

Arbeitsanleitung/Manual

Resistin

Zur in vitro Bestimmung von Resistin in Serum und Plasma

For the determination of Resistin in serum and plasma

Gültig ab/valid from 09.02.2009

Artikelnummer/Catalogue No.: K 8029

Packungsgröße/Package size: 96 Tests/96 determinations

Lagerung/Storage: 2-8 °C



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.Immundiagnostik.com

Inhaltsverzeichnis	Seite/Page
1. VERWENDUNGSZWECK	5
2. KLINISCHE BEDEUTUNG	5
3. TESTPRINZIP	5
4. INHALT DER TESTPACKUNG	6
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	6
6. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	7
7. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	7
8. PROBENVORBEREITUNG UND LAGERUNG	8
9. TESTDURCHFÜHRUNG	8
HINWEISE	8
VORINKUBATION	8
PIPETTIERSHEMA	9
10. TESTAUSWERTUNG	10
MUSTEREICHKURVE	10
11. EINSCHRÄNKUNGEN	11
12. QUALITÄTSKONTROLLE	11
ERWARTETE ERGEBNISSE	11
13. TESTCHARAKTERISTIKA	11
NACHWEISGRENZE	11
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12

Table of content	Page
1. INTENDED USE	14
2. CLINICAL IMPORTANCE OF THE TEST	14
3. PRINCIPLE OF THE TEST	14
4. MATERIAL SUPPLIED	15
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	15
6. PRECAUTIONS	16
7. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	16
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	16
9. ASSAY PROCEDURE	17
PROCEDURAL NOTES	17
PREINCUBATION	17
PIPETTING SCHEME	18
10. RESULTS	19
TYPICAL CALIBRATION CURVE	19
11. LIMITATIONS	20
12. QUALITY CONTROL	20
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	20
SENSITIVITY	20
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	21

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von Resistin aus humanem Serum und Plasma geeignet. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

2. KLINISCHE BEDEUTUNG

3. TESTPRINZIP

Dieser Testkit arbeitet nach dem Prinzip eines kompetitiven Enzym-Immunoassays. Das Resistin der Probe konkurriert mit dem Tracer (immobilisiertes Resistin) um die Bindungsstelle des spezifischen Antikörpers.

Im ersten Inkubationsschritt wird Probe bzw. Standard mit dem Antikörper in einem Reaktionsgefäß vorinkubiert. In einem zweiten Inkubationsschritt auf der Mikrotiterplatte konkurrieren der Antigen-Antikörperkomplex mit dem Tracer der Platte um die Bindungsstelle des spezifischen Antikörpers. Anschließend wird gewaschen (ungebundener Antigen-Antikörperkomplex wird entfernt). Über ein Antikörper-Peroxidase/TMB-System wird das Resistin schließlich quantifiziert. Nach Zugabe einer Stopplösung wechselt die Farbe von blau nach gelb. Die Farbentwicklung ist dabei zur nachgewiesenen Analytmenge (Probe bzw. Standard) umgekehrt proportional. Eine Standardkurve wird erstellt, aus der die Konzentrationen ermittelt werden.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Kit Komponenten	Menge
K 8029MTP	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8
K 8029WP	ELISA Waschpuffer 10x	1 x 100 ml
K 8029PV	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 8029AK	Antikörper (Ziege anti-Resistin), gebrauchsfertig	1 x 10 ml
K 8029K	Peroxidase markiertes Konjugat, gebrauchsfertig	1 x 11 ml
K 8029KO1/2/3	Kontrollen 3 Levels	3 x 50 µl
K 8029ST	Standards, lyophilisiert (NSB; 0; 0.08; 0.4; 2; 10; 50 ng/ml)	7 vials
K 8029TMB	TMB Substrat, gebrauchsfertig (Tetramethylbenzidine)	1 x 15 ml
K 8029AC	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 50 - 1000 µl
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Tiefkühltruhe (-20°C)
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenreader mit Filter 450 nm

6. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Reagenzien, die auf Humanserum aufgebaut sind, sind auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter H_2SO_4 . H_2SO_4 ist eine starke Säure und muß auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht behandelt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muß die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

7. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- **Waschpuffer:** Waschpufferkonzentrat (100 ml) auf **1000 ml** mit Wasser auffüllen, gut mischen. Der Waschpuffer ist dann gebrauchsfertig (die Salzkristalle lösen sich gut bei Raumtemperatur/ Wasserbad 37 °C). Der fertige Puffer ist bei 2 - 8 °C 1 Monat haltbar.
Standards: Auflösen in **500 µl** Probenverdünnungspuffer, gut mischen. Um eine vollständige Lösung der rekonstituierten Standards zu gewährleisten müssen sie mindestens **10 min** bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Mischen stehen bleiben.
- **Kontrollen** werden in **500 µl** Probenverdünnungspuffer aufgenommen und bei der Auswertung mit dem **Faktor 10** multipliziert (Bereich auf beigefügtem Datenblatt)
- Alle weiteren Reagenzien (Antikörper, Konjugat, Probenverdünnungspuffer und das Substrat) können bei 2 - 8 °C gelagert werden und bis zum jeweils angegebenen Verfallsdatum verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG UND LAGERUNG

Serum oder Plasma werden bei -20 °C gelagert. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumen sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Der Assay ist immer, nach der im Kit beigefügten, Arbeitsanleitung abzuarbeiten.

Vorinkubation

1. Proben werden **1:10** in Probenverdünnungspuffer verdünnt, z. B.:
20 µl Probe + 180 µl Probenverdünnungspuffer.
2. **150 µl** Standard, Kontrollen oder vorverdünnte Probe in ein Reaktionsgefäß (V-Tube) pipettieren.
3. **150 µl** Antikörper hinzufügen. Gut mischen.
4. **20 – 22 Stunden** bei $2 - 8\text{ °C}$ inkubieren.

Pipettierschema

Die vorbeschichtete Mikrotiterplatte vor Gebrauch **2 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.

Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

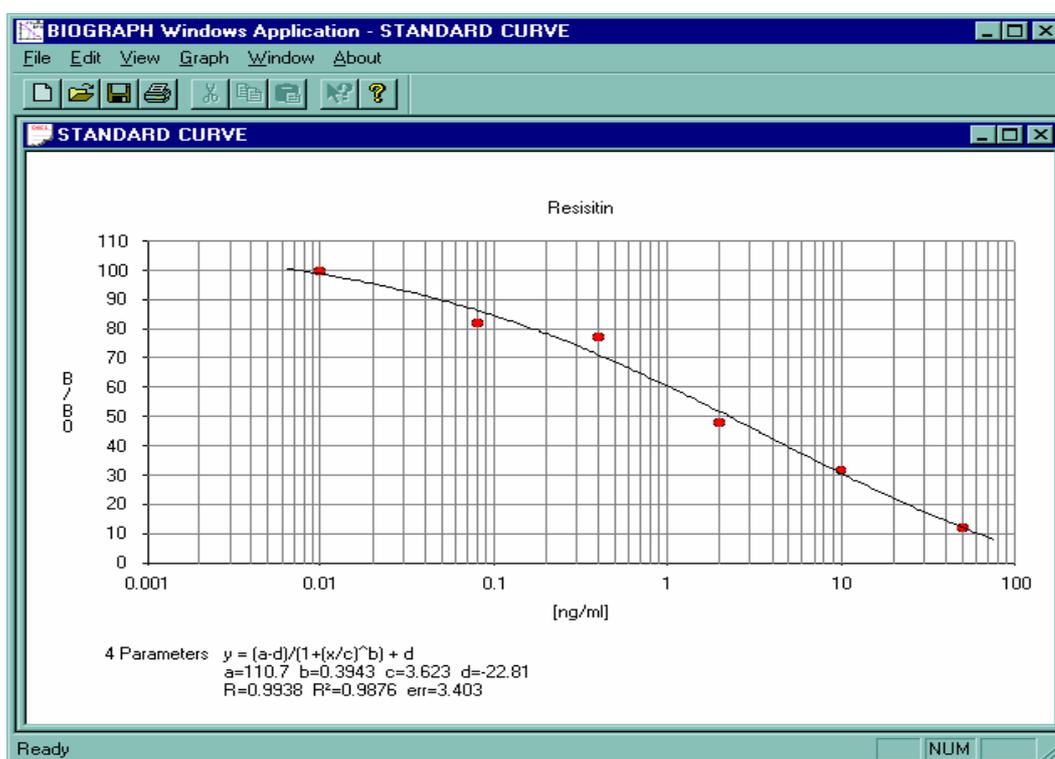
1. **100 µl** des Pre-Inkubates (Proben bzw. Standard + Antikörper) in Doppelwerten in die vorgesehenen Vertiefungen überführen.
2. **2 Stunden** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
3. Inhalt der Vertiefungen verwerfen, Platte auf Zellstoff ausklopfen und anschließend **5 x mit 250 µl** Waschpuffer waschen. Nochmals auf Zellstoff ausklopfen.
4. **100 µl** Konjugat in alle Vertiefungen pipettieren.
5. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
6. Inhalt der Vertiefungen verwerfen, Platte auf Zellstoff ausklopfen und anschließend **5 x mit 250 µl** Waschpuffer waschen. Nochmals auf Zellstoff ausklopfen.
7. **100 µl** Substratlösung (TMB) in alle Vertiefungen pipettieren.
8. **15 - 20 Min.** im Dunkeln bei Raumtemperatur (18-24°C) inkubieren.
9. **50 µl** Stopplösung in alle Vertiefungen pipettieren.
10. Die Extinktion wird **sofort** im Mikrotiterplattenphotometer bei **450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) gemessen. Sollte die Extinktion des Null-Standards den Messbereich des Photometers übersteigen, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

10. TESTAUSWERTUNG

Mit Hilfe der Standardwerte wird eine Eichkurve erstellt. Die Werte für die Proben werden bei der Auswertung mit dem Faktor 10 multipliziert.

Die Eichkurve ist nicht linear. Wir empfehlen eine Punkt-zu-Punkt Auswertung. Die Extinktion der NSB kann bei der Auswertung von den gemessenen Extinktionen abgezogen werden.

Mustereichkurve



Konzentration [ng/ml]	0	0.08	0.4	2.0	10.0	50.0
B/B0 Mittelwert	100	82	77	48	32	12

Die hier aufgeführten Ergebnisse sind ein Beispiel für eine Standardkurve. Sie dürfen nicht für die Auswertung des Assays verwendet werden.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer Konzentration größer dem größten Standard sollten mit Probenverdünnungspuffer verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden.

12. QUALITÄTSKONTROLLE

Erwartete Ergebnisse

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

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

13. TESTCHARAKTERISTIKA

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als 0.068 ng/ml. (B0 + 2SD)

Probe	Resistin Mittelwert [OD]	Standard- abweichung	Detektionslimit [ng/ml]
1	1.952	0.049	0.068

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Falls für die Herstellung der Testkomponenten Humanseren verwendet wurden, sind diese auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befunden worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Testkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid. Natriumazid ist giftig. Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit der Haut oder der Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Alle im Test enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken oder, wenn vermerkt, zur in vitro Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Datums nicht mehr verwendet werden. Einzelkomponenten verschiedener Chargen dürfen nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die, für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik GmbH übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller- der Immundiagnostik GmbH zurück zu senden.

Resistin ELISA Kit

For the determination of Resistin in serum and plasma

Gültig ab/valid from 09.02.2009

Artikelnummer/Catalogue No.: K 8029

Packungsgröße/Package size: 96 Tests/96 determinations

Lagerung/Storage: 2-8 °C



1. INTENDED USE

The Immundiagnostik assay is a sandwich ELISA intended for the quantitative determination of resistin in serum and plasma. For *in vitro* diagnostic use only.

2. CLINICAL IMPORTANCE OF THE TEST

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The resistin test kit is a competitive enzyme immunoassay. The resistin from the sample competes with the tracer (immobilised resistin) for the binding site of the specific antibodies.

In the first step, the sample or the calibrator is preincubated with the antibodies in a reaction vessel. In the second incubation step, the antigen-antibody complex competes with the immobilized tracer for free binding sites of the anti-resistin antibody.

After a washing step, which removes all non-specific bound material, peroxidase-labeled conjugate is added to the wells. After removal of unbound conjugate by washing, tetramethylbenzidine (TMB) is added to the wells as substrate. Resistin is quantitated by an enzyme catalysed colour change detectable on a standard ELISA reader. The colour of the sample changes from blue to yellow after the addition of a stop reagent. The amount of colour developed is inversely proportional to the amount of resistin present in the sample. A calibration curve is drawn up in order to obtain the concentration.

4. MATERIAL SUPPLIED

Catalogue no.	Kit Components	Quantity
K8029MTP	Pre-coated microtiter plate	12 x 8
K8029WP	ELISA washing buffer 10x	100 ml
K8029PV	Sample dilution buffer ready to use	1 x 15 ml
K8029AK	Antibody (goat anti-resistin) ready to use	1 x 10 ml
K8029K	Conjugate, (peroxidase labeled), ready- to-use	1x11 ml
K8029KO/1/2/3	Controls (3 ranges)	3 x 50 µl
K8029ST	Calibrators, lyophilized (NSB; 0; 0.08, 0.4, 2, 10, 50 ng/ml)	7 vials
K8029TMB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K8029AC	ELISA stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Distilled or deionized water
- Precision pipettes with disposable tips calibrated to deliver 50 -1000 µl
- Multichannel or Multipipette
- Centrifuge 3000 x g
- Freezer (-20°C)
- Vortex mixer
- Conventional glass or plastic tubes (disposable articles)
- ELISA reader equipped with 450 nm filter

6. PRECAUTIONS

- Calibrator and controls are based on human serum. They have underwent testing for HIV and HBV and were found to be negative. All components from this test kit should, however, be treated as potentially infectious.
- Stop solution contains diluted sulphuric acid. Sulphuric acid is a strong acid and should be handled with care even when diluted. As sulphuric acid causes burns upon contact with skin, goggles and gloves should be worn. Flush immediately with ample amounts of water after contact.
- Do not use reagents beyond expiration date.

7. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- **Washing buffer:** Dilute washing buffer concentrate to **1000 ml** (add 900 ml of distilled water to 100 ml of concentrate) and mix well. Crystals in the buffer concentrate will dissolve at room temperature or in a water bath (37°C). Buffer is stable for 1 month at 2-8 °C.
- **Calibrators:** Dissolve each vial in **500 µl** sample dilution buffer, mix well. The reconstituted calibrators are to be stirred for at least **10 min.** at room temperature to ensure a complete dissolution.
- **Controls** are dissolved in **500 µl** sample dilution buffer each and their test results multiplied by **10**.
- All the other reagents (antibody, conjugate, sample dilution buffer and the substrate) can be stored at 2-8°C until their respective expiry date.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum or plasma are stored at -20°C. Repeated freezing and thawing must be avoided.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The quality control guidelines should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the manufacturer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the test results. Immundiagnostik can therefore not be held responsible for any damage.
- Perform the assay with the **latest** manual delivered with the kit.

Preincubation

1. Samples are diluted **1:10** with the sample dilution buffer, e.g.:
20 µl sample + 180 µl sample dilution buffer.
2. Pipet **150 µl** calibrator, control or prediluted sample into a reaction vessel (v-tube).
3. Add **150 µl** antibody. Mix well.
4. Incubate for **20-22 hours** at 2-8°C.

Pipetting scheme

The precoated microtiterplate has to be washed **2 times with 250 µl** washing buffer each. After the last washing step, dry by knocking the plates on absorbent tissue paper. All determinations are to be made in duplicate.

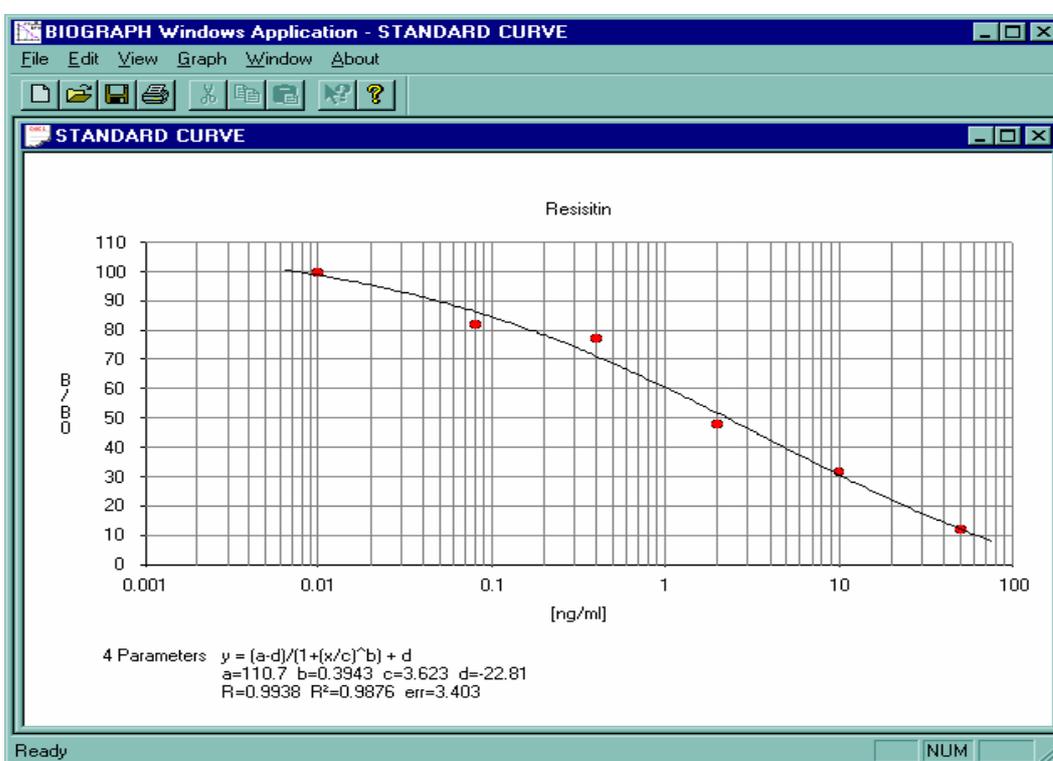
1. Pipet **100 µl** of the preincubate (sample+antibody or calibrator+antibody) in duplicate into the respective microtiter wells.
2. Incubate and shake plate for **2 hours** at room temperature.
3. Discard contents of the wells, knock the plates on absorbent tissue paper and wash **5 times with 250 µl** washing buffer each. Knock again on absorbent tissue paper.
4. Add **100 µl** conjugate to the wells.
5. Incubate and shake plate for **1 hour** at room temperature.
6. Discard contents of the wells, knock the plates on absorbent tissue paper and wash **5 times with 250 µl** washing buffer each. Knock again on absorbent tissue paper.
7. Add **100 µl** of substrate solution (TMB).
8. Incubate for **15-20 min.** in the dark at room temperature (18-24°C).
9. Pipet **50 µl** stop solution into all wells.
10. Determine absorption **immediately** with an ELISA reader at **450 nm** against 690 or 620 nm as reference. Should the extinction of the zero calibrator exceed the detection range of the photometer, the measurement is to be repeated immediately at 405 nm (against 690 or 620 nm as reference).

10. RESULTS

A calibration curve is constructed from the calibrator results. Resistin concentration read on the calibration curve must be multiplied by the factor 10.

The calibration curve is not linear. We recommend a point-to-point algorithm for analysis. The extinction of the NSB can be deducted from the values of the measured extinctions.

Typical calibration curve



concentration [pmol/l]	0	0.08	0.4	2.0	10.0	50.0
B/B ₀ mean value	100	82	77	48	32	12

The data is supplied for demonstration purposes only and cannot be used in evaluating data generated from the assay.

11. LIMITATIONS

Samples with resistin levels greater than the highest calibrator should be diluted and re-assayed.

12. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends to use control samples from pooled serum samples as internal quality control.

Control samples or serum pools should be analyzed with each run of calibrators and patient samples. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. In assays in which one or more of the quality control sample values are located outside the acceptable limits, the results for the patient sample may not be valid.

We recommend that every laboratory should establish its own reference range.

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Sensitivity

The detection limit was determined to be 0.068 ng/ml ($B_0 + 2 SD$)

sample	resistin mean value [OD]	standard deviation	detection limit [ng/ml]
1	1.952	0.049	0.068

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The test components which are made of human serum are tested for HIV and HBV and found to be negative. However, since no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent, these reagents should be handled as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen. The normal precautions for laboratory working should be observed.
- Reagents of the test package contain sodium azide as a bactericide. Contact with skin or mucous membranes has to be avoided.
- All reagents in the test package are to be used for *in-vitro* diagnostics only.
- The reagents should not be used after the date of expiry (see label on the test package).
- Single components with different lot numbers should not be mixed or exchanged.
- The guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik can therefore not be held responsible for any damage resulting from this.