



Resistin Elisa

KAPME50

History

Summary of change :

Previous Version :	Current Version :
130506/1	200224/1
Multilanguage IFU	Addition of the following sentence at the end of the English IFU: "Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website: https://www.diasource-diagnostics.com/ "
Old DIAsource logo	New DIAsource logo
No Manufacturer symbol	Manufacturer symbol added
No IVD symbol	IVD symbol added
Lot	Version
PI number	PI number cleared



Resistin-ELISA

Enzyme Immunoassay for the Quantitative Determination of human Resistin
KAPME50
IN VITRO DIAGNOSTIC USE

DIASource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

DIASOURCE RESISTIN ELISA

- is suited for Resistin determination in **Serum** and **Plasma** samples
- is extremely **sensitive (12 pg/ml \cong 1.2 pg per well)** and, thus allows measurements in cell culture media too and in specimens others than serum e.g. in Cerebrospinal fluid, Amnion fluid, Saliva, Urine, Breast milk
- is **fast**: incubation time a total of 4 hours
- Single Calibrators with **20, 100, 300, 600, 1000 pg/ml** human Resistin are provided in the Kit
- 2 Control Sera for quality control
- is calibrated with **recombinant Resistin**
- Microtiter plates are separately breakapart, tests can be adapted to individual requirements

INTENDED USE

Measurement of human Resistin in human Serum and Plasma Sample

CLINICAL IMPLICATION

- Resistin is relevant e.g. in research of:
- Adiposity
- Insulin Resistance, Diabetes
- Arteriosclerosis
- Inflammation

INTRODUCTION

Resistin, a cysteine-rich protein of 11.3 kDa (1), was firstly found in mice (2) and constitutes together with RELM α , RELM β and RELM γ the protein family of resistin-like molecules (RELM).

In humans, resistin and RELM β (1) but no other proteins of the RELM family were found. The human form of resistin shows a homology of 53% to the murine protein (4). It has 11 cysteine-residues, is synthesized as a propeptide of 108 amino acids and secreted as a dimer, build by a disulfide bridge of cysteine residues (22). Beside this intermolecular disulfide bridge, 5 additional intramolecular ones exist (5,6).

Appearance of multi- and oligomer formation was proved by size exclusion chromatography. Thereby it was shown, that oligomer formation is SDS-insensitive but can be inhibited by β -mercaptoethanol and is therefore likely to be caused by disulfide bridges (1). Further on, the resistin structure seems to be dependent on its concentration, as circular dichroism analysis shows a concentration dependent shift of α -helical to β -sheet structure (1).

Resistin expression was demonstrated in white adipose tissue (10), pituitary (11) and pancreatic islets (12) of mice as well as in brown adipose tissue of rats. In humans, resistin expression in adipocytes can be detected but only at a very low level. But in vitro, resistin expression of non-adipocytes in fatty tissue was shown (13). Human resistin gene is also expressed in pancreatic islets (12), pre-adipocytes (14) macrophages (15) and bone marrow (39). So, resistin is of relevance for inflammation processes as well as for lipid metabolism.

Most investigation refers to the mouse model. Here, the existence of trimeric and hexameric resistin in serum was demonstrated (7). In comparison to adiponectin biology it is highly probable that different resistin oligomers have different biologic function (8, 9).

In mice, a correlation between adiposity, insulin resistance and resistin expression was found empirically. In humans, respective study results are not clear – several studies show an association of resistin serum concentration and adiposity or insulin resistance (17, 25-31). But others failed in confirming these results (14, 16-24). Therefore, there is requirement for valid and reproducible determination of resistin serum concentration.

Relevance of resistin in other physiologic processes than energy metabolism was investigated by several different approaches. Experiments with endothelial cells gave interesting results. Here, resistin was shown to enhance expression of VCAM-1 and ICAM-1 (33, 34). By this way, resistin is potentially able to influence endothelial inflammation (35, 36) and, thereby atherosclerosis. These results were confirmed by experiments in mice, where endothelin-1 was shown to regulate resistin secretion (37, 38).

In recent research human resistin was shown to increase pre-adipocyte proliferation and lipolysis of mature adipocytes (38). By the way of modulating MAPK-signalling pathways resistin exerts crucial influence on energy metabolism.

Present research demonstrates, that Resistin exerts influence on a broad variety of physiological processes, however a clear and defined biological role of resistin remains still unexisting.

This ELISA-kit enables the user to determine the exact concentration of Resistin in human serum/plasma as well as other body fluids and thereby assists investigation of Resistin biology.

REAGENTS PROVIDED

- 1)

TUF

Microtiter plate, ready for use: **Microtiter plate** with 96 wells, divided up in 12 strips with 8 wells separately breakable, coated with anti-human Resistin antibody.
- 2)

CAL	N
-----	---

Calibrators 1-5, lyophilized: contain recombinant Resistin. Calibrator values are between **0.02 - 1 ng/ml** (20, 100, 300, 600 und 1000 pg/ml) Resistin and have to be reconstituted with **750 µl (each) Calibrator Diluent**. Attention: Please use only Calibrator Diluent for this dilution, because only this assures, that the Calibrators and the respective samples subsequently will incubate under identical conditions in the same special buffer!
- 3)

DIL	CAL
-----	-----

Calibrator Diluent, 120 ml, ready for use, please use for the reconstitution of the Calibrators 1 – 5 and for the sample and Control 1 dilution.
- 4)

CONTROL	N
---------	---

Controls 1 and 2, lyophilised: Contain human Serum and have to be reconstituted with **250 µl Dilution buffer**. The Resistin target value concentration and the respective range is given on the vial label. The **dilution** of the **Control 1 and 2** in **Calibrator Diluent** should be according done to the dilution of the respected samples.
- 5)

BIOT	CONJ	CONC
------	------	------

Biotin Conjugate, 120 µl, 100-fold concentrated solution, contains biotinylated anti-Resistin antibody, please dilute before use 1:100 in Dilution buffer: e.g., add 100 µl Biotin Conjugate to 10 ml Dilution Buffer, mix and use 100 µl/well of this dilution in the assay.
- 6)

SAV	HRP	CONC
-----	-----	------

HRP Conjugate, 120 µl, 100-fold concentrated solution, contains HRP (Horseradish peroxidase)-labelled Streptavidin, please dilute before use **1:100** in **Dilution Buffer** : e.g. add 100 µl HRP conjugate to 10 ml Dilution buffer, mix and use 100 µl/well of this dilution in the assay.
- 7)

DIL	BUF
-----	-----

Dilution buffer, 25 ml, ready for use, please use this for the **reconstitution of the Controls** and for the **dilution of Biotin Conjugate** and **HRP Conjugate**.
- 8)

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

Washing Buffer, 50 ml, 20-fold concentrated: Washing Buffer has to be diluted 1:20 with distilled or demineralised water before use. (e.g. add the complete contents of the flask (50 ml) into a graduated flask and fill with A.dest. to 1000 ml). Attention: After dilution, the Washing Buffer is only limited stable, please dilute only according to requirements.
- 9)

CHROM	TMB
-------	-----

Chromogenic Substrate, 12 ml, ready for use, stabilised H₂O₂-Tetramethylbenzidine.
- 10)

STOP	SOLN
------	------

Stopping Solution, 12 ml, ready for use, 0,2 M sulphuric acid, *Caution!*
- 11) **Sealing tape** for covering of the microtiter plate, 2 x, adhesive.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Precision pipettes (100 and 200µl) Micropipettes and multichannel pipettes with disposable plastic tips
Distilled or Deionized water for dilution of the Washing Buffer (WP), 950 ml
Vortex-mixer
Device to aspirate the calibrators and the samples from the wells (recommended because of the potential danger of infection by human samples)
Timer (120 min. range)
Reservoirs (disposable)
Plate washer and plate shaker (350 cpm)
Calibrated Micro plate reader ("ELISA-Reader") with filter for 450 and 620nm (or ≥590 nm)

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For in-vitro diagnostic use only. For professional use only.

Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.

Before use, all kit components should be brought to **room temperature at 20 - 25°C**. Precipitates in buffers should be dissolved before use by thorough mixing and warming. **Temperature will affect the absorbance** readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.

Do not mix reagents of different lots. Do not use expired reagents.

The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 - 8°C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.

Caution: This kit contains material of human and/or animal origin. Source human serum for the Control Serum provided in this kit was tested by FDA recommended methods and found non-reactive for Hepatitis-B surface antigen (HBsAg), Hepatitis C virus (HCV), and Human Immunodeficiency Virus 1 and 2 (HIV) antibodies. No known test methods can offer total assurance of the absence of infectious agents; therefore all components and patient's specimens should be treated as potentially infectious.

2-Methyl-4-Isothiazolin-3-one

Following components contain < 0.01% **2-Methyl-4-isothiazolin-3-one** solution as preservative **Calibrator 1-5, Biotin Conjugate, Calibrator Diluent, Enzyme conjugate, Dilution buffer**

< 0.01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one Solution

R36/38	Irritating to eyes and skin
R43	Sensibilisation through skin contact possible
S26	In case of contact with eyes rinse immediately with plenty of water and seek medical advice
S28.1	After contact with skin wash immediately with plenty of water

5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-Isothiazol-3-one

Following components contain < 0.01%(w/w) 5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one as preservative:

Calibrator 1-5, Biotin Conjugate, Calibrator Diluent, Washing Buffer, Enzyme Conjugate, Dilution Buffer

R36/38	Irritating to eyes and skin
R43	Sensibilisation through skin contact possible
S26	In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice S28.1 S28.1
S28.1	After contact with skin, wash immediately with plenty of water

Stop solution contains 0.2 M Sulfuric Acid (H₂SO₄)

R36/38	Irritating to eyes and skin
S26	In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice
S28.1	After contact with skin, wash immediately with plenty of water
S36/37	Wear suitable protective clothing and gloves.

Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step. Use separate pipette tips for each sample, control and reagent to avoid cross contamination. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.

TMB-Substrate (S) contains 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine. Store and incubate in the dark.

R20/21/R22	Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed
R36/37/38	Irritating to eyes, respiratory system and skin
S26	In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice
S28.1	After contact with skin, wash immediately with plenty of water
S36/37	Wear suitable protective clothing and gloves

General first aid procedures:

Skin contact: Wash affected area thoroughly with water. Discard 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: If swallowed, wash out mouth thoroughly with water. Immediately see a physician.

Do not eat, drink or smoke in these areas.

Never pipette the materials with the mouth.

Spilled material must be wiped off immediately and should become disinfected. Clean contaminated areas and equipment with a suitable detergent.

METHOD

The enzyme immunoassay for Resistin is a so-called Sandwich-Assay. It utilizes a specific high affinity polyclonal rabbit antiserum coated on the wells of a microtiter plate. The Resistin in the samples binds quantitatively to the immobilized antiserum. In the following step, the biotinylated antiserum binds in turn to Resistin. After washing, Streptavidin-Peroxidase-Enzyme conjugate will be added, which will bind highly specific to the biotin of the antiserum and will catalyse in the closing substrate reaction the turn of the colour, quantitatively depending on the Resistin level of the samples.

SPECIMEN

Serum as well plasma samples are suitable (significant deviation of Resistin levels in corresponding serum-, Heparin-, EDTA-, Citrate-plasma-Samples were not found). Haemolytic samples appear to show falsely high Resistin levels, using such samples should be checked out critically. Common cell culture medium, saliva, breast milk and urine were found to be suitable specimens too.

By means of the special sample buffer an external sample preparation prior to the assay is not required (see below).

The blood sample for serum preparation should be gained according to calibratorized venipuncture procedure. The samples should be stored without anticoagulation reagents. Haemolytic reactions have to be avoided. The blood has to be allowed to clot and after complete clotting, serum is separated by centrifugation.

Storage of the samples

Storage at RT max. 2 days

Storage at -20°C max. 2 years

in tightly closable plastic tubes.

More than 3 freeze/thaw cycles are not possible.

Sample Preparation

Samples have to be diluted in Calibrator Diluent. The excellent linearity of this test system allows sample dilution of 1:5 to 1:400.

In most determinations (serum or plasma samples, and no extreme values expected) a dilution **from 1:10 to 1:50 with Calibrator Diluent** should be suitable. According to expected Resistin levels the dilution with Calibrator Diluent can be higher or lower. Because the Calibrator Diluent has a special formulation for the correct determination of Resistin, the dilution should be **at least 1:5!** Resistin concentrations may be completely different in body fluids of human origin other than serum or cell culture supernatants.

For clinical purposes we recommend a standard dilution of 1:21.

Suggestion for dilution protocol:

Pipette 300 µl Calibrator Diluent in PE-/PP-Tubes (application of a multi-stepper is recommended in larger series), add 15 µl Serum- or Plasma (dilution 1:21). After mixing use 2 x 100 µl of this dilution in the assay.

TECHNICAL RECOMMENDATIONS

The assay has to be conducted strictly according the test protocol herein.

Reagents with different lot numbers cannot be mixed. The microtiterplate and reagents are stable until the indicated expiry if stored unopened and protected from sunlight at 2 – 8°C.

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.

Incubation at room temperature means: 20-25°C

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 become 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.

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 dynamically 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.

Calibrators and Control

For the reconstitution of the lyophilised **Calibrators 1 – 5, Calibrator Diluent** has to be used.

The lyophilised **Controls** must be reconstituted with the **Dilution Buffer**. The dilution of the **Control in Calibrator Diluent** should be done according the dilution of the respected samples.

It is recommended to keep reconstituted reagents at room temperature for 15 minutes and then to mix them thoroughly but gently (no foam!) with a Vortex mixer.

The reconstituted calibrator and controls can be stored for 4 weeks at -20°C . Repeated freeze/thaw cycles have to be avoided.

Biotin and HRP Conjugate

Use the Dilution Buffer for the dilution of the Biotin Conjugate and HRP Conjugate 100fold concentrates. The diluted solutions are only limited stable at 2-8°C and should be prepared daily fresh.

Washing Buffer

The required volume of washing buffer is prepared by 1:20 dilution of the provided 20fold concentrate with deionised water. The diluted Washing Buffer is stable for 4 weeks at 2-8°C. It has to be at room temperature for usage!

Microtiterplate

Store the once unused microtiter strips and wells together with the desiccant in the tightly closed clip lock bag at 2-8°C use in the frame provided. The labelled expiry is not influenced in case of proper storage.

Chromogenic Substrate

The Chromogenic Substrate, stabilised H_2O_2 -Tetramethylbenzidine, is photosensitive – store and incubate in the dark.

ASSAY PROCEDURE

NOTES: All determinations (Calibrators, Controls and samples) should be assayed in duplicate. For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

When performing the assay, the Calibrators, Controls and the samples should be pipette as fast as possible (e.g., <15 minutes). To avoid differences in incubation times, **Biotin Conjugate** and the **HRP Conjugate** as well as the following **Chromogenic Substrate** should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples. **Stop Solution** should be added to the plate in the same order as the Substrate Solution.

- 1) Add **100 µl Calibrator Diluent** in wells A1/A2 (blank) and
- 2) Pipette in positions B1/2 **100 µl of the Calibrator 1** (0.02 ng/ml)
Pipette in positions C1/2 **100 µl of the Calibrator 2** (0.1 ng/ml),
Pipette in positions D1/2 **100 µl of the Calibrator 3** (0.3 ng/ml),
Pipette in positions E1/2 **100 µl of the Calibrator 4** (0.6 ng/ml),
Pipette in positions F1/2 **100 µl of the Calibrator 5** (1 ng/ml).
- 3) To control the correct accomplishment 100 µl of the 1:21 (or in respective dilution rate of the sample) **in Calibrator Diluent** diluted **Controls 1 and 2** can be pipetted in positions G1/2.
Pipette **100 µl** each of the **diluted sample** (e.g. dilute 1:21 with Calibrator Diluent) in the rest of the wells, according to requirements.
- 4) Cover the wells with sealing tape and incubate the plate for **2 hours at room temperature** (shake at ≥ 350 rpm) After incubation aspirate the contents of the wells and wash the wells 5 times with **300 µl Washing buffer** / well.
- 5) Following the last washing step pipette **100 µl** of the 1:100 with **Dilution buffer** diluted **Biotin Conjugate** in each well and incubate **1 hour at room temperature** (shake at ≥ 350 rpm).
- 6) After incubation wash the wells 5 times with **Washing Buffer** as described in step 4)
- 7) Following the last washing step, pipette **100 µl** of the 1:100 with Dilution Buffer diluted **HRP Conjugate** in each well and incubate the plate for **30 minutes at room temperature** (shake at ≥ 350 rpm).
- 8) After incubation wash the wells 5 times with Washing Buffer as described in the step 4.
- 9) Pipette **100 µl** of the **TMB-Chromogenic substrate** in each well.
- 10) Incubate the plate for **30 minutes** in the dark at **room temperature**.
- 11) Stop the reaction by adding **100 µl of Stopping Solution** to all wells.
- 12) Measure the absorbance within **30 minutes at 450 nm** (reference filter: 620 nm).

ESTABLISHING THE CALIBRATION CURVE

For the evaluation of the assay it is preconditioned that the absorbance values of the blank should be below 0.3 OD, these of calibrator 5 should exceed 0.8 OD.

Samples, which yield higher absorbance values than Calibrator 5 are beyond the calibration curve, for reliable determinations these samples should be tested again with a higher dilution.

The calibrators provided contain the following concentrations of Resistin:

Calibrator	1	2	3	4	5
ng/ml	0.02	0.10	0.30	0.60	1.00
pg/ml	20	100	300	600	1000

- 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 values
- 3) Plot the calibrator concentrations on the x-axis versus the mean value of the absorbance of the calibrators on the y-axis.
- 4) Recommendation: Calculation of the calibration curve should be done by using a computer program because the curve is in general (without respective transformation) not ideally described by linear regression. **A higher-grade polynomial, or four parametric logistic (4-PL) curve fit or non-linear regression** are usually suitable for the evaluation (as might be spline or point-to-point alignment in individual cases).
- 5) The **Resistin concentration** of the diluted sample or the diluted control in ng/ml (or µg/ml according the chosen unit for the calibrators) is calculated in this way, the Resistin concentration of the **undiluted sample** and of control is calculated **by multiplication with the respective dilution factor**.

Calibration Curve

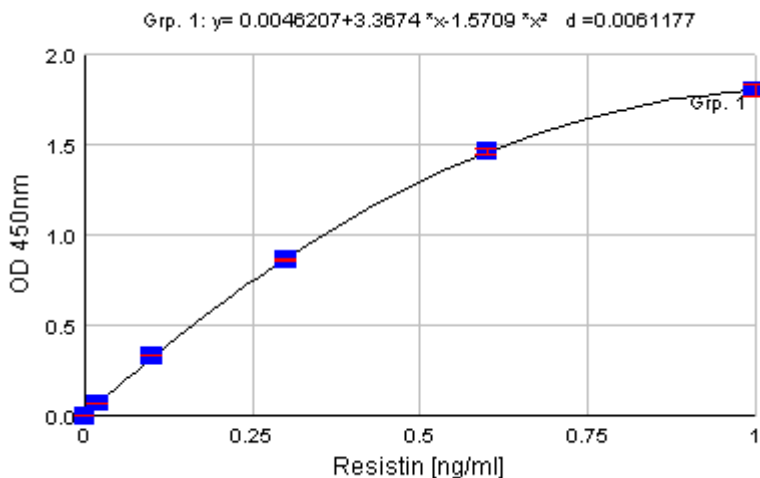


Fig. 1. Exemplary Calibration Curve with a polynomial 2nd degree as curve fit.

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!

Exemplary calculation of the Resistin concentration of a 1:21 diluted sample:

Measured extinction of your sample	0.85
Measured extinction of the blank	0.05

Your measurement program will calculate the Resistin 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 Resistin concentration in the sample:

$$y = 0.0046207 + 3.3674 x - 1.5709 x^2$$

$$0.2686 = x$$

if the dilution factor (1:21) is taken into account the Resistin concentration of the undiluted sample is

$$0.2686 \times 21 = 5,64 \text{ ng/mL} = 0.00564 \text{ µg/mL}$$

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Calibrators

The calibrators are prepared from recombinant human Resistin (19.5 kDa, 2 x 92 amino acids, expressed in E. coli) in concentrations of 20, 100, 300, 600 and 1000 pg/ml (pico Gramm / ml, equal to 0.02 ng/ml-1 ng/ml).

Sensitivity

The **analytical sensitivity** of the assay yields **0.012 ng/ml** (12 pg/ml; as 2x SD of zero calibrator in 15fold determination).

Specificity

Commercially available sera from bovine, cat, chicken, dog, donkey, goat, guinea pig, horse, mouse, pig, rabbit, rat and sheep were diluted (1:10) and used as samples in this assay system and the signal intensity was measured. No cross reactivity was detected.

Interference

Interference of physiological appearing substance with the Resistin measurement was investigated. Serum samples have been enriched with different concentrations of possibly interfering substances and the amount of Resistin was measured and compared with the Resistin concentration in the same sample without any enrichment. In table 1 the relative results are shown. None of the tested substances interfered significantly with Resistin measurement.

Table 1: Interference: Three serum samples were enriched with indicated amount of the potentially interfering substance and measured. Shown is % of Resistin of the native, non enriched serum sample

	Triglyceride	Bilirubin	Haemolysate
	100 mg/ml	100 µg/ml	1000 µg/ml
Serum 1	101	93	94
Serum 2	115	99	99
Serum 3	104	103	147

Table 2: Effects of coagulation inhibitors were investigated by adding indicated amounts of inhibitors to PP enriched with 0.3 ng/ml Resistin. Relative amounts of Resistin measured in inhibitor containing samples in comparison to 0.3 ng/ml Resistin containing Sample Buffer (PP) are shown.

% of Resistin in PP			
		Mean (n=3)	SD
3.8 g/l	Citrate	94	7.67
0.0068 mol/l	EDTA	93	4.96
30,000 IE/l	Heparin	96	4.89

Reproducibility and Precision

The inter- and intra assay coefficients of variability are below than 6.8% and 5%, respectively. Exemplary determinations are shown in table 3 and table 4.

Table 3: Intra-Assay-Variation

	Number of determinations	Mean value (ng/ml)	Standard deviation (ng/ml)	VC (%)
Sample 1	26	2.91	0.16	5.55
Sample 2	15	4.58	0.24	5.33
Sample 3	17	4.60	0.23	5.04
Sample 4	7	2.50	0.09	3.37
Sample 5	23	4.09	0.27	6.67

Table 4: Inter-Assay-Variation (results of 11 determinations, each)

	Number of determinations	Mean value (ng/ml)	Standard deviation (ng/ml)	VC (%)
Sample 1	16	2.81	0.13	4.49
Sample 2	15	4.79	0.24	4.97

Recovery and Linearity

The DIIAsource Resistin ELISA is over a very wide range dilution authentic, the linearity of serum dilutions is over a very wide range excellent (s.Tab.5).

Table 5: Recovery and linearity of the Sample Dilution (characteristic results of two different sera)

Dilution	Sample 1 (native 5.5 ng/ml)		Sample 2 (native 2.25 ng/ml)	
	plus 5 ng/ml	Recovery (%)	plus 12.25 ng/ml	Recovery (%)
1:50	9.71	92.5	14.99	103.4
1:100	10.60	101.0	13.64	94.1
1:200	10.44	99.4	14.10	97.2
1:400	10.32	98.3	14.33	98.8

Different human sera were spiked with recombinant human Resistin in varying concentrations (e.g. in Table 6). The recovery of Resistin yielded on average 98 % of the theoretically expected amount.

Table 6: Samples were enriched with 0.3 ng/ml Resistin and measured in comparison to non enriched sample. Relative recovery of added Resistin is shown.

Matrix	Dilution	% Recovery
Cerebrospinal fluid	1:2	129
Cerebrospinal fluid	1:10	93
Cerebrospinal fluid	1:40	103
Amnion fluid	1:10	85
Amnion fluid	1:40	91
Saliva	1:10	99
Saliva	1:21	86
Urine	1:10	79
Urine	1:21	85
Breast milk	1:2	97
Breast milk	1:10	58
Breast milk	1:21	63
Cell culture supernatant	1:2	100

EVALUATION OF RESULTS

Table 7: The expected values for Resistin were determined with the DIAsource ELISA in healthy probands and analysed by Prof. Dr. J. Kratzsch, Institute for Laboratory Medicine, University of Leipzig.

Female				Resistin (ng/ml):		
Age (Years):	n:	AV Age:	AV BMI:	AV ± SD:	25.- 75. Percentile:	Min. – Max.:
18 - 30	96	23.0	23.1	7.2 ± 2.6	5.4 – 8.8	3.1 – 14.7
31 - 40	63	36.5	24.3	8.1 ± 2.3	6.4 – 9.6	3.6 – 13.1
41 - 50	67	44.9	24.8	7.3 ± 2.5	5.7 – 8.1	4.0 – 16.1
51 - 60	29	54.7	25.0	7.2 ± 2.6	5.4 – 8.5	4.0 – 15.5
61 - 65	9	62.7	25.2	6.6 ± 1.1	6.0 – 6.7	5.4 – 9.3
Male				Resistin (ng/ml):		
Age (Years):	n:	AV Age:	AV BMI:	AV ± SD:	25.- 75. Percentile:	Min. – Max.:
18 - 30	107	23.9	24.1	6.4 ± 1,8	5.0 – 7.6	2.5 – 13.1
31 - 40	59	35.9	25.0	6.7 ± 3,2	4.8 – 7.4	3.8 – 26.9
41 - 50	66	45.0	25.2	6.5 ± 2,8	4.5 – 7.4	2.4 – 16.7
51 - 60	36	54.8	26.4	6.1 ± 2,1	4.7 – 7.2	3.2 – 13.3
61 - 68	20	63.2	25.6	7.2 ± 1,8	6.0 – 8.2	4.5 – 11.2

n=Number of Probands, AV=Average Value, BMI=Body Mass Index (kg/m²), SD=Standard Deviation

Table 8: Summary of the expected values

Sex	Number	Mean [ng/ml]	Standard deviation	2.5. Percentile	9.5. Percentile
Male	288	6.48	2.44	3.32	11.68
Female	264	7.41	2.47	3.68	13.60
Total	552	6.93	2.49	3.58	13.12

LITERATUR / LITERATURE

1. Nakano, Y., et al., *Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma*. J Biochem (Tokyo), 1996. **120**(4): p. 803-12.
2. Pajvani, U.B., et al., *Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/Resistin. Implications for metabolic regulation and bioactivity*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9073-85.
3. Tsao, T.S., et al., *Role of disulfide bonds in Acrp30/Resistin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways*. J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 50810-17.
4. Shimada, K., T. Miyazaki, and H. Daida, *Resistin and atherosclerotic disease*. Clin Chim Acta, 2004. **344**(1-2): p. 1-12.
5. Higashiura, K., et al., *Correlations of Resistin level with insulin resistance and atherosclerosis in Japanese male populations*. Clin Endocrinol (Oxf), 2004. **61**(6): p. 753-9.
6. Spranger, J., et al., *Resistin is independently associated with insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome*. Clin Endocrinol (Oxf), 2004. **61**(6): p. 738-46.
7. Zoico, E., et al., *Adipocytokines, fat distribution, and insulin resistance in elderly men and women*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2004. **59**(9): p. M935-9.
8. Ye, J.M., et al., *PPARalpha /gamma ragaglitazar eliminates fatty liver and enhances insulin action in fat-fed rats in the absence of hepatomegaly*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **284**(3): p. E531-40.
9. Yamauchi, T., et al., *Resistin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1288-95.
10. Blüher (Blueher), M., et al., *Total and high-molecular weight Resistin in relation to metabolic variables at baseline and in response to an exercise treatment program: comparative evaluation of three assays*. Diabetes Care, 2007. **30**(2): p. 280-5.
11. Delaigle, A.M., et al., *Induction of Resistin in skeletal muscle by inflammatory cytokines: in vivo and in vitro studies*. Endocrinology, 2004. **145**(12): p. 5589-97.
12. Winzer, C., et al., *Plasma Resistin, insulin sensitivity, and subclinical inflammation in women with prior gestational diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2004. **27**(7): p. 1721-7.
13. Xydakis, A.M., et al., *Resistin, inflammation, and the expression of the metabolic syndrome in obese individuals: the impact of rapid weight loss through caloric restriction*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(6): p. 2697-703.
14. Motoshima, H., et al., *Resistin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **315**(2): p. 264-71.
15. Wolf, A.M., et al., *Resistin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **323**(2): p. 630-5.
16. Okamoto, Y., et al., *Resistin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Circulation, 2002. **106**(22): p. 2767-70.
17. Schlegel, A., *Resistin and risk of coronary heart disease*. Jama, 2004. **292**(1): p. 40; author reply 40.
18. Choi, K.M., et al., *Inflammation, Insulin Resistance, and Glucose Intolerance in Acute Myocardial Infarction Patients without a Previous Diagnosis of Diabetes Mellitus*. J Clin Endocrinol Metab, 2004.
19. Nakamura, Y., et al., *Implications of plasma concentrations of Resistin in patients with coronary artery disease*. Heart, 2004. **90**(5): p. 528-33.
20. Pischon, T., et al., *Plasma Resistin levels and risk of myocardial infarction in men*. Jama, 2004. **291**(14): p. 1730-7.
21. Shibata, R., et al., *Resistin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling*. J Biol Chem, 2004. **279**(27): p. 28670-4.
22. Fernandez-Real, J.M., et al., *Resistin is associated with vascular function independent of insulin sensitivity*. Diabetes Care, 2004. **27**(3): p. 739-45.

Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Summary of the Assay

Reagent preparation:	Reconstitution:	Dilution:
Calibrators 1 – 5	in 750 µl Calibrator Diluent	
Control 1	in 250 µl Dilution Buffer	1:21 with Calibrator Diluent
Control 2	in 250 µl Dilution Buffer	1:21 with Calibrator Diluent
Biotin Conjugate		1:100 with Dilution Buffer
HRP Conjugate		1:100 with Dilution Buffer
Washing Buffer		1:20 with Aqua. dest. (e.g., add the complete contents of the flask (50 ml) into a graduated flask and fill with A.dest. to 1000 ml).
Sample dilution: 1:21 (e.g. 15 µl Serum with 300 µl Calibrator Diluent).		

Assay Procedure for Double Determination

Pipette	Reagents	Position
100 µl	Calibrator Diluent (blank value)	A1/2
100 µl	Calibrator 1 (0.02 ng/ml)	B1/2
100 µl	Calibrator 2 (0.1 ng/ml)	C1/2
100 µl	Calibrator 3 (0.3 ng/ml)	D1/2
100 µl	Calibrator 4 (0.6 ng/ml)	E1/2
100 µl	Calibrator 5 (1.0 ng/ml)	F1/2
100 µl	Control 1 (diluted)	G1/2
100 µl	Control 2 (diluted)	H1/2
100 µl	Sample dilution	following wells
Cover the wells with the sealing tape.		
Incubation: 2 h at RT, ≥ 350 rpm		
5x 300 µl	Aspirate the contents of the wells and wash 3x with 300 µl Wash Buffer	each well
100 µl	1:100 diluted Biotin Conjugate	each well
Incubation: 1 h at RT, ≥350 rpm		
5x 300 µl	Aspirate the contents of the wells and wash 3x with 300 µl Wash Buffer	each well
100 µl	1:100 diluted HRP Conjugate	each well
Incubation: 30 min at RT, ≥350 rpm		
5x 300 µl	Aspirate the contents of the wells and wash 3x with 300 µl Wash Buffer	each well
100 µl	Chromogenic Substrate	each well
Incubation: 30 min in the dark at RT		
100 µl	Stop Solution	each well
Measure the absorbance within 30 min at 450 nm with 620 nm as reference wavelength.		

Revision date : 2020-02-24



Resistin-ELISA

Inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de resistina humana.

KAPME50

USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

es

DIASource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica - Tel.: +32 10 84 99 11 - Fax: +32 10 84 99 91

DIASOURCE RESISTIN ELISA

- Es adecuado para la determinación en muestras **séricas y plasmáticas**
- Es extremadamente **sensible (12 pg/ml \cong 1,2 pg por pocillo)**, y por tanto también permite las mediciones en medios de cultivo celular y en muestras no séricas, p. ej. en líquido cerebrospinal, líquido amniótico, saliva, orina o leche materna
- Es **rápido**: el tiempo total de incubación es de 4 horas
- En el kit se suministran calibradores simples con **20, 100, 300, 600 y 1000 pg/ml** de resistina humana
- 2 sueros control para el control de calidad
- Se calibra con **resistina recombinante**
- Las placas de microvaloración se separan individualmente y las pruebas se pueden adaptar a los requisitos específicos

INDICACIONES

Medición de la resistina humana en muestras séricas y plasmáticas

IMPLICACIÓN CLÍNICA

- La resistina es importante, por ejemplo, en la investigación sobre:
 - Adiposidad
 - Resistencia a la insulina, diabetes
 - Arteriosclerosis
 - Inflamación

INTRODUCCIÓN

La resistina, una proteína rica en cisteína de 11,3 kDa (1), se halló por primera vez en ratones (2), y junto con la RELM α , la RELM β y la RELM γ forma la familia de proteínas de moléculas similares a la resistina (RELM).

En humanos se hallaron la resistina y la RELM β (1), pero ninguna otra proteína de la familia RELM. La forma humana de la resistina muestra una homología del 53% con la proteína murina (4). Tiene 11 residuos de cisteína, se sintetiza como un propéptido de 108 aminoácidos y se secreta como un dímero, construido mediante un puente disulfuro de residuos de cisteína (22). Además de este puente disulfuro intermolecular, existen 5 intramoleculares más (5,6).

Mediante cromatografía de exclusión por tamaño se demostró la presencia de multiformaciones y formaciones oligoméricas. Así, se demostró que la formación oligomérica es insensible a SDS, pero puede inhibirse por β -mercaptoetanol y, por tanto, es probable que esté causada por puentes disulfuros (1). Además, la estructura de la resistina parece depender de su concentración, ya que el análisis de dicroísmo circular muestra un cambio dependiente de la concentración de una estructura α -helicoidal a una lámina β (1).

La expresión de la resistina se demostró en el tejido adiposo blanco (10), la pituitaria (11) y los islotes pancreáticos (12) de ratones, así como en el tejido adiposo pardo de ratas. En humanos, la expresión de la resistina en adipocitos se puede detectar, pero solo a un nivel muy bajo. Pero *in vitro* se demostró la expresión de la resistina de los no adipocitos del tejido graso (13). El gen humano de la resistina también se expresa en islotes pancreáticos (12), preadipocitos (14), macrófagos (15) y médula ósea (39). Por tanto, la resistina es importante para los procesos inflamatorios, así como para el metabolismo lipídico.

La mayor parte de la investigación se basa en el modelo con ratones. En él se demostró la existencia de resistina trimérica y hexamérica en suero (7). En comparación con la biología de la adiponectina, es altamente probable que los diferentes oligómeros de la resistina tengan funciones biológicas diferentes (8, 9).

En ratones, se halló empíricamente una correlación entre la adiposidad, la resistencia a la insulina y la expresión de la resistina. En humanos, los resultados de los estudios respectivos no están claros; varios estudios muestran una relación entre la concentración sérica de resistina y la adiposidad o la resistencia a la insulina (17, 25-31). Pero otros no lograron confirmar estos resultados (14, 16-24). Por lo tanto, es necesario determinar de modo válido y reproducible la concentración de resistina en suero.

Mediante varios enfoques diferentes se investigó la importancia de la resistina en otros procesos fisiológicos además del metabolismo de la energía. Los experimentos con células endoteliales arrojaron resultados interesantes. Se demostró que la resistina aumenta la expresión de la VCAM-1 y la ICAM-1 (33,34). De esta forma, es posible que la resistina pueda influir en la inflamación endotelial (35,36) y, por tanto, en la aterosclerosis. Estos resultados fueron confirmados por experimentos en ratones en los que se demostró que la endotelina 1 regula la secreción de resistina (37,38).

En investigaciones recientes se ha demostrado que la resistina humana aumenta la proliferación de preadipocitos y la lipólisis de adipocitos maduros (38). Mediante su modo de modular las vías de señalización MAPK, la resistina ejerce una influencia crucial en el metabolismo de la energía.

La investigación actual demuestra que la resistina ejerce influencia sobre una amplia variedad de procesos fisiológicos; no obstante aún no se ha definido claramente el papel biológico de la resistina.

Este kit ELISA permite al usuario determinar la concentración exacta de resistina en suero o plasma humano, así como en otros fluidos corporales y, por tanto, ayuda a la investigación sobre la biología de la resistina.

REACTIVOS PROPORCIONADOS

- 1)

TUT

Placa de microvaloración, lista para usar: **Placa de microvaloración** con 96 pocillos, divididos en 12 tiras con 8 pocillos separables individualmente, recubiertos de anticuerpos antirresistina humana
- 2)

CAL	N
-----	---

Calibradores 1-5, liofilizados: contienen resistina recombinante. Los valores de los calibradores están entre **0,02-1 ng/ml** (20, 100, 300, 600 y 1000 pg/ml) de resistina y tienen que reconstituirse con **750 µl (cada uno) de diluyente de calibrador**. Atención: Utilice el diluyente de calibrador solo para esta dilución, ya que solo así se garantizará que los calibradores y las respectivas muestras se incuben en condiciones idénticas en el mismo tampón especial.
- 3)

DIL	CAL
-----	-----

Diluyente de calibrador, 120 ml, listo para usar; usar para la reconstitución de los calibradores 1-5 y para la dilución de la muestra y el control 1.
- 4)

CONTROL	N
---------	---

Controles 1 y 2, liofilizados: Contienen suero humano y se deben reconstituir con **250 µl del tampón de dilución**. El valor de concentración diana de la resistina y el intervalo respectivo se muestran en la etiqueta del vial. La **dilución del Control 1 y 2** en el **diluyente de calibrador** debe realizarse de acuerdo con la dilución de las muestras respetadas.
- 5)

BIOT	CONJ	CONC
------	------	------

Conjugado de biotina, 120 µl, solución concentrada 100 veces, contiene un anticuerpo biotinilado antirresistina; antes de su uso, diluir en el tampón de dilución (1:100): p. ej. añadir 100 µl de conjugado de biotina a 10 ml de tampón de dilución, mezclar y usar 100 µl/pocillo de esta dilución en el ensayo.
- 6)

SAV	HRP	CONC
-----	-----	------

Conjugado de HRP, 120 µl, solución concentrada 100 veces, contiene estreptavidina marcada con HRP (peroxidasa de rábano picante); antes de usar diluir en el **tampón de dilución (1:100)**: p. ej. añadir 100 µl de conjugado de HRP a 10 ml de tampón de dilución, mezclar y usar 100 µl/pocillo de esta dilución en el ensayo.
- 7)

DIL	BUF
-----	-----

Tampón de dilución, 25 ml, listo para usar, usar para la **reconstitución de los controles** y para la **dilución del conjugado de biotina y el conjugado de HRP**.
- 8)

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

Tampón de lavado, 50 ml, concentrado 20 veces: antes de usarse, el tampón de lavado debe diluirse en proporción 1:20 con agua destilada o desmineralizada. (p. ej. añadir el contenido completo del frasco (50 ml) en un frasco graduado y llenarlo con agua destilada (hasta 100 ml). Atención: Tras la dilución, la estabilidad del tampón de lavado es limitada, diluir solo según la necesidad.
- 9)

CHROM	TMB
-------	-----

Sustrato cromogénico, 12 ml, listo para usar, H₂O₂-tetrametilbencidina estabilizada.
- 10)

STOP	SOLN
------	------

Solución de parada, 12 ml, lista para usar, ácido sulfúrico 0,2 M, **precaución**.
- 11) **Cinta selladora** para tapar la placa de microvaloración, 2 x, adhesiva.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

Pipetas de precisión (100 y 200 µl). Micropipetas y pipetas multicanal con puntas de plástico desechables
Agua destilada o desionizada para la dilución del tampón de lavado (WB), 950 ml
Agitador tipo vórtex
Dispositivo para aspirar los calibradores y las muestras de los pocillos (recomendado debido al peligro potencial de infección por muestras humanas)
Cronómetro (120 min)
Depósitos (desechables)
Lavador de placas y agitador de placas (350 cpm)
Lector de microplacas calibrado ("lector ELISA") con filtro de 450 y 620 nm (o ≥590 nm)

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

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

Lea las instrucciones atentamente y por completo antes de comenzar el ensayo. Utilice la versión válida del prospecto facilitado con el kit. Asegúrese de entenderlo todo.

Todos los componentes del kit deben estar a **temperatura ambiente a 20-25 °C** antes de usarse. Los precipitados de los tampones deben disolverse antes de usarse mezclándolos y calentándolos. **La temperatura afectará a las lecturas de absorbancia** del ensayo. Sin embargo, no afectará a los valores de las muestras de pacientes.

No mezcle reactivos de distintos lotes. No utilice reactivos caducados.

La microplaca contiene tiras separables. Los pocillos no utilizados deben conservarse entre 2 y 8 °C en la bolsa de aluminio y utilizarse en el marco suministrado.

Precaución: Este kit contiene material de origen humano y/o animal. El suero de origen humano del suero de control suministrado en este kit fue probado mediante los métodos recomendados por la FDA y resultó no reactivo para el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), ni para anticuerpos del virus de la hepatitis C (VHC) y del virus de inmunodeficiencia humana 1 y 2 (VIH). Ningún método de prueba puede ofrecer una garantía total de la ausencia de microorganismos infecciosos; por tanto, todos los componentes y muestras de pacientes deben tratarse como potencialmente infecciosos.

2-metil-4-isotiazolina-3-ona

Los siguientes componentes contienen < 0,01% de solución de **2-metil-4-isotiazolina-3-ona** como conservante: **calibradores 1-5, conjugado de biotina, diluyente de calibrador, conjugado enzimático, tampón de dilución**

< 0,01% solución de 2-metil-4-isotiazolina-3-ona

R36/38 Irrita los ojos y la piel

R43 Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel.

S26 En caso de contacto con los ojos, lávese inmediata y abundantemente con agua, y acúdase a un médico

S28.1 En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua.

5-cloro-2-metil 2H isotiazol-3-ona y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona

Los siguientes componentes contienen < 0,01% de 5-cloro-2-metil 2H isotiazol-3-ona y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona como conservante: **calibradores 1-5, conjugado de biotina, diluyente de calibrador, conjugado enzimático, tampón de dilución**

R36/38 Irrita los ojos y la piel

R43 Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel.

S26 En caso de contacto con los ojos, lávese inmediata y abundantemente con agua, y acúdase a un médico S28.1

S28.1 En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua.

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

R36/38 Irrita los ojos y la piel

S26 En caso de contacto con los ojos, lávese inmediata y abundantemente con agua, y acúdase a un médico

S28.1 En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua.

S36/37 Úsese indumentaria protectora y guantes adecuados.

El pipeteo de las muestras y los reactivos debe hacerse tan rápidamente como sea posible y en la misma secuencia para cada paso. Para evitar la contaminación cruzada, utilice puntas de pipeta distintas para cada muestra, control y reactivo. Utilice los depósitos solo para los reactivos individuales. Esto es importante sobre todo para los depósitos de sustrato. El uso de un depósito para dispensar una solución de sustrato que se ha usado previamente para la solución de conjugado puede colorear la solución. No vuelva a verter los reactivos a los viales, puede provocar contaminación cruzada por reactivos. Mezcle bien el contenido de los pocillos de la microplaca para garantizar un buen resultado de las pruebas. No reutilice los micropocillos. No deje que los pocillos se sequen durante el ensayo; añada reactivos inmediatamente después de completar los pasos de lavado.

El sustrato TMB (S) contiene 3,3', 5,5' de tetrametilbenzidina. Conservar e incubar en un lugar oscuro.

R20/21/R22 Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.

R36/37/38 Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias.

S26 En caso de contacto con los ojos, lávese inmediata y abundantemente con agua, y acúdase a un médico

S28.1 En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua.

S36/37 Úsese indumentaria protectora y guantes adecuados

Procedimientos generales de primeros auxilios:

Contacto con la piel: lávese bien la zona afectada con agua. Tire la ropa y calzado contaminados.

Contacto con los ojos: en caso de contacto con los ojos, lávese inmediata y abundantemente con agua durante 15 minutos como mínimo.

Para que el lavado sea efectivo abra los párpados.

Ingestión: si se ingiere, enjuáguese la boca con abundante agua. Consulte a un médico inmediatamente.

No coma, beba ni fume en estas zonas.

No pipetee nunca con la boca los materiales.

El material derramado debe limpiarse de inmediato y desinfectarse. Limpie las zonas y equipos contaminados con un detergente apropiado.

MÉTODO

Este inmunoensayo enzimático para la resistina es un ensayo tipo sándwich. Utiliza un antisuero policlonal de conejo de alta afinidad específico que recubre los pocillos de una placa de microvaloración. La resistina de las muestras se une cuantitativamente al antisuero inmovilizado. En el siguiente paso, el antisuero biotinilado se une a su vez a la resistina. Tras el lavado, se añade el conjugado enzimático de peroxidasa estreptavidina, que se unirá de modo altamente específico a la biotina del antisuero y que catalizará el cambio de color en la reacción final del sustrato, cuantitativamente dependiendo del nivel de resistina de las muestras.

MUESTRA

Tanto el suero como las muestras de plasma son adecuados (no se encontró una desviación significativa de los niveles de resistina en las muestras correspondientes de suero, heparina, EDTA, citrato y plasma). Al parecer, las muestras hemolíticas muestran altos niveles de resistina falsos, por lo que dichas muestras deben revisarse de manera crítica. Se halló que los medios comunes de cultivo celular como saliva, leche materna y orina también son muestras adecuadas.

Gracias al tampón de muestra especial, no se requiere una preparación de muestra externa antes del ensayo (ver más abajo).

La muestra sanguínea para la preparación del suero debe obtenerse conforme al procedimiento de venopunción calibratorizado. Las muestras deben conservarse sin reactivos anticoagulantes. Deben evitarse reacciones hemolíticas. La sangre debe poder coagularse, y después de la coagulación total, se separa el suero mediante centrifugación.

Extracción de las muestras

Conservación a temperatura ambiente máx. 2 días

Conservación a -20 °C máx. 2 años en tubos de plástico herméticos.

No es posible la congelación y descongelación más de 3 veces.

Preparación de la muestra

Las muestras se tienen que diluir en el diluyente de calibrador. La excelente linealidad de este sistema de prueba permite la dilución de la muestra de 1:5 a 1:400.

En la mayoría de las determinaciones (muestras séricas o plasmáticas, sin valores extremos esperados) una dilución **de 1:10 a 1:50 con el diluyente de calibrador** es adecuada. De acuerdo con los niveles de resistina esperados, la dilución con el diluyente de calibrador puede ser superior o inferior. Puesto que el diluyente de calibrador tiene una formulación especial para la correcta determinación de la resistina, la dilución debe ser de **al menos 1:5**.

Las concentraciones de resistina pueden ser completamente diferentes en fluidos corporales de origen humano que no sean suero o sobrenadantes de cultivo celular.

A efectos clínicos, se recomienda una dilución estándar de 1:21.

Protocolo de dilución sugerido:

Pipetee 300 µl de diluyente de calibrador en tubos de PE/PP (se recomienda aplicar un multistepper para series más grandes), añada 15 µl de suero o plasma (dilución 1:21). Después de mezclarlos, utilice 2 x 100 µl de esta dilución en el ensayo.

RECOMENDACIONES TÉCNICAS

El ensayo debe realizarse siguiendo estrictamente el protocolo de la prueba indicado aquí.

No pueden mezclarse reactivos de distintos números de lote. La placa de microvaloración y los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada si se guardan sin abrir y se protegen de la luz solar a 2-8 °C.

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (20-25 °C) antes de usarse. Las posibles precipitaciones en los tampones deben disolverse antes de usar mezclándolos o calentándolos.

Una incubación a temperatura ambiente significa: 20-25 °C

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.

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

Calibradores y control

Para la reconstitución de los **calibradores 1-5** liofilizados se debe utilizar el **diluyente de calibrador**.

Los **controles** liofilizados deben reconstituirse con el **tampón de dilución**. La dilución del **control en el diluyente de calibrador** debe hacerse según la dilución de las muestras respetadas.

Se recomienda conservar los reactivos reconstituídos a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego mezclarlos completamente pero con suavidad (no debe formarse espuma) con un agitador tipo vórtex.

El calibrador y los controles reconstituídos pueden conservarse durante 4 semanas a -20 °C. Evite los ciclos repetidos de congelación/descongelación.

Conjugado de HRP y conjugado de biotina

Utilice el tampón de dilución para la dilución de los conjugados de biotina y HRP concentrados 100 veces. Las soluciones diluidas solo son estables a 2-8 °C y deben prepararse de nuevo cada día.

Tampón de lavado

El volumen necesario de tampón de lavado se prepara diluyendo a 1:20 el concentrado 20 veces suministrado con agua destilada. El tampón de lavado diluido será estable durante 4 semanas a 2-8 °C. Para usarse debe estar a temperatura ambiente.

Placa de microvaloración

Guarde las tiras y los pocillos de microvaloración sin usar junto con el desecante en la bolsa hermética con cierre de clip a 2-8 °C y utilícelos en el marco suministrado. Si se conserva adecuadamente, la fecha de caducidad indicada no se ve afectada.

Sustrato de cromógeno

El sustrato de cromógeno, la H₂O₂-tetrametilbencidina estabilizada, es fotosensible; consérvelo e incúbelo en un lugar oscuro.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

NOTAS: Todas las determinaciones (calibradores, control y muestras) deben analizarse por duplicado. Se recomienda un pipeteo preciso y la adherencia al protocolo para obtener unos resultados óptimos.

Al realizar el ensayo, los calibradores, los controles y las muestras deben pipetearse lo más rápido posible (p. ej. < 15 minutos). Para evitar diferencias en los tiempos de incubación, deberá añadirse a la placa el **conjugado de biotina** y el de **HRP**, así como el **sustrato cromogénico** subsiguiente 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.

- 1) Añadir **100 µl de diluyente de calibrador** en los pocillos A1/A2 (blanco) y
- 2) Pipetee en las posiciones B1/2 **100 µl del calibrador 1** (0,02 ng/ml)
Pipetee en las posiciones C1/2 **100 µl del calibrador 2** (0,1 ng/ml)
Pipetee en las posiciones D1/2 **100 µl del calibrador 3** (0,3 ng/ml)
Pipetee en las posiciones E1/2 **100 µl del calibrador 4** (0,6 ng/ml)
Pipetee en las posiciones F1/2 **100 µl del calibrador 5** (1 ng/ml)
- 3) Para controlar el correcto cumplimiento de 100 µl de la proporción 1:21 (o en la proporción de dilución respectiva de la muestra) **en el diluyente de calibrador, los controles 1 y 2** diluidos se pueden pipetear en las posiciones G1/2.
Pipetee **100 µl** de la **muestra diluida** (p. ej. diluya 1:21 con el diluyente de calibrador) en el resto de los pocillos, según lo requiera.
- 4) Cubra los pocillos con cinta selladora e incube la placa durante **2 horas a temperatura ambiente** (agitar a ≥ 350 rpm). Después de la incubación, aspire el contenido de los pocillos y lávelos 5 veces con **300 µl de tampón de lavado/pocillo**.
- 5) Tras el último paso de lavado, pipetee **100 µl** de la proporción 1:100 con **conjugado de biotina** diluido **en tampón de dilución** en cada pocillo e incube **1 hora a temperatura ambiente** (agitar a ≥350 rpm).
- 6) Después de la incubación, lave los pocillos 5 veces con **tampón de lavado** tal como se describe en el paso 4.
- 7) Tras el último paso de lavado, pipetee **100 µl** de la proporción 1:100 con **conjugado de HRP** diluido en tampón de dilución en cada pocillo e incube la placa **30 minutos a temperatura ambiente** (agitar a ≥350 rpm).
- 8) Después de la incubación, lave los pocillos 5 veces con tampón de lavado tal como se describe en el paso 4.
- 9) Pipetee **100 µl del sustrato cromogénico de TMB** en todos los pocillos.
- 10) Incube la placa durante **30 minutos** en un lugar oscuro a **temperatura ambiente**.
- 11) Detenga la reacción añadiendo **100 µl de solución de parada** a todos los pocillos.
- 12) Mida la absorbancia antes de **30 minutos a 450 nm** (filtro de referencia: 620 nm).

ESTABLECIMIENTO DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Para la evaluación del ensayo es condición previa que los valores de la absorbancia del blanco se encuentren por debajo de 0,3 OD, y los del calibrador 5 deberían estar por encima de 0,8 OD.

Las muestras que arrojen valores de absorbancia más altos que los del calibrador 5 estarán por encima de la curva de calibración. Para una determinación fiable, deberán volverse a analizar con una dilución más alta.

Los calibradores suministrados contienen las siguientes concentraciones de resistina:

Calibrador	1	2	3	4	5
ng/ml	0,02	0,10	0,30	0,60	1,00
pg/ml	20	100	300	600	1000

- 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 todos los otros valores
- 3) Trace las concentraciones de calibrador 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**, 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 resistina** de la muestra diluida o del control diluido en ng/ml (o µg/ml según la unidad escogida para los calibradores) se calcula de este modo, la concentración de resistina de la **muestra sin diluir** y del control se calcula **multiplicando por el factor de dilución respectivo**.

Curva de calibración

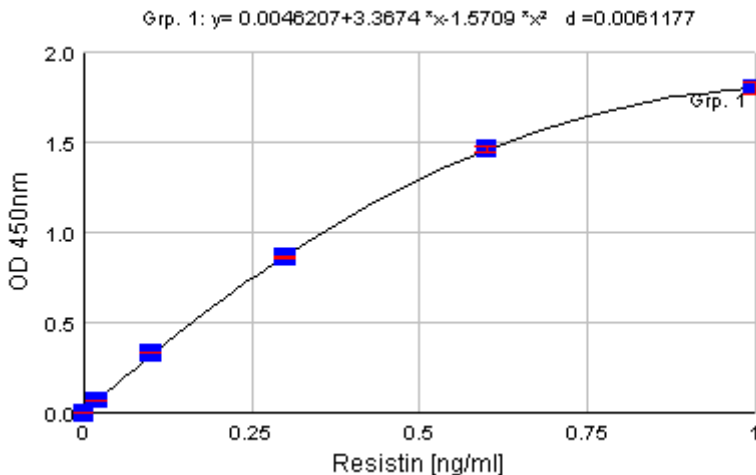


Fig. 1. Curva de calibración de ejemplo con un ajuste de curva polinomial de 2º grado.

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

Ejemplo de cálculo de la concentración de resistina de una muestra diluida a 1:21:

Extinción medida de su muestra 0,85
Extinción medida del blanco 0,05

Su programa de medida calculará la concentración de resistina 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 2º grado).

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

$$y = 0,0046207 + 3,3674 x - 1,5709 x^2$$

$$0,2686 = x$$

Si se tiene en cuenta el factor de dilución (1:21), la concentración de resistina de la muestra sin diluir es:

$$0,2686 \times 21 = 5,64 \text{ ng/ml} = 0,00564 \text{ µg/ml}$$

EFICACIA DIAGNÓSTICA

Calibradores

Los calibradores está preparados a partir de resistina humana recombinante (19,5 kDa, 2 x 92 aminoácidos, expresados en E. coli) en concentraciones de 20, 100, 300, 600 y 1000 µg/ml (picogramo/ml, igual a 0,02 ng/ml-1 ng/ml).

Sensibilidad

La sensibilidad **analítica del ensayo** arroja 0,012 ng/ml (12 pg/ml; 2x la DE del calibrador cero en la determinación de 15 veces).

Especificidad

En este sistema de ensayo se diluyeron (1:10) y se utilizaron como muestras sueros comercializados de bovino, gato, pollo, perro, burro, cabra, cobaya, caballo, ratón, cerdo, conejo, rata y oveja, y se midió la intensidad de la señal. No se detectó reactividad cruzada.

Interferencia

Se investigó la interferencia de sustancias fisiológicas con la medición de la resistina. Se enriquecieron muestras de suero con diferentes concentraciones de sustancias que podían interferir, y la cantidad de resistina se midió y comparó con la concentración de resistina en la misma muestra sin enriquecer. Los resultados relativos se muestran en la tabla 1. Ninguna de las sustancias analizadas interfirieron significativamente en la medición de la resistina.

Tabla 1: Interferencia: Se enriquecieron tres muestras de suero con la cantidad indicada de la sustancia que podría interferir y se midieron. Se muestra el porcentaje de resistina de la muestra de suero nativa no enriquecida.

	Triglicéridos 100 mg/ml	Bilirrubina 100 µg/ml	Hemolizado 1000 µg/ml
Suero 1	101	93	94
Suero 2	115	99	99
Suero 3	104	103	147

Tabla 2: Se investigaron los efectos de los inhibidores de coagulación añadiendo las cantidades indicadas de inhibidores a PP enriquecida con 0,3 ng/ml de resistina. Se muestran las cantidades relativas de resistina medidas en muestras con inhibidor en comparación con el tampón de muestra (PP) con 0,3 ng/ml de resistina.

% de resistina en PP			
		Media (n=3)	<> ± DE
3,8 g/l	Citrato	94	7,67
0,0068 mol/l	EDTA	93	4,96
30 000 IE/l	Heparina	96	4,89

Reproducibilidad y precisión

Los coeficientes de variabilidad inter e intraensayo son inferiores a 6,6% y 5%, respectivamente. Las determinaciones de ejemplo se muestran en la tabla 3 y la tabla 4.

Tabla 3: Variación intraensayo

	Número de determinaciones	Valor medio (ng/ml)	Desviación estándar (ng/ml)	CV (%)
Muestra 1	26	2,91	0,16	5,55
Muestra 2	15	4,58	0,24	5,33
Muestra 3	17	4,60	0,23	5,04
Muestra 4	7	2,50	0,09	3,37
Muestra 5	23	4,09	0,27	6,67

Tabla 4: Variación interensayo (resultados de 11 determinaciones cada una)

	Número de determinaciones	Valor medio (ng/ml)	Desviación estándar (ng/ml)	CV (%)
Muestra 1	16	2,81	0,13	4,49
Muestra 2	15	4,79	0,24	4,97

Recuperación y linealidad

La dilución del DIAsource Resistin ELISA es auténtica en un rango muy amplio, la linealidad de las diluciones séricas es excelente en un rango muy amplio. (V. Tab.5).

Tabla 5: Recuperación y linealidad de la dilución de la muestra (resultados de las características de dos sueros diferentes)

Dilución	Muestra 1 (nativa 5,5 ng/ml)		Muestra 2 (nativa 2,25 ng/ml)	
	más 5 ng/ml	Recuperación (%)	más 12,25 ng/ml	Recuperación (%)
1:50	9,71	92,5	14,99	103,4
1:100	10,60	101,0	13,64	94,1
1:200	10,44	99,4	14,10	97,2
1:400	10,32	98,3	14,33	98,8

Se añadió resistina humana recombinante a diferentes sueros en concentraciones diversas (p. ej. Tabla 6) La recuperación de resistina arrojó una media del 98% de la cantidad esperada en teoría.

Tabla 6: Las muestras se enriquecieron con 0,3 ng/ml de resistina y se midieron en comparación con muestras no enriquecidas. Se muestra la recuperación relativa de la resistina añadida.

Matriz	Dilución	% Recuperación
Líquido cerebroespinal	1:2	129
Líquido cerebroespinal	1:10	93
Líquido cerebroespinal	1:40	103
Líquido amniótico	1:10	85
Líquido amniótico	1:40	91
Saliva	1:10	99
Saliva	1:21	86
Orina	1:10	79
Orina	1:21	85
Leche materna	1:2	97
Leche materna	1:10	58
Leche materna	1:21	63
Sobrenadante de cultivo celular	1:2	100

EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Tabla 7: Los valores esperados para la resistina se determinaron con el ELISA de DIASource en donantes sanos y fueron analizados por el Prof. Dr. J. Kratzsch, Departamento de Medicina de Laboratorio, Hospital Universitario de Leipzig.

Mujer				Resistina (ng/ml):		
Edad (años):	n:	VP edad:	VP IMC:	VP ± DE:	25 - 75. Percentil:	Mín. - Máx.:
18 - 30	96	23,0	23,1	7,2 ± 2,6	5,4 - 8,8	3,1 - 14,7
31 - 40	63	36,5	24,3	8,1 ± 2,3	6,4 - 9,6	3,6 - 13,1
41 - 50	67	44,9	24,8	7,3 ± 2,5	5,7 - 8,1	4,0 - 16,1
51 - 60	29	54,7	25,0	7,2 ± 2,6	5,4 - 8,5	4,0 - 15,5
61 - 65	9	62,7	25,2	6,6 ± 1,1	6,0 - 6,7	5,4 - 9,3
Hombre				Resistina (ng/ml):		
Edad (años):	n:	VP edad:	VP IMC:	VP ± DE:	25 - 75. Percentil:	Mín. - Máx.:
18 - 30	107	23,9	24,1	6,4 ± 1,8	5,0 - 7,6	2,5 - 13,1
31 - 40	59	35,9	25,0	6,7 ± 3,2	4,8 - 7,4	3,8 - 26,9
41 - 50	66	45,0	25,2	6,5 ± 2,8	4,5 - 7,4	2,4 - 16,7
51 - 60	36	54,8	26,4	6,1 ± 2,1	4,7 - 7,2	3,2 - 13,3
61 - 68	20	63,2	25,6	7,2 ± 1,8	6,0 - 8,2	4,5 - 11,2

n = número de probandos VP = valor promedio IMC = índice de masa corporal (kg/m²) DE = desviación estándar

Tabla 8: Resumen de los valores esperados

Sexo	Número	Media [ng/ml]	Desviación estándar	2,5. Percentil	9,5. Percentil
Hombre	288	6,48	2,44	3,32	11,68
Mujer	264	7,41	2,47	3,68	13,60
Total	552	6,93	2,49	3,58	13,12

BIBLIOGRAFÍA / LITERATURA

1. Nakano, Y., et al., *Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma*. J Biochem (Tokyo), 1996. **120**(4): p. 803-12.
2. Pajvani, U.B., et al., *Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/Resistin. Implications for metabolic regulation and bioactivity*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9073-85.
3. Tsao, T.S., et al., *Role of disulfide bonds in Acrp30/Resistin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways*. J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 50810-17.
4. Shimada, K., T. Miyazaki, and H. Daida, *Resistin and atherosclerotic disease*. Clin Chim Acta, 2004. **344**(1-2): p. 1-12.
5. Higashiura, K., et al., *Correlations of Resistin level with insulin resistance and atherosclerosis in Japanese male populations*. Clin Endocrinol (Oxf), 2004. **61**(6): p. 753-9.
6. Spranger, J., et al., *Resistin is independently associated with insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome*. Clin Endocrinol (Oxf), 2004. **61**(6): p. 738-46.
7. Zoico, E., et al., *Adipocytokines, fat distribution, and insulin resistance in elderly men and women*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2004. **59**(9): p. M935-9.
8. Ye, J.M., et al., *PPARalpha /gamma ragaglitazar eliminates fatty liver and enhances insulin action in fat-fed rats in the absence of hepatomegaly*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **284**(3): p. E531-40.
9. Yamauchi, T., et al., *Resistin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1288-95.
10. Blüher (Blueher), M., et al., *Total and high-molecular weight Resistin in relation to metabolic variables at baseline and in response to an exercise treatment program: comparative evaluation of three assays*. Diabetes Care, 2007. **30**(2): p. 280-5.
11. Delaigle, A.M., et al., *Induction of Resistin in skeletal muscle by inflammatory cytokines: in vivo and in vitro studies*. Endocrinology, 2004. **145**(12): p. 5589-97.
12. Winzer, C., et al., *Plasma Resistin, insulin sensitivity, and subclinical inflammation in women with prior gestational diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2004. **27**(7): p. 1721-7.
13. Xydakis, A.M., et al., *Resistin, inflammation, and the expression of the metabolic syndrome in obese individuals: the impact of rapid weight loss through caloric restriction*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(6): p. 2697-703.
14. Motoshima, H., et al., *Resistin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **315**(2): p. 264-71.
15. Wolf, A.M., et al., *Resistin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **323**(2): p. 630-5.
16. Okamoto, Y., et al., *Resistin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Circulation, 2002. **106**(22): p. 2767-70.
17. Schlegel, A., *Resistin and risk of coronary heart disease*. Jama, 2004. **292**(1): p. 40; author reply 40.
18. Choi, K.M., et al., *Inflammation, Insulin Resistance, and Glucose Intolerance in Acute Myocardial Infarction Patients without a Previous Diagnosis of Diabetes Mellitus*. J Clin Endocrinol Metab, 2004.
19. Nakamura, Y., et al., *Implications of plasma concentrations of Resistin in patients with coronary artery disease*. Heart, 2004. **90**(5): p. 528-33.
20. Pischon, T., et al., *Plasma Resistin levels and risk of myocardial infarction in men*. Jama, 2004. **291**(14): p. 1730-7.
21. Shibata, R., et al., *Resistin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling*. J Biol Chem, 2004. **279**(27): p. 28670-4.
22. Fernandez-Real, J.M., et al., *Resistin is associated with vascular function independent of insulin sensitivity*. Diabetes Care, 2004. **27**(3): p. 739-45.

Resumen del ensayo

Preparación de los reactivos:	Reconstitución:	Dilución:
Calibradores 1 - 5	en 750 µl de diluyente de calibrador	
Control 1	en 250 µl de tampón de dilución	1:21 con el diluyente de calibrador
Control 2	en 250 µl de tampón de dilución	1:21 con el diluyente de calibrador
Conjugado de biotina		1:100 con tampón de dilución
Conjugado de HRP		1:100 con tampón de dilución
Tampón de lavado		1:20 con agua destilada (p. ej. añadir el contenido completo del frasco (50 ml) en un frasco graduado y llenarlo con agua destilada (hasta 100 ml).
Dilución de la muestra: 1:21 (p. ej. 15 µl de suero con 300 µl de diluyente de calibrador).		

Procedimiento del ensayo en determinación doble

Pipeteo	Reactivos	Posición
100 µl	Diluyente de calibrador (valor en blanco)	A1/2
100 µl	Calibrador 1 (0,02 ng/ml)	B1/2
100 µl	Calibrador 2 (0,1 ng/ml)	C1/2
100 µl	Calibrador 3 (0,3 ng/ml)	D1/2
100 µl	Calibrador 4 (0,6 ng/ml)	E1/2
100 µl	Calibrador 5 (1,0 ng/ml)	F1/2
100 µl	Control 1 (diluido)	G1/2
100 µl	Control 2 (diluido)	H1/2
100 µl	Dilución de la muestra	Siguientes pocillos
Tape los pocillos con la cinta selladora.		
Incubación: 2 h a temp. ambiente, ≥ 350 rpm		
5x 300 µl	Aspire el contenido de los pocillos y lávelos 3 veces con 300 µl de tampón de lavado	Todos los pocillos
100 µl	1:100 de conjugado de biotina diluido	Todos los pocillos
Incubación: 1 h a temp. ambiente, ≥ 350 rpm		
5x 300 µl	Aspire el contenido de los pocillos y lávelos 3 veces con 300 µl de tampón de lavado	Todos los pocillos
100 µl	1:100 de conjugado de HRP diluido	Todos los pocillos
Incubación: 30 min a temp. ambiente, ≥ 350 rpm		
5x 300 µl	Aspire el contenido de los pocillos y lávelos 3 veces con 300 µl de tampón de lavado	Todos los pocillos
100 µl	Sustrato de cromógeno	Todos los pocillos
Incubación: 30 min en un lugar oscuro a temp. ambiente		
100 µl	Solución de parada	Todos los pocillos
Mida la absorbancia antes de 30 min a 450 nm con 620 nm como longitud de onda de referencia.		

Fecha de revisión: 2020-02-24