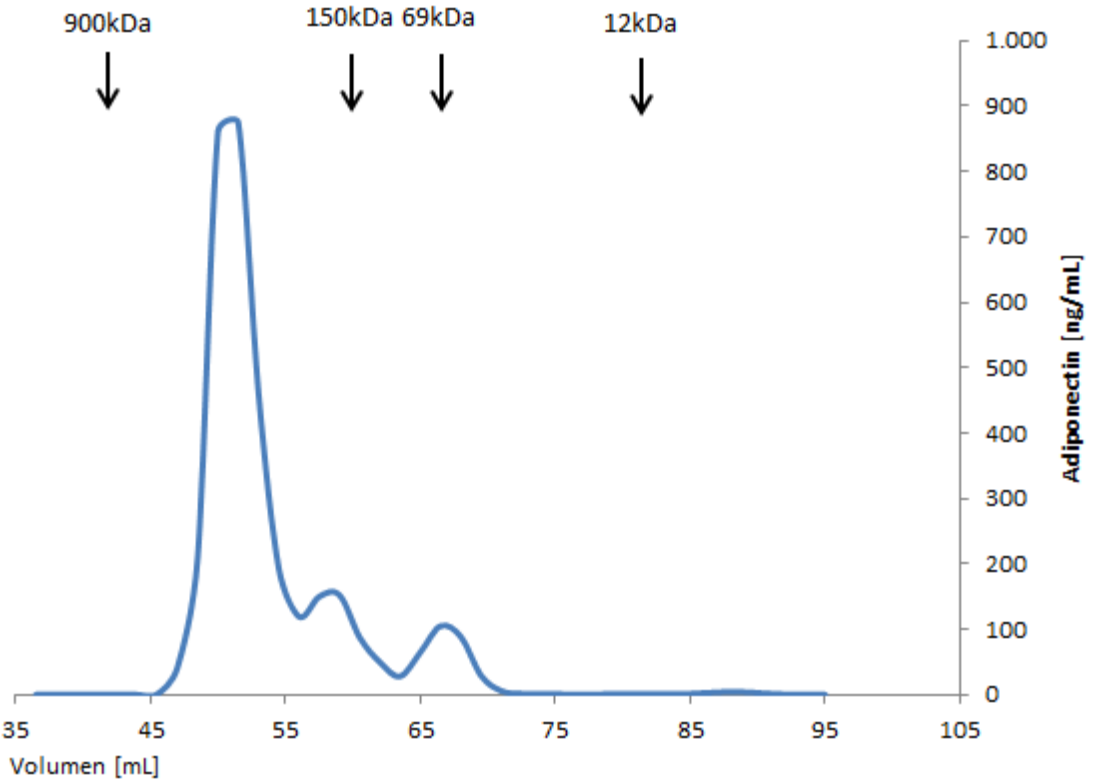
Аналітична чутливість ІФА вимірювалася варіабельністю сигналу нульового стандарту. На основі двократного стандартного відхилення бланка середня аналітична чутливість становить <0,27 нг / мл (діапазон 0,094 до 0,59 нг / мл).

12.2 Специфічність

Адипонектин існує в різних олігомерних формах: формі високої, середньої та низької молекулярної маси. Різні числа мономерів адипонектину агрегуються спеціально для формування комплексу. На малюнку 2а п'ять різних форм адипонектину людини зображено схематично. Паралельно показані результати хроматографії вилучення-виключення людської сироватки крові, виміряні за допомогою Адипонектину ІФА.







Малюнок 2 Структура адипонектину (A) білкової структури адипонектину людини, включаючи посттрансляційні модифікації та мультимерні форми (взяті з Nakano et al1). (B) Результати розділення сироватки методом вилучення-виключення хроматографії. Зразок був фракціонований
Вміст адипонектину кожної фракції вимірювали за допомогою Адипонектин ІФА для порівняння з відповідним

захватом у кДа позначеним чорними стрілками.
Результати, показані на малюнку 2b, наочно демонструють, що ІФА адипонектину виявляє всі форми Адипонектину, присутні у сироватці людини: тример при 65 кДа, гексамер при 150 кДа і високий форми молекулярної маси> 280 кДа. Таким чином, Адипонектин ІФА вимірює загальний адипонектин.

12.3 Точність

В аналізі варіабельність і точність

Варіабельність в аналізі та точність внутрішньої проби показано на прикладі двох зразків. Концентрація адипонектину цих зразків неодноразово вимірювали в одному аналізі.
Таблиця 2 Варіабельність в аналізі. Рекомбінантний адипонектин розводили в буфері розріджувача та адипонектину концентрацію розведення вимірювали повторно протягом одного аналізу.

	Визначення кількість	**Середнє значення (мкг/л)**	**Стандартне відхилення (мкг/л)**	**VC [%]**	Цільове значення [мкг / л]
Зразок 1	8	7,108	0,22	3,14	6
Зразок 2	8	107,96	3,97	3,67	100

В обох зразках варіабельність менше 5%, а відхилення від цільового значення - <20%.

Варіабельність між аналізами

Зразки сироватки неодноразово вимірюються в незалежних аналізах різних партій. В середньому коефіцієнт варіації становив 7,5% (CB 1,6). Результати 5 зразків наведені в таблиці 3.
Таблиця 3 Варіабельність між аналізами

	Зразок 1	**Зразок 2**	**Зразок3**	**Зразок 4**	**Зразок5**
Середнє (мкг/мл)	4,72	5,25	8,36	5,45	22,29
CV [%]	8,16	8,14	6,93	8,05	7,30
кількість	99	68	62	174	62

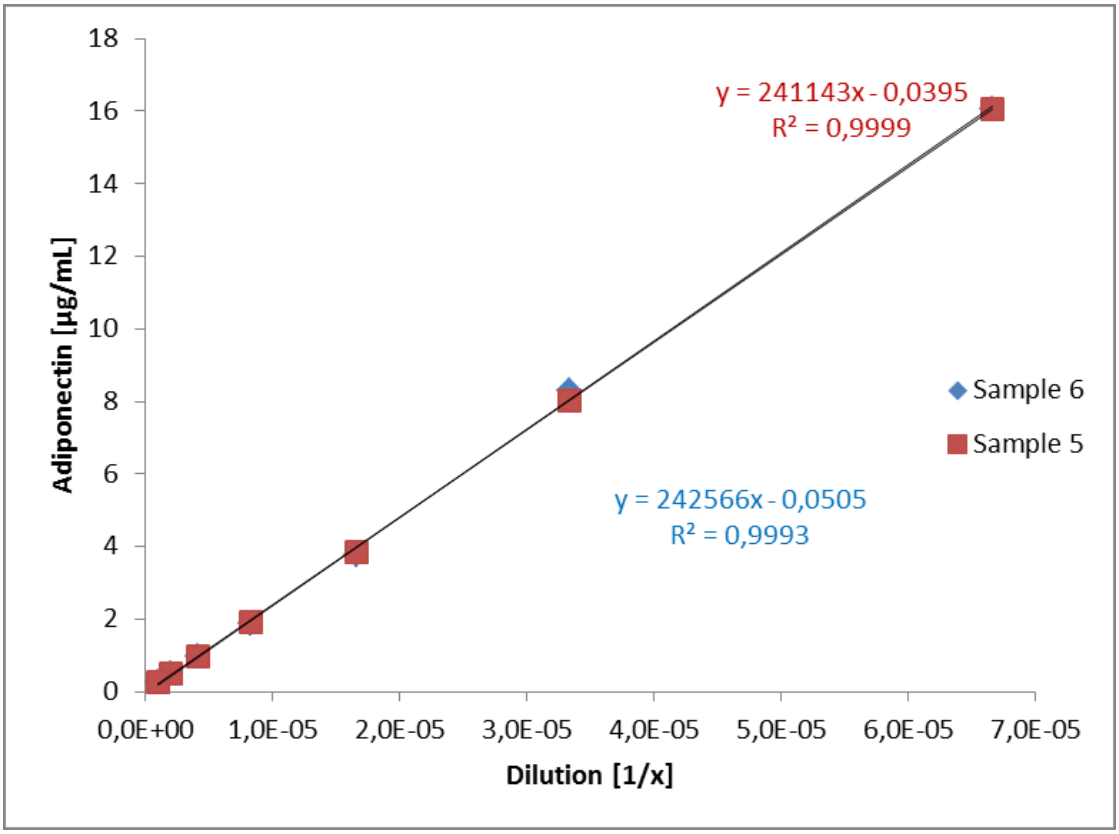
[1] Nakano Y, Tahima S, Yoshimi A, Akiyama H, Tsushima M, Tanioka T, Negoro T, Tomita M, Tobe T: A novel enyme-linked inmmunosorbent assay specific for high-molecular-weight adiponectin. J Lipid Res 2006, 47(7):1572-1582

12.4 Лінійність

Лінійність розведення зразків була перевірена серійним розведенням (1: 100 - 1: 4000) зразків сироватки людини і перерахунок вмісту адипонектину порівняно із середньою концентрацією адипонектину всіх розведень (табл. 4), жоден розведений зразок не показав відхилення> 30%.
Таблиця 4 Лінійність. Зразок сироватки людини розводили в буфері розведення і вміст адипонектину перераховували. Результати вимірювань показані в [мг / л]. Не було виявлено середнього відхилення> 30%.

Мкг/мл	**середнє**	**1:100**	**1:200**	**1:400**	**1:800**	**1:1000**	**1:2000**	**1:4000**
Зразок1	5,76	6,53	6,331	5,764	5,49	6,067	6,114	4,056
Зразок2	11,53	10,93	12,107	11,395	11,454	11,567	12,884	10,362
Зразок3	12,07	13,57	12,853	12,03	11,974	11,338	11,548	11,169
Зразок4	4,89	4,659	4,886	4,384	4,425	5,851	5,13	н/в

Додатково розведення від 1: 1500 до 1: 96000 оцінювали з двома зразками. На малюнку 3 результати показано і продемонстровано, що в аналізованих зразках не можна було виявити ефект розведення на вимірюваній концентрації адипонектину. Відхилення цільової концентрації кожного розведення було менше ніж 30% у всіх розведеннях.



Малюнок 3 Лінійність. Концентрацію адипонектину вимірювали удвох людських зразках, розведених 1: 1500 до 1: 96000.

12.5 Відновлення

Вірність та простежуваність ІФА Адипонектину оцінювали шляхом відновлення рекомбінантного адипонектину в сироватці людини. Відновлення рекомбінантного адипонектину дало в сироватці матрицю на в середньому 110%.

Таблиця 5 Відновлення рекомбінантного адипонектину людини в сироватці крові. Рекомбінантний адипонектин додавали в різну кількість сироватки людини. Виміряли вміст адипонектину у так збагачених зразках і відновлення порівняно з розрахунком збагаченого буфера.

Рекомбінантний R&D нг/мл	**Буфер для розведення нг/мл**	**Сироватка нг/мл**	**Відновлення %**
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 Вплив

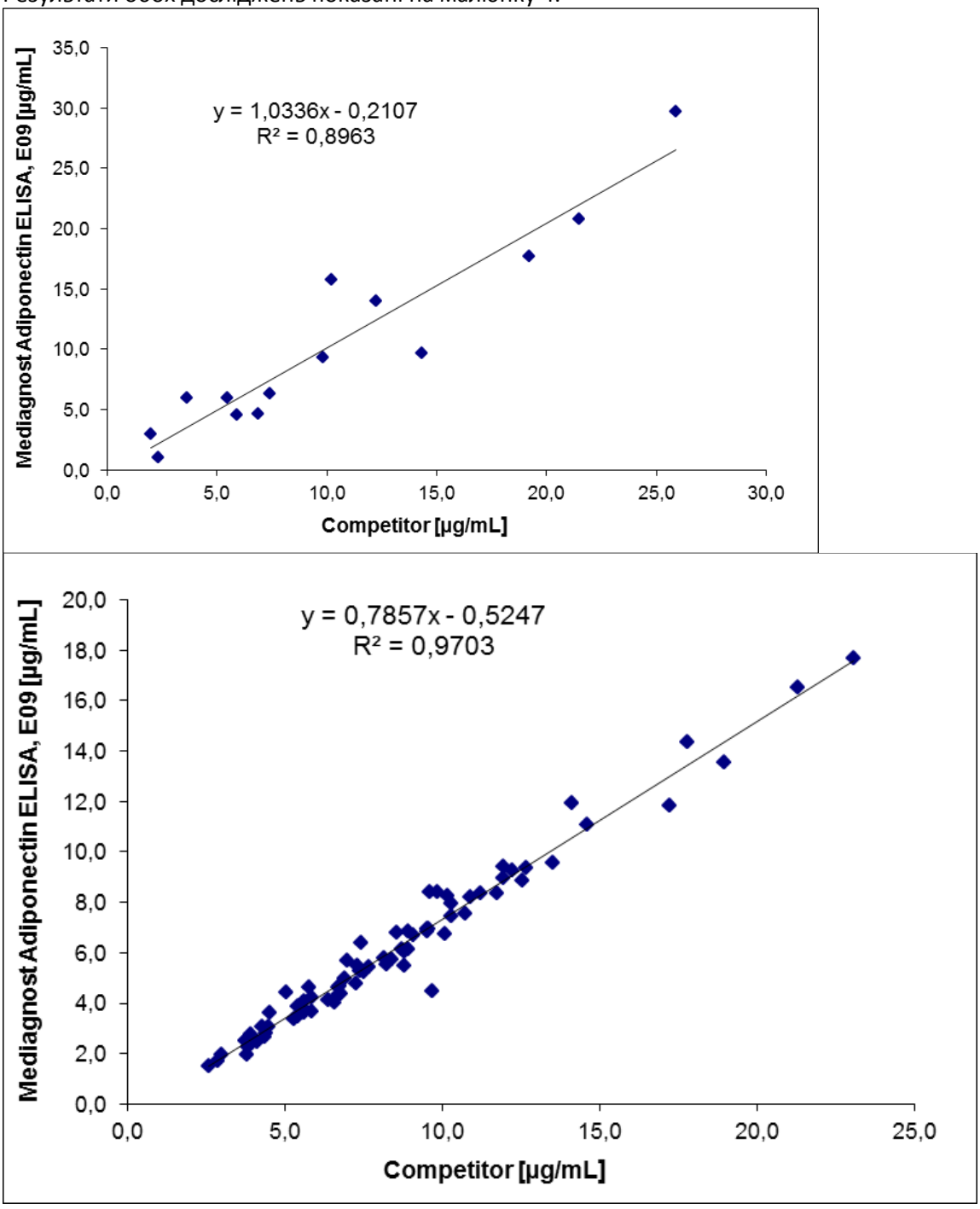
Інтерференцію білірубіну та тригліцеридів випробовували, додаючи до них різні кількості людської сироватки, що містить адипонектин. Для порівняння однакову кількість буфера без будь-якої речовини також додавали в сироватку. У таблиці 6 показано, що ні білірубін, ні тригліцериди, ні гемоглобін не чинять будь-який вплив на вимірювання адипонектину в сироватці людини.

Таблиця 6 Вплив. Зразки сироватки були збагачені різною кількістю тригліцеридів, білірубіну або гемоглобін. Відносна кількість адипонектину вимірювана порівняно з нативною сироваткою показана тут [%].

Тригліцеріди 100 мг/мл	**Білірубін 100 мкг/мл**	**Гемоглобін 1мг/мл**	**Гемоглобін5 мг/мл**
94	96	90	109
90	93	97	-
95	94	93	-

13 ПОРІВНЯННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

Адипонектин ІФА порівнювали з двома різними доступними у продажу тестовими системами. У лінійному регресійному аналізі обох тестів показав хороший коефіцієнт визначення (R2 = 0,896 і R2 = 0,97).
Таким чином, порівнянність результатів між Адипонектин ІФА та іншими тест-системами є можливою.
Залежно від відповідної системи абсолютне відхилення результатів вимірювань різне, але через відмінну кореляцію результати можна порівняти після застосування коефіцієнта.
Результати обох досліджень показані на малюнку 4.



Малюнок 4 Порівняння з наявними у продажу тестовими системами
(зліва) радіоімунологічний аналіз (n = 14) та (праворуч) ІФА (n = 84)
Інструкція щодо використання для наукового застосування

14 НАУКОВЕ ЗАСТОСУВАННЯ

Крім зразків сироватки та плазми адипонектин можна визначити в інших рідинах людського організму і в

супернатантах клітинної культури людських клітинних ліній для дослідницьких цілей.

14.1 Зразки, придатні для наукового застосування

Сироватка, плазма, слина, сеча, грудне молоко та супернатант клітинної культури людини.
Рекомендоване розведення для проб сироватки та плазми в буфері для розведення: (1: 310).
В інших зразках рівні адипонектину можуть суттєво відрізнятися, необхідно знайти оптимальне розведення замовнику.
Таблиця 7 Результати тестових матричних випробувань. Адипонектин додавали до відповідно розведених зразків. Збагачені зразки вимірювали без подальшого розведення. Показано відносне відновлення доданого адипонектину концентрації, виміряної у відповідно збагаченому буфері для аналізу.

Матрикс розведення	**сеча**	**слина**	**Грудне молоко**	**Клітинна культура медіум 10% FCS**	**Клітинна культура медіум**
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 Видова перехресна реакція

Сироватку цитованих видів розбавляли та використовували як зразок у цій системі аналізу. Відсутність сигналу виявлено у сироватці крові наступних видів: Кінь, Корова, Курка, Кролик, Собака, морська свинка, Вівці, Миша, Коза, Осел, Щур, Кіт.
Чи є ця очевидна не-реактивність специфічною для видів, слід оцінювати індивідуально кожному замовнику.

15. ЛІТЕРАТУРА

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 fpr 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.

УМОВНІ ПОЗНАЧЕННЯ

REF	№ Кат.:
LOT	№ Партії:
	Використати до:
	Кількість тестів:
CONC	Концентрат
LYO	Ліофілізований
IVD	Медичний пристрій для діагностики in vitro
	Оціночний набір
	Прочитайте інструкцію перед використанням
	Зберігати поодаль від джерел тепла і прямого сонячного світла.
	Зберігати при температурі:
	Виробник:
	Увага!
Умовні позначення компонентів див. у розділі «Матеріали, що входять до набору».	

СКАРГИ: Первинно скарги можна пред’явити в письмовому вигляді або усно. Згодом необхідно подати їх, включаючи хід дослідження та отримані результати, в письмовому вигляді, з аналітичних міркувань.

ГАРАНТІЯ: Гарантується відсутність у продукті дефектних матеріалів у межах відповідного терміну придатності, а також дотримання специфікацій, поданих разом із продуктом. Продукт слід використовувати за призначенням, відповідно до всіх інструкцій, наведених в інструкції з використання та в межах відповідного терміну придатності продукту. Будь-яка модифікація процедури аналізу, або обміну, або змішування компонентів різних партій може негативно вплинути на результати. Ці випадки анулюють будь-які вимоги про заміну.

ОБМЕЖЕННЯ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ: ЗА БУДЬ-ЯКИХ ОБСТАВИН РІВЕНЬ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ ВИРОБНИКА ОБМЕЖУЄТЬСЯ ЗАКУПІВЕЛЬНОЮ ВАРТІСТЮ ВКАЗАНОГО (-ИХ)НАБОРУ(ІВ) . ЗА ЖОДНИХ УМОВ ВИРОБНИК НЕ МАЄ НЕСТИ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ ЗА ВИПАДКОВІ ЧИ ПОБІЧНІ ЗБИТКИ, У ТОМУ ЧИСЛІ ВТРАТУ ПРИБУТКУ, ВТРАТУ ПРОДАЖ, ТРАВМИ ЛЮДЕЙ ЧИ ПОШКОДЖЕННЯ ВЛАСНОСТІ АБО ІНШІ ВИПАДКОВІ ЧИ НЕПРЯМІ ЗБИТКИ.

IBL International GmbH
Flughafenstr. 52A, 22335 Гамбург, Німеччина

Тел .: + 49 (0) 40 532891 -0 Факс: -11
E-MAIL: IBL@IBL-International.com
WEB: http://www.IBL-International.com

Уповноважений представник: ТОВ «АЙ ВІ СЕТ», 01010,

м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@ivset.ua www.ivset.ua