



Adiponectin Elisa

KAPME09

LOT : 160729/1



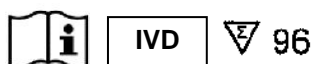
PRODUCT INFORMATION AND MANUAL

Adiponectin

ELISA

KAPME09

**Enzymeimmunoassay for quantitative Determination of
human Adiponectin in serum and plasma**



Adiponectin ELISA KAPME09	96 Determinations
Principle of the test	Enzyme-linked Immunoassay
Duration (incubation period)	1.75 h
Antibodies	monoclonal antibodies
Dilution Buffer	Ready for use
Washing buffer	20 fold concentrate
Calibrators	5 single calibrators: 2 - 100µg/L, native human Adiponectin
Assay Range	0.27 - 31000µg/L
Control	2 control sera, freeze-dried
Sample	human serum / plasma
Required sample volume	10 µL
Sample dilution	1:310
Analytical sensitivity	≤ 0.27 µg/L
Intra- / Interassay Variance	<10 %
Reference values	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. Intended Use

The Elisa KAPME09 is intended to be used for quantitative measurement of human Adiponectin in human serum and plasma samples.

2. Introduction

Adiponectin is a 30kDa protein which percentage in serum proteins is 0.01%. It is mainly synthesized by adipocytes, but also muscle cells and hepatocytes have the ability to synthesize Adiponectin. It consists of a Collagen-like N-terminal and a globular C-terminal domain [1]. In vivo Adiponectin appears with different oligomers. Beside the trimer and dimer also high molecular multimers exist [1-3]. Two different receptors are known, both receptors are ubiquitarily expressed, though the distribution in the tissues varies. The Adiponectin Receptor 1 (AdipoR1) is especially in muscle- and AdipoR2 in liver tissue synthesized [4].

Several studies show that adiponectin correlates negatively with BMI and thus it could have relevance for the energy metabolism for example through the regulation of fatty acid oxidation. Beside the correlation with BMI, Adiponectin level is associated with the Insulin-Resistance [5-7] and so also linked with Type II Diabetes. Adiponectin is associated also with glucose- und lipometabolism [8, 9].

Furthermore adiponectin is involved in inflammatory processes [10-14] and therewith it is of importance for appearance of arteriosclerosis [4, 5, 15] and coronaritis [16, 17], thus the determination of Adiponectin level in plasma could serve to estimate the risk of coronary disease [18, 19]. Beside this Adiponectin influences further physiological processes as for example the angiogenesis [20, 21].

3. Assay principle

The DIASource ELISA for Adiponectin KAPME09 is a so-called Sandwich-Assay using two specific and highly affine antibodies. The Adiponectin in the samples binds to the first antibody coated on the microtiter plate. In the following step the second specific anti-Adiponectin-Antibody binds in turn to the immobilised Adiponectin. The second antibody is biotinylated and will be applied in a mixture with a Streptavidin-Peroxidase-Enzyme Conjugate. In the closing substrate reaction the turn of the colour will be catalysed quantitatively depending on the Adiponectin-level of the samples

4. Warnings and precautions

For In Vitro Diagnostic Use only. For Professional use only.

The DIASource kit is suitable only for in vitro diagnostics and not for internal use in humans and animals. Follow strictly the test protocol. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything has been understood. DIASource will not be held responsible for any loss or damage (except as required by statute) howsoever caused, arising out of noncompliance with the instructions provided. A Material Safety Data sheet is available on request.

Do not use obviously damaged or microbial contaminated or spilled material.

Caution: This kit contains material of human and/or animal origin. Therefore all components and patient's specimens should be treated as potentially infectious.

Appropriate precautions and good laboratory practices must be used in the storage, handling and disposal of the kit reagents. The disposal of the kit components must be made according to the local regulations.

Human Serum

Following components contain human serum: **Control Sera 1 and 2, and Calibrators 1-5**

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

Calibrators 1-5, Antibody-HRP-Conjugate, Dilution buffer and Washing buffer

Contain as preservative a mixture of **5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one** and **2-methyl-4-isothiazolin-3-one** (<0.015%)

H317	May cause an allergic skin reaction.
P280	Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.
P272	Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace.
P261	Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapours/ spray.
P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention.
P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P501	Dispose of contents/ container in accordance with local/ regional/ national/ international regulations.

Substrate Solution

The TMB-Substrate contains 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine (<0.05%)

H315	Causes skin irritation.
H319	Causes serious eye irritation.
H335	May cause respiratory irritation.
P261	Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapours/ spray.
P305+P351+	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes.
P338	Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

Stopping Solution

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

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

General first aid procedures:

Skin contact: Wash affected area rinse immediately with plenty of water at least 15 minutes. Remove contaminated cloths and shoes.

Eye contact: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water at least 15 minutes. In order to assure an effectual rinsing spread the eyelids.

Ingestion: After swallowing the product, if the affected person is conscious, rinse out the mouth with plenty of water: seek medical advice immediately.

5. SAMPLES

5.1 Sample type

Serum and Plasma

Serum and heparin plasma levels are comparable. In EDTA- and Citrate Plasma-samples levels were found approx. 18% lower, because of the relatively high amount of anticoagulant.

5.2 Specimen collection

The blood sample for serum preparation should be gained according to standardized venipuncture procedure. Hemolytic reactions have to be avoided.

5.3 Required sample volume: 10 µL

5.4 Sample stability

- In firmly closable sample vials
- Storage at 20-25°C: 2 days
- Storage at -20° C: min. 2 years
- Freeze-thaw cycles max. 3

The storage of samples over a period of 2 years at -20°C showed no influence on the reading. Freezing and thawing of samples should be minimized, 3 freeze-thaw cycles showed no effect on the measured adiponectin concentration.

5.5 Interference

Hemoglobin, triglyceride and bilirubin in the sample do not interfere to a concentration of **5 mg/mL**, **100 mg/mL** and **100 µg/mL** respectively. However, the use of hemolytic, lipemic or icteric samples should be validated by the user.


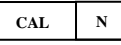

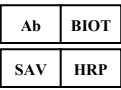
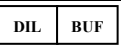
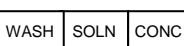
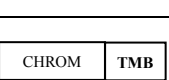
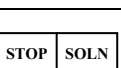
5.6 Sample dilution

- Dilution: **1:310** with Dilution Buffer
- Dilute for example **300 µL** Dilution Buffer in PE-/PP-Tubes (application of a multi-stepper is recommended in larger series), add **10 µL** Serum- or Plasma (dilution: 1:31). Add **900 µL** Dilution Buffer in another PE-/PP-tube and **100 µL** of the thoroughly mixed first dilution. After mixing, use 2x100 µL from this **1:310** diluted sample in the assay.
- Alternatively if you have the necessary technical equipment a one-step dilution of **1:301** is possible: Add **5 µL** to **1.5 mL** dilution buffer .
- Sample stability after dilution of the sample: maximum 1 hour at 20-25°C.

6. MATERIAL

6.1. Material provided

The reagents listed below are sufficient for 96 wells including the calibration curve

1)		Microtiter plate , ready for use, coated with mouse-anti-Adiponectin-antibody. Wells are separately breakable (8x12) wells
2)		Cal N , lyophilized (native human adiponectin), concentrations are given on vial labels and on quality certificate in ng/ml. 5 x 750 µl
3)		Control Serum 1 & 2 , lyophilized (human serum), concentration is given on quality certificate in ng/ml. 2 x 500 µl
4)		Antibody-Conjugate , 12 ml, ready for use, mouse-anti-hAdiponectin-antibody biotinylated + streptavidin horseradish peroxidase conjugat. 1 x 12 ml
5)		Dilution buffer , ready for use. 1 x 125 ml
6)		Washing Buffer , 20-fold concentrated solution. 1 x 50 ml
7)		Chromogenic Substrate , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP)-substrate, stabilised Tetramethylbencidine. 1 x 12 ml
8)		Stopping Solution , ready for use, 0.2 M sulphuric acid , 1 x 12 ml
9)		Sealing tape for covering of the microtiter plate, 2 x, adhesive.

6.2. Materials Required but not provided

Distilled (Aqua destillata) or deionized water for dilution of the Washing Buffer (950 mL).

Precision pipettes and multichannel pipettes with disposable plastic tips

Polyethylene PE/Polypropylene PP tubes for dilution of samples

Vortex-mixer

Microtiter plate shaker (350 rpm)

Microtiter plate washer (recommended)

Micro plate reader ("ELISA-Reader") with filter for 450 and ≥ 590 nm

7. Technical Notes

Storage Conditions

Store the kit at 2-8°C after receipt until its expiry date. The lyophilized reagents should be stored at -20 °C after reconstitution. Avoid repeated thawing and freezing.

Storage Life

The shelf life of the components **after initial opening** is warranted for **4 weeks**, store the unused strips and microtiter wells **airtight** together with the desiccant at 2-8°C in the clip-lock bag, use in the frame provided. The **reconstituted components** Calibrators and Control Sera **1&2** must be stored at -20°C (max. 4 weeks). For further use, thaw quickly but gently (avoid temperature increase above room temperature and avoid excessive vortexing). Up to 3 of the freeze-thaw cycles did not influence the assay. The 1:20 diluted Washing Buffer is 4 weeks stable at 2-8°C

Preparation of reagents

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

Reconstitution

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

Dilution1&2 with the Dilution Buffer in the same ratio (1:310) as the sample.

The required volume of Washing Buffer is prepared by 1:20 dilution of the provided 20fold concentrate with Aqua dest.

Assay Procedure

When performing the assay, Blank, Calibrators Controls **1&2** and the samples should be pipette as fast as possible (e.g. <15 minutes). To avoid distortions due to differences in incubation times, Antibody Conjugate as well as the succeeding Substrate Solution should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples. Stopping Solution should be added to the plate in the same order as Substrate Solution

All determinations (Blank, Calibrators, Controls **1&2** and samples) should be assayed in duplicate. For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

Incubation

Incubation at room temperature means: Incubation at 20 - 25°C. The Substrate Solution , stabilised H₂O₂-Tetramethylbencidine, is photosensitive—store and incubation in the dark.

Shaking

The incubation steps should be performed at mean rotation frequency of a particularly suitable microtiter plate shaker. We are recommending 350 rpm. Due to certain technical differences deviations may occur, in case the rotation frequency must be adjusted. Insufficient shaking may lead to inadequate mixing of the solutions and thereby to low optical densities, high variations and/ or false values, excessive shaking may result in high optical densities and/ or false values.

Washing

Proper washing is of basic **importance** for a secure, reliable and precise performance of the test. Incomplete washing is common and will adversely affect the test outcome. Possible consequences may be uncontrolled unspecific variations of measured optical densities, potentially leading to false results calculations of the examined samples. Effects like high background values or high variations may indicate washing problems.

All washing must be performed with the provided Washing Buffer diluted to usage concentration. Washing volume per washing cycle and well must be 300 µL at least.

The danger of handling with potentially infectious material must be taken into account.

When using an **automatic microtiter** plate washer, the respective instructions for use must be carefully followed. Device adjustments, e.g. for plate geometry and the provided washing parameters, must be performed. Dispensing and aspirating manifold must not scratch the inside well surface. Provisions must be made that the remaining fluid volume of every aspiration step is minimized. Following the last aspiration step of each washing cycle, this could be controlled, and possible remaining fluid could then be removed, by inverting the plate and repeatedly tapping it dry on non-fuzzy absorbent tissue.

Manual washing is an adequate alternative option. Washing Buffer may be dispensed via a multistepper device, a multichannel pipette, or a squirt bottle. The fluid may be removed by dynamical swinging out the microtiter plate over a basin. If aspirating devices are used, care has to be taken that the inside well surface is not scratched. Subsequent to every single washing step, the remaining fluid should be removed by inverting the plate and repeatedly tapping it dry on non-fuzzy absorbent tissue.

8. Assay Procedure

Preparation of reagents		Reconstitution:	Dilution
Calibrators		in 750 µL Dilution Buffer	-
Control Sera		in 500 µL Dilution Buffer	1:310 with Dilution buffer
Washing Buffer		-	1:20 with Aqua dest.
Sample dilution: with Dilution Buffer 1:310			
Before assay procedure bring all reagents to room temperature 20-25°C.			
Assay Procedure in Double Determination:			
Pipette	Reagents	Position	
100 µL	Dilution Buffer (Blank)	A1/A2	
100 µL	Calibrator 1 (2 ng/mL)	B1/B2	
100 µL	Calibrator 2 (10 ng/mL)	C1/C2	
100 µL	Calibrator 3 (30 ng/mL)	D1/D2	
100 µL	Calibrator 4 (70 ng/mL)	E1/E2	
100 µL	Calibrator 5 (100 ng/mL)	F1/F2	
100 µL	Control Serum 1 (1:310 diluted)	G1/G2	
100 µL	Control Serum 2 (1:310 diluted)	H1/H2	
100 µL	Sample (1:310 diluted)	in the rest of the wells according the requirements	
Cover the wells with the sealing tape.			
Sample Incubation: 1 h at 20-25°C, 350 rpm			
3 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 3 x with 300 µL each Washing Buffer / well		In each well
100 µL	Antibody-POD-Conjugate		In each well
Cover the wells with the sealing tape.			

Incubation: 30 Minutes at 20-25°C, 350 rpm		
3 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 3 x with 300 µL each Washing Buffer / well	In each well
100 µL	Substrate Solution	In each well
Incubation: 15 Minutes in the Dark at 20-25°C		
100 µL	Stopping Solution	In each well
	Measure the absorbance within 30 min at 450 nm with ≥ 590 nm as reference wavelength.	

9. Quality Control

Good laboratory practice requires that controls are included in each assay. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance. The test results are only valid if the test has been performed following the instructions. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state or local standards/laws. All calibrators and kit controls must be found within the acceptable ranges as stated on the QC Certificate. If the criteria are not met, the run is not valid and should be repeated. Each laboratory should use known samples as further controls.

Quality criteria

For the evaluation of the assay it is required that the absorbance values of the blank should be below 0.25, and the absorbance of calibrator 5 should be above 1.00.

Samples, which yield higher absorbance values than calibrator 5, should be re-tested with a higher dilution.

10. Evaluation of results

Establishing of the calibration curve

Calibrator	1	2	3	4	5
ng/mL	2	10	30	70	100

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

Example of a typical calibration curve

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

	Blank	1	2	3	4	5
ng/mL	0.0	2	10	30	70	100
OD _(450-620 nm)	0.008	0.071	0.357	1.022	2.053	2.817

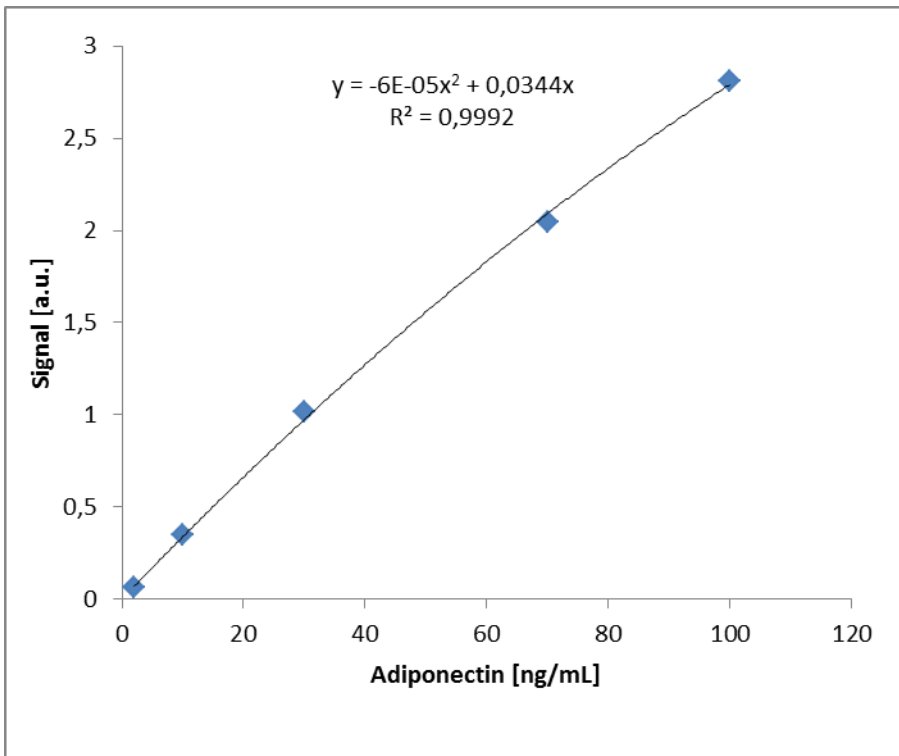


Figure 1 Exemplary calibration curve

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

Exemplary calculation of Adiponectin concentrations

Sample dilution: 1:310

Measured extinction of your sample	0.408
Measured extinction of the blank	0.008

Your measurement program will calculate the Adiponectin concentration of the diluted sample automatically by using the difference of sample and blank for the calculation. You only have to determine the most suitable curve fit (here: polynomial 2nd degree).

In this exemplary case the following equation is solved by the program to calculate the adiponectin concentration in the sample:

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

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

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

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

Interpretation of results

The test results should not be the only base for therapeutic decisions. The results should be interpreted in regard to anamnesis, further clinical observations and results of other diagnostic investigations. Further, it is recommended to establish reference and cut-off values corresponding to the relevant group of patients for each laboratory.

Limitation of procedure

The sensitive human Adiponectin ELISA, KAPME09 is based on monoclonal antibodies. Generally, this technique could be sensible to heterophilic antibodies or rheumatic factors in the sample. Their influence is reduced by assay design, but cannot be excluded completely.

11. Reference values

The expected values for serum adiponectin, which were determined with the DIASource ELISA KAPME09 in healthy donors and analysed by Prof. Dr. J. Kratzsch, Department of Laboratory Medicine, University Hospital Leipzig, are given below (Tab. 1).

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

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

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

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

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

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

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

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

Female			Adiponectin (µg/ml):			
Age (Years):	n:	BMI: AV ± SD	AV ± SD::	Median :	Percentile: 25.- 75.	Min. – Max.:
Newborn Cord blood	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

Male			Adiponectin (µg/ml):			
Age (Years):	n:	BMI: AV ± SD	AV ± SD:	Median :	Percentile: 25.- 75.	Min. – Max.:
Newborn Cord blood	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= Number of Probands AV=Average Value BMI=Body Mass Index (kg/m²) SD=Standard Deviation

12. Performance Characteristics

Sensitivity

The analytical sensitivity of the ELISA KAPME09 was measured by the variability of the signal of the calibrator 0. Based on the twofold standard deviation of the blank the mean analytical sensitivity is < 0.27 ng/mL (Range 0.094 to 0.59 ng/mL).

Specificity

Adiponectin exists in different oligomeric forms: the high, medium and low molecular weight form. Different numbers of the adiponectin monomer aggregate specifically to form a complex. In Figure 2a the five different forms of human adiponectin are shown schematically. In parallel the results of a size-exclusion chromatography of human serum measured with the DIASource KAPME09 Adiponectin ELISA are shown.

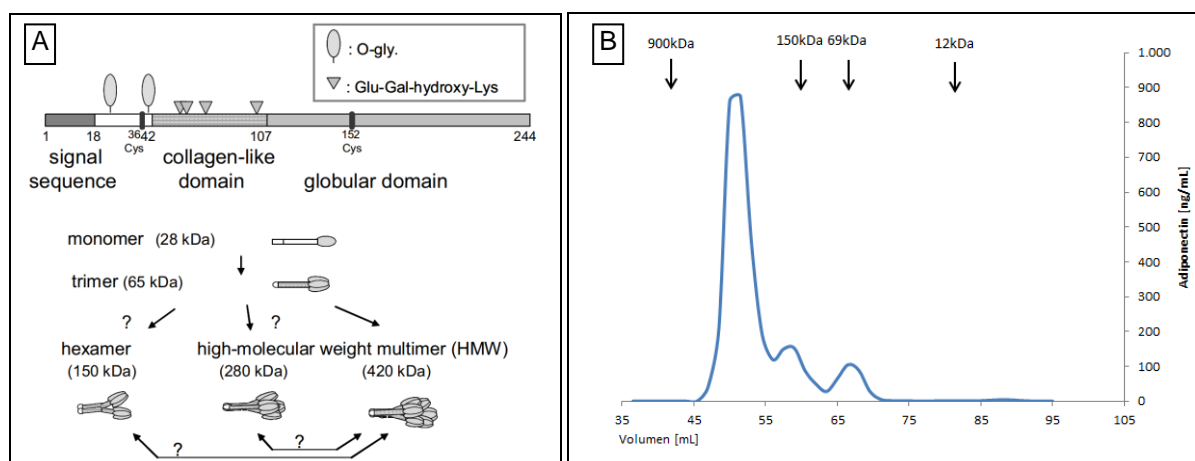


Figure 2 Adiponectin Structure (A) proteinaceous structure of human adiponectin including posttranslational modifications and multimeric forms (taken from Nakano et al⁰). (B) Results of a serum separation by size-exclusion chromatography. The sample was fractionated and the adiponectin content of each fraction was measured by DIASource KAPME09 Adiponectin, for comparison the corresponding size in kDa is indicated by black arrows.

The results shown in Figure 2b clearly demonstrate that the DIASource KAPME09 Adiponectin ELISA detects all forms of Adiponectin present in human serum: the trimer at 65 kDa, the hexamer at 150 kDa and the high molecular weight forms of >280 kDa. The DIASource KAPME09 Adiponectin ELISA therefore measures total Adiponectin.

⁰ Nakano Y, Tahima S, Yoshimi A, Akiyama H, Tsushima M, Tanioka T, Negoro T, Tomita M, Tobe T: A novel enzyme-linked immunosorbent assay specific for high-molecular-weight adiponectin. J Lipid Res 2006, 47(7):1572-1582

Precision

Intra-Assay Variance & Accuracy

Intra assay variance and accuracy is exemplarily shown with two samples. The adiponectin concentration of these samples was repeatedly measured in one assay.

Table 2 Intra-Assay Variation. Recombinant adiponectin was diluted in dilution buffer and the adiponectin concentration of the dilution was measured repeatedly within one assay.

	Determinations [n]	Mean value [µg/L]	Standard deviation [µg/L]	VC [%]	Target Value [µg/L]
Sample 1	8	7.108	0.22	3.14	6
Sample 2	8	107.96	3.97	3.67	100

In both samples the variability is less than 5% and the deviation from the target value is <20%.

Inter-Assay Variance

Serum samples were repeatedly measured in independent assays of different lots. On average the coefficient of variation was 7.5% (SD 1.6). The results of 5 samples are shown in table 3.

Table 3 Inter-Assay Variation

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5
Mean [µg/mL]	4.72	5.25	8.36	5.45	22.29
CV [%]	8.16	8.14	6.93	8.05	7.30
n	99	68	62	174	62

Linearity

Linearity of sample dilution was tested by serial dilution (1:100 – 1:4000) of human serum samples and recalculation of the adiponectin content in comparison to the mean adiponectin concentration of all dilutions (Table 4), no diluted sample showed a deviation of >30%.

Table 4 Linearity. Human serum sample were diluted in dilution buffer and adiponectin content was recalculated. Measurements results are shown in [mg/L]. No deviation of the mean >30% was detected.

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

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

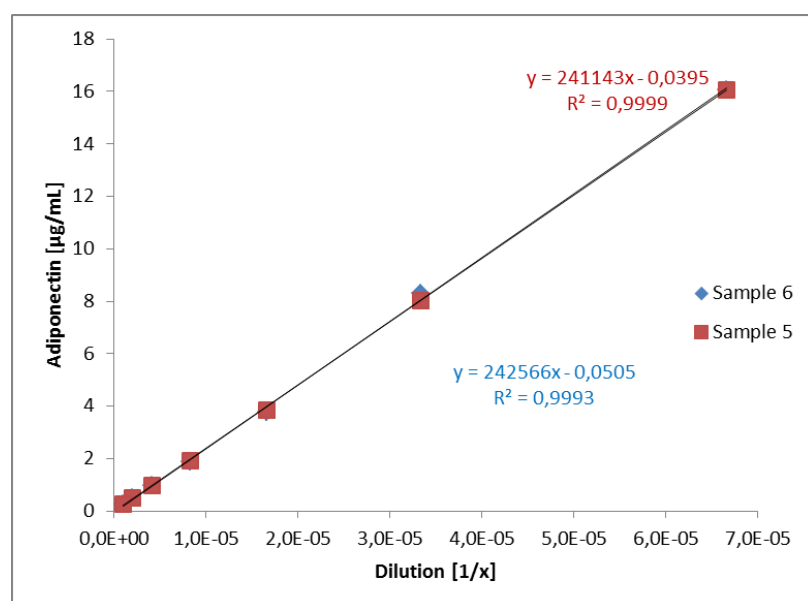


Figure 3 Linearity. Adiponectin concentration was measured in two human samples diluted 1:1500 to 1:96000.

Recovery

Trueness and traceability of the DIAsource Adiponectin ELISA KAPME09 was evaluated by recovery of recombinant adiponectin in human serum. The recovery of recombinant Adiponectin yielded in a serum matrix on average 110%.

Table 5 Recovery of recombinant human Adiponectin in Serum. Recombinant Adiponectin was added in different amounts to human serum. The Adiponectin content of the so enriched samples was measured and recovery in comparison to enriched buffer calculated.

R&D recombinant Adiponectin lot 1022911	Dilution buffer	Serum	Recovery
ng/mL	ng/mL	ng/mL	%
0	0	0.00778	---
75	87.92	95.71	109
37.5	51.84	59.98	116
18.75	26.55	26.7	101
9.375	13.35	15.15	113

Interference

Interference of bilirubin and triglycerides was tested by adding different amounts of these substances to human serum containing adiponectin. For comparison the same amount of buffer without any substance was also added to the serum. Table 6 demonstrates that neither bilirubin nor triglycerides or haemoglobin exert any influence on the measurement of adiponectin in human serum.

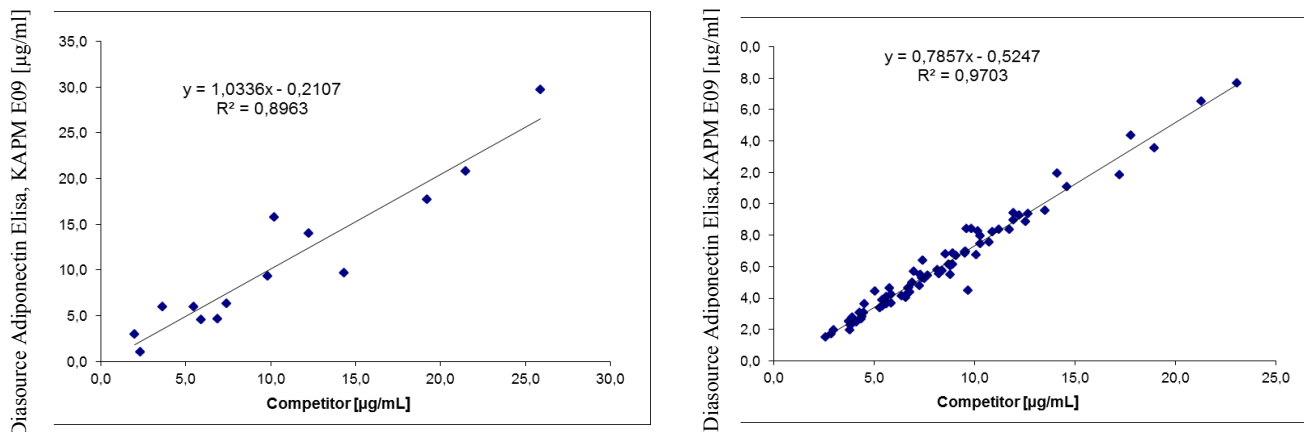
Table 6 Interference. Serum samples were enriched with different amount of triglycerides, bilirubin or haemoglobin. The relative amount of adiponectin measured in comparison with native serum is shown here [%].

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

13. COMPARISON STUDIES

DIASource Adiponectin, KAPME09 was compared with two different, commercially available test systems. In linear regression analysis both tests showed a good coefficient of determination ($R^2=0.896$ and $R^2=0.97$). Thus, the comparability of the results between the DIASource KAPME09 and other test systems is possible. In dependence on the respective system the absolute deviation of measurement results is different, but because of the excellent correlation the results are comparable after applying a factor. The results of both studies are shown in figure 4.

Figure 4 Comparison of DIASource KAPME09 with commercially available test systems (left) radioimmunoassay (n=14) and (right) ELISA (n=84)



14. Instructions for use for scientific application

Scientific Application

In addition to serum and plasma samples Adiponectin can be determined in other human body fluids and in cell culture supernatants of human cell lines for research purposes.

Samples suitable for scientific application

Serum, plasma, saliva, urine, breast milk and cell culture supernatant of human cell lines

The recommended dilution for serum and plasma samples in Dilution Buffer : **(1:310)**.

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

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

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

Species Cross-Reactivity

Serum of the cited species was diluted and used as sample in this assay system. No signal was detected in serum of the following species:

Horse, Cow, Chicken, Rabbit, Dog, Guinea pig, Sheep, Mouse, Goat, Donkey, Rat, Cat

Whether this obvious non-reactivity is species specific should be assessed individually by each customer.

15. Literatur/References

- 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.
- Pajvani, U.B., et al., *Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9073-85.
- 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.
- Shimada, K., T. Miyazaki, and H. Daida, *Adiponectin and atherosclerotic disease*. Clin Chim Acta, 2004. **344**(1-2): p. 1-12.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Okamoto, Y., et al., *Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Circulation, 2002. **106**(22): p. 2767-70.
- Schlegel, A., *Adiponectin and risk of coronary heart disease*. Jama, 2004. **292**(1): p. 40; author reply 40.
- 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.
- Nakamura, Y., et al., *Implications of plasma concentrations of adiponectin in patients with coronary artery disease*. Heart, 2004. **90**(5): p. 528-33.
- Pischon, T., et al., *Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men*. Jama, 2004. **291**(14): p. 1730-7.
- 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.
- Fernandez-Real, J.M., et al., *Adiponectin is associated with vascular function independent of insulin sensitivity*. Diabetes Care, 2004. **27**(3): p. 739-45.

[Revision date : 2016-07-29]



INFORMACIÓN DE PRODUCTO Y MANUAL

Adiponectina

ELISA

KAPME09

**Enzimoimmunoensayo para la determinación cuantitativa
de
adiponectina humana en suero y plasma**



Adiponectin ELISA KAPME09	96 determinaciones
Principio de la prueba	Inmunoensayo ligado a enzimas
Duración (período de incubación)	1,75 h
Anticuerpos	Anticuerpos monoclonales
Tampón de dilución	Listo para usar
Tampón de lavado	Concentrado 20 veces
Calibradores	5 calibradores simples: 2 - 100 µg/l, adiponectina humana nativa
Intervalo del ensayo	0,27 - 31000 µg/l
Control	2 sueros control, liofilizados
Muestra	suero / plasma humano
Volumen necesario de la muestra	10 µl
Dilución de la muestra	1:310
Sensibilidad analítica	≤ 0,27 µg/l
Varianza intra- / interensayo	< 10 %
Valores de referencia	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. Indicaciones

El Elisa KAPME09 está concebido para la medición cuantitativa de adiponectina humana en muestras de suero y plasma.

2. Introducción

La adiponectina es una proteína de 30 kDa cuyo porcentaje en proteínas séricas es del 0,01 %. Se sintetiza principalmente por los adipocitos, pero las células musculares y los hepatocitos poseen también la capacidad de sintetizar adiponectina. Consta de un dominio N-terminal con homología al colágeno y un dominio C-terminal globular [1]. La adiponectina in vivo aparece con distintos oligómeros. Además del trímero y ditérimero, existen también multímeros de alto peso molecular [1-3]. Se conocen dos receptores diferentes, ambos se expresan de forma generalizada aunque la distribución en los tejidos varía. El receptor de la adiponectina 1 (AdipoR1) se sintetiza especialmente en el tejido muscular y el AdipoR2 en el tejido hepático [4].

Varios estudios muestran que la adiponectina se correlaciona negativamente con el IMC de modo que podría tener relevancia en el metabolismo de la energía, por ejemplo a través de la regulación de la oxidación de los ácidos grasos. Aparte de esta correlación con el IMC, el nivel de adiponectina se asocia a la resistencia a la insulina [5-7] con lo que se relaciona también con la diabetes tipo 2. La adiponectina se asocia asimismo al metabolismo de la glucosa y de los lípidos [8, 9].

Además, la adiponectina está implicada en procesos inflamatorios [10-14] y por ende es de relevancia en la aparición de arteriosclerosis [4, 5, 15] y coronaritis [16, 17], por lo que la determinación del nivel de adiponectina en plasma podría servir para estimar el riesgo de enfermedad coronaria [18, 19]. Aparte de esto, la adiponectina influye en procesos fisiológicos adicionales como por ejemplo la angiogénesis [20, 21].

3. Principio del ensayo

El ELISA de DIASource para adiponectina KAPME09 es un ensayo de los denominados de tipo sándwich que emplea dos anticuerpos específicos muy afines. La adiponectina de las muestras se une al primer anticuerpo que recubre la placa de microvaloración. En el siguiente paso, el segundo anticuerpo específico anti-adiponectina se une a su vez a la adiponectina inmovilizada. El segundo anticuerpo se biotinila y se aplicará en una mezcla con un conjugado enzimático de estreptavidina-peroxidasa. En la reacción final con el sustrato el cambio de color se catalizará cuantitativamente dependiendo del nivel de adiponectina de las muestras.

4. Advertencias y precauciones

Solo para uso diagnóstico in vitro. Solo para uso profesional.

El kit de DIASource es adecuado para diagnóstico in vitro solamente y no para uso interno en seres humanos ni animales. Siga estrictamente el protocolo de la prueba. Utilice la versión válida del prospecto facilitado con el kit. Asegúrese de haberlo entendido todo. DIASource no será responsable de pérdidas ni lesiones (excepto conforme a la legislación), comoquiera causadas, que surjan de no seguir las instrucciones proporcionadas. Existe disponible una Ficha de datos de seguridad bajo solicitud.

No utilice material claramente dañado o contaminado con microorganismos o que se haya derramado.

Precaución: Este kit contiene material de origen humano y/o animal. Por tanto, todos los componentes y muestras de pacientes deben tratarse como potencialmente infecciosos.

Deben observarse las precauciones y buenas prácticas de laboratorio para la conservación, manipulación y eliminación de los reactivos del kit. La eliminación de los componentes del kit debe realizarse de conformidad con la normativa local.

Suero humano

Los componentes siguientes contienen suero humano: **sueros control 1 y 2, y calibradores 1-5**

El suero de origen humano de los sueros control proporcionados en este kit fue probado y resultó no reactivo para el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), el virus de la hepatitis C (VHC) y el virus de inmunodeficiencia humana 1 y 2 (VIH). Ningún método puede ofrecer una seguridad total de la ausencia de microorganismos infecciosos; por tanto, todos los componentes y muestras de pacientes deben tratarse como potencialmente infecciosos.

Calibradores 1-5, conjugado de anticuerpo-HRP, tampón de dilución y tampón de lavado

Contiene como conservante una mezcla de **5-cloro-2-metil-4-isotiazolina-3-ona y 2-metil-4-isotiazolina-3-ona** (< 0,015 %)

H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
P280	Llevar guantes / prendas / gafas / máscara de protección.
P272	Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo.
P261	Evitar respirar el polvo / el humo / el gas / la niebla / los vapores / el aerosol.
P333+P313	En caso de irritación o erupción cutánea: consultar a un médico.
P302+P352	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.
P501	Eliminar el contenido / el recipiente de conformidad con la normativa local / regional / nacional / internacional.

Solución de sustrato

El sustrato de TMB contiene 3,3',5,5' tetrametilbencidina (< 0,05 %)

H315	Provoca irritación cutánea.
H319	Provoca irritación ocular grave.
H335	Puede irritar las vías respiratorias.
P261	Evitar respirar el polvo / el humo / el gas / la niebla / los vapores / el aerosol.
P305+P351+	EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos.
P338	Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

Solución de parada

La solución de parada contiene ácido sulfúrico 0,2 M (H₂SO₄)

H290	Puede ser corrosivo para los metales.
H314	Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.
P280	Llevar guantes / prendas / gafas / máscara de protección.
P301+P330+	EN CASO DE INGESTIÓN: enjuagarse la boca.
P331	NO provocar el vómito.
P305+P351+	EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos.
P338	Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.
P309+P311	EN CASO DE exposición o si se encuentra mal: llamar a un CENTRO de información toxicológica o a un médico.

Procedimientos generales de primeros auxilios:

Contacto con la piel: lávese la zona afectada inmediata y abundantemente con agua durante 15 minutos como mínimo. Quítese la ropa y calzado contaminados.

Contacto con los ojos: en caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua durante 15 minutos como mínimo. Para que el lavado sea efectivo abra los párpados.

Ingestión: tras ingerir el producto, si la persona afectada está consciente, enjuáguese la boca con agua abundante: acúdase a un médico de inmediato.

5. MUESTRAS

5.1 Tipo de muestra

Suero y plasma

Los niveles de suero y plasma con heparina son equivalentes. Los niveles de las muestras en plasma con EDTA y citrato resultaron ser aproximadamente un 18 % inferiores debido a la cantidad relativamente alta de anticoagulante.

5.2 Recogida de muestras

La muestra sanguínea para la preparación del suero debe obtenerse conforme al procedimiento de venopunción normalizado. Deben evitarse reacciones hemolíticas.

5.3 Volumen necesario de la muestra: 10 µl

5.4 Estabilidad de la muestra

- En viales de muestra firmemente cerrados.
- Conservación a 20-25 °C: 2 días
- Conservación a -20 °C: mín. 2 años
- Ciclos de congelación-descongelación: máx. 3

La conservación de las muestras durante un período de 2 años a -20 °C no mostró influir sobre la lectura. Debe minimizarse la congelación y descongelación de las muestras, no mostrando efecto alguno sobre la concentración de adiponectina medida 3 ciclos de congelación-descongelación.

5.5 Interferencia

La hemoglobina, los triglicéridos y la bilirrubina en la muestra no interfieren a una concentración de **5 mg/ml, 100 mg/ml y 100 µg/ml**, respectivamente. Sin embargo, el uso de muestras hemolíticas, lipémicas o ictericas debe ser validado por el usuario.

5.6 Dilución de la muestra


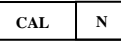

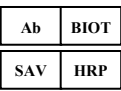
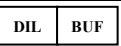
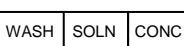
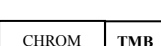
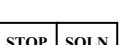
- Dilución: **1:310** con tampón de dilución

- Diluya por ejemplo **300 µl** de tampón de dilución en tubos de PE / PP (se recomienda aplicar un multistepper para series más grandes), añade **10 µl** de suero o plasma (dilución: 1:31). Añada **900 µl** de tampón de dilución en otro tubo de PE / PP y **100 µl** de la primera dilución bien mezclada. Después de mezclar, use $2 \times 100 \mu\text{l}$ de esta muestra diluida a **1:310** en el ensayo.
- Alternativamente, si tiene el equipo técnico necesario, es posible realizar la dilución **1:310** en un solo paso: añade **5 µl** a **1,5 ml** del tampón de dilución.
- Estabilidad de la muestra tras su dilución: máximo 1 hora a 20-25 °C.

6. MATERIAL

6.1. Material proporcionado

Los reactivos que se indican a continuación son suficientes para 96 pocillos, incluida la curva de calibración.

1)		Placa de microvaloración , lista para usar, recubierta con anticuerpo anti-adiponectina de ratón. Los pocillos se pueden separar en tiras de (8 x 12) pocillos
2)		Cal N , liofilizado (adiponectina humana nativa); las concentraciones se facilitan en las etiquetas del vial y en el certificado de calidad en ng/ml. 5 x 750 µl
3)		Suero control 1 y 2 , liofilizado (suero humano); la concentración se facilita en el certificado de calidad en ng/ml. 2 x 500 µl
4)		Conjugado de anticuerpo, 12 ml, listo para usar , conjugado de anticuerpo anti-adiponectina humana de ratón biotinilado + estreptavidina-peroxidasa de rábano picante. 1 x 12 ml
5)		Tampón de dilución , listo para usar. 1 x 125 ml
6)		Tampón de lavado , solución concentrada 20 veces. 1 x 50 ml
7)		Sustrato cromogénico , listo para usar, sustrato de peroxidasa de rábano picante (HRP), tetrametilbencidina estabilizada. 1 x 12 ml
8)		Solución de parada , lista para usar, ácido sulfúrico 0,2 M, 1 x 12 ml
9)		Cinta selladora para tapar la placa de microvaloración, 2 x, adhesiva.

6.2. Materiales necesarios pero no proporcionados

Agua destilada (Aqua destillata) o desionizada para la dilución del tampón de lavado (950 ml)

Pipetas de precisión y pipetas multicanal con puntas de plástico desechables

Tubos de polietileno (PE) / polipropileno (PP) para la dilución de las muestras

Agitador tipo vórtex

Agitador de placas de microvaloración (350 rpm)

Lavador de placas de microvaloración (recomendado)

Lector de microplacas ("lector ELISA") con filtro de 450 y ≥ 590 nm

7. Notas técnicas

Condiciones de conservación

Conserve el kit a 2 - 8 °C una vez recibido hasta su fecha de caducidad. Los reactivos liofilizado deben conservarse a -20 °C tras su reconstitución. Evite congelar y descongelar repetidamente.

Tiempo de conservación

El período de validez de los componentes **una vez abiertos** está garantizado durante **4 semanas**; guarde las tiras y los pocillos de microvaloración no utilizados **herméticamente** junto con el desecante a 2 - 8 °C en la bolsa con cierre de clip, use en el marco proporcionado. Los **componentes reconstituidos** calibradores y sueros control **1 y 2** deben conservarse a -20 °C (máx. 4 semanas). Para usos futuros, congele rápido pero cuidadosamente (evite aumentos de temperatura superiores a la temperatura ambiente y no agite excesivamente con el vórtex). Un máximo de 3 ciclos de congelación-descongelación no afectaron al ensayo. El tampón de dilución diluido a 1:20 es estable durante 4 semanas a 2 - 8 °C.

Preparación de los reactivos

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (20 - 25°C) antes de usar. Las posibles precipitaciones en los tampones deben disolverse antes de usar mezclándolos o calentándolos. No pueden mezclarse reactivos de distintos números de lote.

Reconstitución

Los calibradores y los sueros control **1 y 2** se reconstituyen con el tampón de dilución. Se recomienda conservar los reactivos reconstituidos a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego mezclarlos completamente pero con suavidad (no debe formarse espuma) con un agitador tipo vórtex.

Dilución 1 y 2 con el tampón de dilución en la misma proporción (1:310) que la muestra.

El volumen necesario de tampón de lavado se prepara diluyendo a 1:20 el concentrado 20 veces proporcionado con agua destilada.

Procedimiento del ensayo

Al realizar el ensayo, los calibradores, los controles **1 y 2** y las muestras deben pipetarse lo más rápido posible (< 15 minutos). Para evitar distorsiones debido a diferencias en los tiempos de incubación, deberá añadirse a la placa el conjugado de anticuerpo, así como la solución de sustrato en el mismo orden y en el mismo intervalo de tiempo que las muestras. La solución de parada deberá añadirse a la placa en el mismo orden que la solución de sustrato.

Todas las determinaciones (blanco, calibradores, controles **1 y 2** y las muestras) deben analizarse por duplicado. Se recomiendan un pipeteo preciso y la adherencia al protocolo para obtener unos resultados óptimos.

Incubación

Una incubación a temperatura ambiente significa: incubación a 20 - 25 °C. La solución de sustrato, H₂O₂-tetrametilbencidina estabilizada, es fotosensible—conservar e incubar en la oscuridad.

Agitación

Los pasos de incubación deben realizarse a una frecuencia de rotación media de un agitador de placas de microvaloración que sea especialmente adecuado. Recomendamos 350 rpm. Debido a ciertas diferencias técnicas pueden producirse desviaciones, en cuyo caso debe ajustarse la frecuencia de rotación. Una agitación insuficiente puede hacer que la mezcla de las soluciones no sea adecuada y por tanto que las densidades ópticas sean bajas, las variaciones altas y/o los valores falsos; una agitación excesiva puede producir densidades ópticas altas y/o valores falsos.

Lavado

Un lavado apropiado es de una **importancia** esencial para que la prueba sea segura, fiable y precisa. Es común realizar un lavado incompleto, lo que afectará negativamente al resultado de la prueba. Las posibles consecuencias pueden ser variaciones inespecíficas no controladas de las densidades ópticas medidas, que podrían producir cálculos de resultados falsos de las muestras examinadas. Unos efectos como valores de fondo altos o variaciones altas podrían indicar problemas de lavado.

Todo lavado debe realizarse con el tampón de lavado proporcionado diluido a la concentración de uso. El volumen de lavado por ciclo de lavado y pocillo debe ser de 300 µl como mínimo.

El peligro de manipular material potencialmente infeccioso debe tenerse en cuenta.

Cuando se utilice un lavador de placas de **microvaloración automático**, deben seguirse atentamente las instrucciones de uso correspondientes. Deben realizarse los ajustes del dispositivo, p. ej. para la geometría de la placa y los parámetros de lavado proporcionados. El dispositivo de dispensación y aspiración no debe rayar la superficie interior de los pocillos. Debe preverse minimizar el volumen de líquido remanente de cada paso de aspiración. Después del último paso de aspiración de cada ciclo de lavado, esto podría controlarse, y el posible líquido remanente podría eliminarse a continuación invirtiendo la placa y dando golpecitos reiteradamente sobre papel absorbente que no suelte pelusa.

El **lavado manual** es una opción alternativa adecuada. Puede dispensarse tampón de lavado empleando un dispositivo multistepper, una pipeta multicanal o un frasco de lavado. El líquido puede eliminarse basculando dinámicamente la placa de microvaloración sobre un recipiente. Si se utilizan dispositivos de aspiración, debe tenerse cuidado de no rayar la superficie interior de los pocillos. Con posterioridad a cada paso de lavado individual, debe eliminarse el líquido remanente invirtiendo la placa y dando golpecitos reiteradamente sobre papel absorbente que no suelte pelusa.

8. Procedimiento del ensayo

Preparación de los reactivos		Reconstitución	Dilución
Calibradores		En 750 µl de tampón de dilución	-
Sueros control		En 500 µl de tampón de dilución	1:310 con tampón de dilución
Tampón de lavado		-	1:20 con agua destilada
Dilución de la muestra: con tampón de dilución a 1:310			
Antes del procedimiento del ensayo todos los reactivos deben estar a una temperatura ambiente de 20 - 25 °C .			
Procedimiento del ensayo en determinación doble:			
Pipetear	Reactivos	Posición	
100 µl	Tampón de dilución (blanco)	A1/A2	
100 µl	Calibrador 1 (2 ng/ml)	B1/B2	
100 µl	Calibrador 2 (10 ng/ml)	C1/C2	
100 µl	Calibrador 3 (30 ng/ml)	D1/D2	
100 µl	Calibrador 4 (70 ng/ml)	E1/E2	
100 µl	Calibrador 5 (100 ng/ml)	F1/F2	
100 µl	Suero control 1 (diluido 1:310)	G1/G2	
100 µl	Suero control 2 (diluido 1:310)	H1/H2	
100 µl	Muestra (diluida 1:310)	En el resto de los pocillos conforme a los requisitos	
Tape los pocillos con la cinta selladora.			
Incubación de la muestra: 1 h a 20 - 25 °C , 350 rpm			
3 x 300 µl	Aspire el contenido de los pocillos y lave 3 veces con 300 µl cada una con tampón de lavado / pocillo	En cada pocillo	
100 µl	Conjugado de anticuerpo-POD	En cada pocillo	
Tape los pocillos con la cinta selladora.			

Incubación: 30 minutos a 20 - 25 °C, 350 rpm		
3 x 300 µl	Aspire el contenido de los pocillos y lave 3 veces con 300 µl cada una con tampón de lavado / pocillo	En cada pocillo
100 µl	Solución de sustrato	En cada pocillo
Incubación: 15 minutos en la oscuridad a 20 - 25 °C		
100 µl	Solución de parada	En cada pocillo
	Mida la absorbancia antes de 30 min a 450 nm con ≥ 590 nm como longitud de onda de referencia.	

9. Control de calidad

Las buenas prácticas de laboratorio requieren incluir controles en cada ensayo. Debería analizarse un número estadísticamente significativo de controles para establecer los valores medios y los intervalos aceptables que garanticen una eficacia adecuada. Los resultados de la prueba solo son válidos si la prueba se ha realizado siguiendo las instrucciones. Lo que es más, el usuario debe observar estrictamente los principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio u otras normas/leyes federales, estatales o locales aplicables. Todos los calibradores y controles del kit deben encontrarse dentro de los intervalos aceptables conforme se indica en el Certificado de control de calidad. Si no se satisfacen los criterios, el análisis no será válido y deberá repetirse. Cada laboratorio debería utilizar muestras conocidas como controles adicionales.

Criterios de calidad

Para la evaluación del ensayo es preciso que los valores de la absorbancia del blanco se encuentren por debajo de 0,25, y la absorbancia del calibrador 5 debería estar por encima de 1,00.

Las muestras que arrojen valores de la absorbancia más altos que los del calibrador 5 deberán volverse a analizar con una dilución más alta.

10. Evaluación de los resultados

Establecimiento de la curva de calibración

Calibrador	1	2	3	4	5
ng/ml	2	10	30	70	100

- 1) Calcule el valor **medio de la absorbancia** del blanco a partir de la determinación duplicada (pocillo A1/A2).
- 2) Reste la absorbancia media del blanco de las absorbancias medias de todas las demás muestras y calibradores.
- 3) Trace las concentraciones de calibración en el eje de la X en función del valor medio de la absorbancia de los calibradores en el eje de la Y.
- 4) Recomendación: el cálculo de la curva de calibración debe efectuarse utilizando un programa informático porque por lo general la curva no se describe idealmente (sin la transformación correspondiente) mediante regresión lineal. Para la evaluación normalmente son adecuados un **ajuste de curva polinomial de un grado más alto**, o un **ajuste de curva logística de cuatro parámetros (4-PL)** o una **regresión no lineal** (como podría ser una alineación spline o en escala milimetrada en casos individuales).
- 5) La concentración de adiponectina en ng/ml de las muestras y controles **1** y **2** se puede calcular mediante **multiplicación** por el **factor de dilución correspondiente**.

Ejemplo de curva de calibración típica

Los datos siguientes son solo a efectos de demostración y no se pueden utilizar en lugar de la generación de datos en el momento de realizar el ensayo.

	Blanco	1	2	3	4	5
ng/ml	0.0	2	10	30	70	100
DO _(450-620 nm)	0.008	0.071	0.357	1.022	2.053	2.817

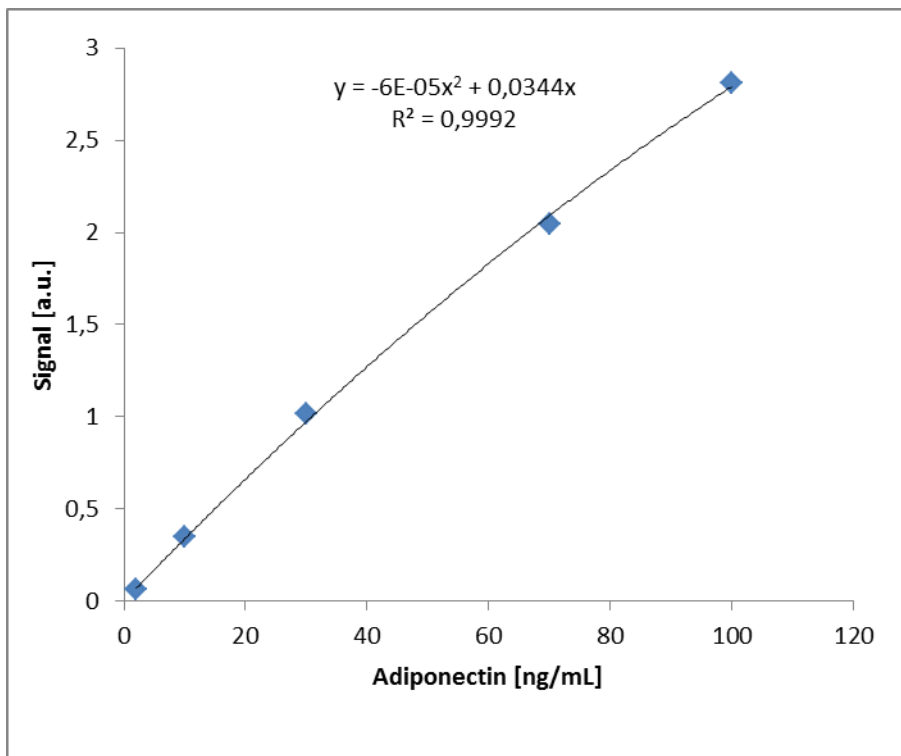


Figura 1 Ejemplo de curva de calibración

La curva de calibración de ejemplo mostrada en la figura 1 **no se puede** utilizar para calcular los resultados de su prueba. ¡Usted tiene que establecer una curva de calibración para cada prueba que lleve a cabo!

Cálculo de ejemplo de concentraciones de adiponectina

Dilución de la muestra: 1:310

Extinción medida de su muestra	0,408
Extinción medida del blanco	0,008

Su programa de medida calculará la concentración de adiponectina de la muestra diluida automáticamente utilizando la diferencia de la muestra y el blanco para el cálculo. Usted solo tiene que determinar el ajuste de la curva más apropiado (aquí: polinomial de 2° grado).

En este caso de ejemplo el programa resuelve la siguiente ecuación para calcular la concentración de adiponectina en la muestra:

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

Si se tiene en cuenta el factor de dilución (1:310), la concentración de adiponectina de la muestra sin diluir es:

$$11,89 \times 310 = 3685,9 \text{ ng/ml} = 3,69 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

La curva de calibración de ejemplo mostrada en la figura 1 no se puede utilizar para calcular los resultados de su prueba. ¡Usted tiene que establecer una curva de calibración para cada prueba que lleve a cabo!

Interpretación de los resultados

Los resultados de la prueba no deben ser la única base para la toma de decisiones terapéuticas. Los resultados deben interpretarse con relación a la anamnesis, observaciones clínicas adicionales y los resultados de otras pruebas diagnósticas. Asimismo, se recomienda establecer valores de referencia y de corte correspondientes al grupo relevante de pacientes de cada laboratorio.

Limitación del procedimiento

El ELISA de adiponectina humana sensible, KAPME09 se basa en anticuerpos monoclonales. Generalmente, esta técnica puede ser sensible a anticuerpos heterofílicos o a factores reumatoides que haya en la muestra. Su influencia está reducida por el diseño del ensayo, pero no se puede excluir completamente.

11. Valores de referencia

A continuación se proporcionan los valores esperados para la adiponectina sérica, los cuales fueron determinados con el ELISA KAPME09 de DIASource en donantes sano y analizados por el Prof. Dr. J. Kratzsch, Departamento de Medicina de Laboratorio, Hospital Universitario de Leipzig, (Tab. 1).

Estos datos muestran una correlación significativa entre los valores de adiponectina sérica y la edad, así como el sexo de los probandos, en cambio la correlación entre el IMC respectivo parece ser menos significativa. En las muestras sanguíneas de cordón umbilical neonatal se encontraron valores muy altos. Se realizaron diversos análisis estadísticos diferentes para adaptarse a ciertas exigencias individuales. Se pueden elegir los datos más adecuados respectivamente para la interpretación de las propias medidas.

Tabla 1a Valores esperados para adultos, media así como mediana específicas del sexo, se proporcionan los percentiles 5 y 95.

Sexo	Número [n]	Media [µg/ml]	Mediana [µg/ml]	Desviación estándar	Percentil 5 [µg/ml]	Percentil 95 [µg/ml]
Mujer	101	10.2	9.1	4.6	4.0	19.4
Hombre	125	6.8	6.1	4.1	2.0	13.9
Total	226	8.3	7.5	4.6	2.4	19.3

Tabla 1b Valores esperados para niños, media así como mediana específicas del sexo, se proporcionan los percentiles 5 y 95.

Sexo	Número [n]	Media [µg/ml]	Mediana [µg/ml]	Desviación estándar	Percentil 5 [µg/ml]	Percentil 95 [µg/ml]
Mujer	131	8.71	8.18	4.32	3.05	15.6
Hombre	134	8.97	8.12	5.13	3.36	18.6
Total	265	8.84	8.18	4.74	3.33	16.5

Tabla 1c Valores esperados de adiponectina, media así como mediana específicas de la edad, se proporcionan los percentiles 5 y 95.

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

Tabla 1d Valores esperados de adiponectina, media y mediana específicas de la edad así como del sexo, se proporciona el IMC y los percentiles 25 y 75.

Mujer			Adiponectina (µg/ml):			
Edad (años):	n:	IMC: VP ± DE	VP ± DE:	Mediana:	Percentil: 25 - 75	Mín. - Máx.:
Sangre cordón umbilical neonato	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

Hombre			Adiponectina (µg/ml):			
Edad (años):	n:	IMC: VP ± DE	VP ± DE:	Mediana:	Percentil: 25 - 75	Mín. - Máx.:
Sangre cordón umbilical neonato	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 = número de probandos VP = valor promedio IMC = índice de masa corporal (kg/m²) DE = desviación estándar

12. Eficacia diagnóstica

Sensibilidad

La sensibilidad analítica del ELISA KAPME09 se midió mediante la variabilidad de la señal del calibrador 0. Basándose en la desviación estándar doble del blanco, la sensibilidad analítica media es < 0,27 ng/ml (intervalo de 0,094 a 0,59 ng/ml).

Especificidad

La adiponectina existe en distintas formas oligoméricas: la forma de peso molecular alto, medio y bajo. Distintos números del monómero de adiponectina se agregan específicamente para formar un complejo. En la figura 2a se muestran esquemáticamente las cinco formas diferentes de la adiponectina humana. Paralelamente, se muestran los resultados de una cromatografía de exclusión por tamaño de suero humano medido con el ELISA de adiponectina KAPME09 de DIASource.

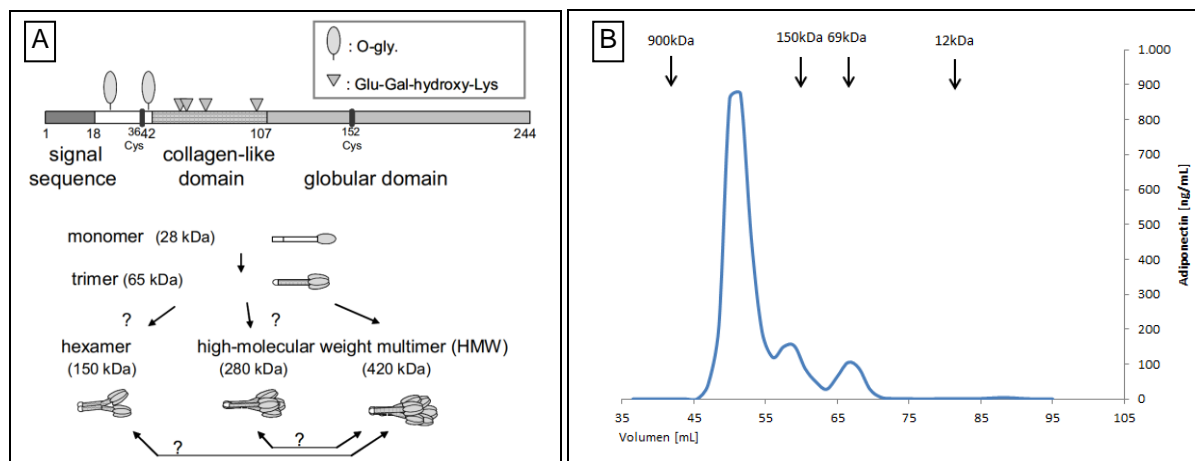


Figura 2 Estructura de la adiponectina (A) estructura proteínica de la adiponectina humana que incluye modificaciones postraslacionales y formas multiméricas (tomada de Nakano et al). (B) Resultados de una separación de suero por cromatografía de exclusión por tamaño. Se fraccionó la muestra y se midió el contenido de adiponectina de cada fracción con el ELISA de adiponectina KAPME09 de DIASource. El tamaño en kDa correspondiente se indica mediante flechas negras para su comparación.

Los resultados mostrados en la figura 2b demuestran claramente que el ELISA de adiponectina KAPME09 de DIASource detecta todas las formas de adiponectina presentes en suero humano: el trímero a 65 kDa, el hexámero a 150 kDa y las formas de alto peso molecular superiores a 280 kDa. El ELISA de adiponectina KAPME09 de DIASource mide por tanto la adiponectina total.

Precisión

Varianza y exactitud intraensayo

La varianza y la exactitud intraensayo se presenta en un ejemplo con dos muestras. La concentración de adiponectina de estas muestras se midió repetidamente en un ensayo.

Tabla 2 Variación intraensayo. La adiponectina recombinante se diluyó en tampón de dilución y la concentración de adiponectina de la dilución se midió repetidamente en un mismo ensayo.

	Determinaciones [n]	Valor medio [µg/l]	Desviación estándar [µg/l]	CV [%]	Valor diana [µg/l]
Muestra 1	8	7.108	0.22	3.14	6
Muestra 2	8	107.96	3.97	3.67	100

En ambas muestras la variabilidad es menor al 5 % y la desviación del valor diana es < 20%.

Variación interensayo

Las muestras de suero se midieron repetidamente en ensayos independientes de lotes diferentes. El promedio del coeficiente de variación fue del 7,5 % (DE 1,6). En la tabla 3 se presentan los resultados de 5 muestras.

Tabla 3 Variación interensayo

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
Media [µg/ml]	4.72	5.25	8.36	5.45	22.29
CV [%]	8.16	8.14	6.93	8.05	7.30
n	99	68	62	174	62

Linealidad

La linealidad de la dilución de la muestra se analizó mediante dilución seriada (1:100 – 1:4000) de muestras de suero humano y el recálculo del contenido de adiponectina en comparación con la concentración media de adiponectina de todas las diluciones (tabla 4), la muestran sin diluir mostró una desviación > 30 %.

Tabla 4 Linealidad. Se diluyeron muestras de suero humano en tampón de dilución y se recalculó el contenido de adiponectina. Los resultados de las medidas se indican en [mg/l]. No se detectó ninguna desviación de la media > 30 %.

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

Se evaluaron diluciones adicionales de 1:1500 a 1:96000 con dos muestras. Los resultados se representan en la figura 3 y demuestran que en las muestras analizadas no se pudo detectar ningún efecto de la dilución en las concentraciones de adiponectina medidas. La desviación de la concentración diana de cada dilución fue menor al 30 % en todas las diluciones.

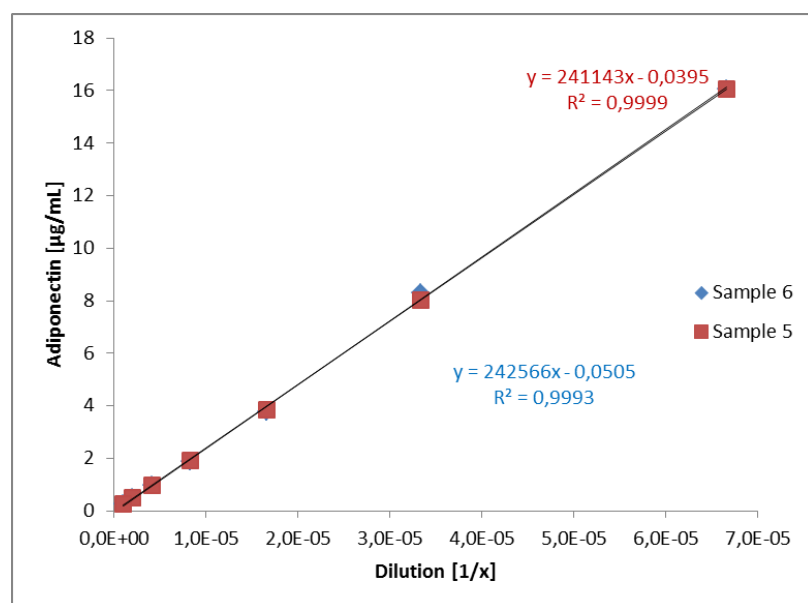


Figura 3 Linealidad. La concentración de adiponectina se midió en dos muestras humana diluidas de 1:1500 a 1:96000.

Recuperación

Se evaluó la veracidad y trazabilidad del ELISA de adiponectina KAPME09 de DIASource mediante la recuperación de adiponectina recombinante en suero humano. La recuperación de adiponectina recombinante produjo una matriz de suero del 110 % de media.

Tabla 5 Recuperación de adiponectina humana recombinante en suero. Se añadió adiponectina recombinante en distintas cantidades a suero humano. Se midió el contenido de adiponectina de las muestras así enriquecidas y se calculó la recuperación en comparación con el tampón enriquecido.

I+D adiponectina recombinante lote 1022911	Tampón de dilución	Suero	Recuperación
ng/ml	ng/ml	ng/ml	%
0	0	0.00778	---
75	87.92	95.71	109
37.5	51.84	59.98	116
18.75	26.55	26.7	101
9.375	13.35	15.15	113

Interferencia

Se analizó la interferencia de la bilirrubina y los triglicéridos añadiendo distintas cantidades de estas sustancias a suero humano que contenía adiponectina. Se añadió también la misma cantidad de tampón sin ninguna sustancia al suero para su comparación. La tabla 6 demuestra que ni la bilirrubina ni los triglicéridos o la hemoglobina ejercen influencia alguna en la medida de adiponectina en suero humano.

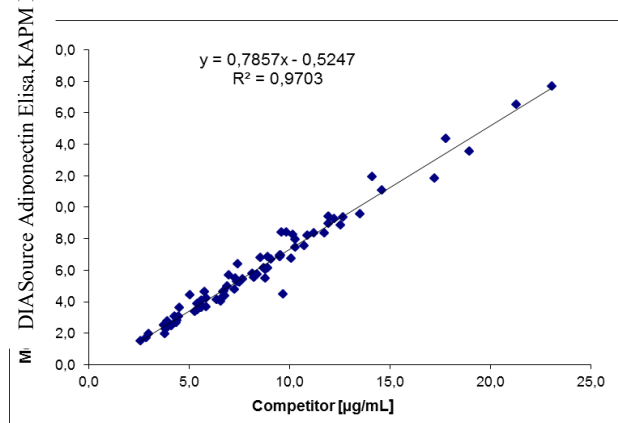
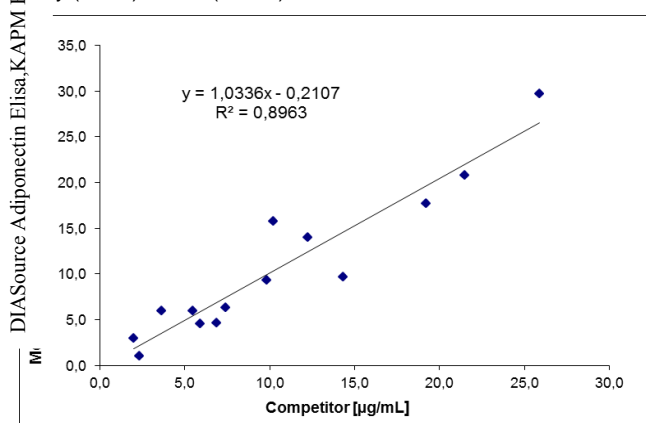
Tabla 6 Interferencia. Las muestras de suero se enriquecieron con distintas cantidades de triglicéridos, bilirrubina o hemoglobina. Aquí se muestra la cantidad relativa de adiponectina medida en comparación con suero nativo [%].

Triglicéridos 100 mg/ml	Bilirrubina 100 µg/ml	Hemoglobina 1 mg/ml	Hemoglobina 5 mg/ml
94	96	90	109
90	93	97	--
95	94	93	--

13. ESTUDIOS COMPARATIVOS

El KAPME09 de adiponectina de DIASource se comparó con dos sistemas de prueba diferentes disponibles en el mercado. En el análisis de regresión lineal ambas pruebas mostraron un buen coeficiente de determinación ($R^2 = 0,896$ y $R^2 = 0,97$). Por lo que es posible la comparabilidad de los resultados entre el KAPME09 de DIASource y otros sistemas de prueba. Dependiendo del sistema correspondiente, la desviación absoluta de los resultados de medida es diferente, pero al aplicar un factor. En la figura 4 se muestran los resultados de ambos estudios.

Figura 4 Comparación del KAPME09 de DIASource con sistemas de prueba disponibles en el mercado (izq.), radioinmunoensayo (n = 84) y (dcha.) ELISA (n = 84)



14. Instrucciones de uso para aplicación científica

Aplicación científica

Además de en muestras de suero y plasma, la adiponectina puede determinarse en otros líquidos corporales y en sobrenadantes de cultivo celular de líneas celulares humanas a efectos de investigación.

Muestras adecuadas para aplicación científica

Suero, plasma, saliva, orina, leche materna y sobrenadante de cultivo celular de líneas celulares humanas

Dilución recomendada de las muestras de suero y plasma en tampón de dilución: **1:310**.

En las otras muestras, los niveles de adiponectina pueden variar considerablemente, el cliente debe hallar la dilución óptima.

Tabla 7 Resultados de pruebas de matriz de muestras. Se añadió adiponectina a las muestras diluidas respectivamente. Se midieron las muestras enriquecidas sin diluir más. Se muestra la recuperación relativa de la adiponectina añadida de la concentración medida en tampón de ensayo enriquecido respectivamente.

Dilución de la matriz	Orina	Saliva	Leche materna	Medio de cultivo celular 10 % FCS	Medio de cultivo celular
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

Reactividad cruzadas entre especies

El suero de las especies citadas se diluyó y utilizó de muestra en este sistema de ensayo. No se detectó ninguna señal en el suero de las siguientes especies:

caballo, vaca, pollo, conejo, perro, cerdo de Guinea, oveja, ratón, cabra, burro, rata, gato.

Aunque esta no reactividad obvia es específica de la especie, cada cliente debería evaluarla individualmente.

15. Bibliografía/Referencias

- 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.
- Pajvani, U.B., et al., *Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9073-85.
- 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.
- Shimada, K., T. Miyazaki, and H. Daida, *Adiponectin and atherosclerotic disease*. Clin Chim Acta, 2004. **344**(1-2): p. 1-12.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Okamoto, Y., et al., *Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Circulation, 2002. **106**(22): p. 2767-70.
- Schlegel, A., *Adiponectin and risk of coronary heart disease*. Jama, 2004. **292**(1): p. 40; author reply 40.
- 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.
- Nakamura, Y., et al., *Implications of plasma concentrations of adiponectin in patients with coronary artery disease*. Heart, 2004. **90**(5): p. 528-33.
- Pischon, T., et al., *Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men*. Jama, 2004. **291**(14): p. 1730-7.
- 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.
- Fernandez-Real, J.M., et al., *Adiponectin is associated with vascular function independent of insulin sensitivity*. Diabetes Care, 2004. **27**(3): p. 739-45.

Fecha de revisión: 2016-07-29