

# **Adiponectin Elisa**

***KAPME09***





# History

---

## Summary of change :

| Previous Version :                                                              | Current Version :                                                       |
|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 231222                                                                          | 250703                                                                  |
| <b>5.6 Sample dilution</b><br>Suppression of alternative sample dilution method | Update of the hazard warnings in the "Warnings and Precautions" section |



# Adiponectin-ELISA

Enzyme Immunoassay for the Quantitative Determination of human Adiponectin  
in serum and plasma

KAPME09

*IN VITRO DIAGNOSTIC USE*

en

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

| 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,<br>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<br>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: **Controls 1 and 2 CONTROL N, and Calibrators 1-5 CAL N.**

Source human serum for the controls 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.

#### 4.1 Components

All components of the product that contain hazardous substances in declarable concentrations in accordance with European Regulation 1272/2008 are listed below:

##### Dilution Buffer *DIL BUF* Antibody-Conjugate *Ab BIOT SAV HRP*

The buffers contain the hazardous ingredients listed below, based on this the following labeling of the two mixtures results:

Hazard pictograms (CLP):



GHS07

Signal word (CLP):

Warning

Hazardous components:

2-methylisothiazol-3(2H)-one (< 0,06 %)  
reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1) (< 0,015 %)

Hazard statements (CLP):

H317 - May cause an allergic skin reaction.

Safety instructions (CLP):

P280 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection/hearing 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 Water.  
P501 - Dispose of contents/container in accordance with national disposal regulations.

##### Washing Buffer *WASH SOLN CONC*

The buffer contains a mixture of 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one (< 0.015 %) as a preservative.

EUH208 Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1).

May produce an allergic reaction.

EUH210 Safety data sheet available on request.

##### Stop Solution *STOP SOLN*

The stop solution contains 0.2 M sulphuric acid.

EUH210 Safety data sheet available on request.

#### 4.2 Protective equipment and first aid measures

After contact with skin: Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water or shower. In case of skin reactions, consult a physician.

After contact with eyes: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. In case of eye irritation consult an ophthalmologist.

After ingestion: Call a doctor if you feel unwell.

Avoid contact with the ingredients. Detailed information on personal protective equipment and first aid measures can be found in the safety data sheet for Adiponectin ELISA. This can be accessed electronically via the DIAsource website at <https://diasource-diagnostics.com/> or will be made available on request via [products.support@diasource.be](mailto:products.support@diasource.be).

## 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 2×100 µL from this **1:310** diluted sample in the assay.
- 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)    |             |      |      | <b>Microtiter plate</b> , ready for use, coated with mouse-anti-Adiponectin-antibody. Wells are separately breakable (8x12) wells                     |      |                                                                                                                                         |     |                                                                                                                                                                  |
| 2)    | CAL                                                                                          | N    |      | <b>Cal N</b> , lyophilized (native human adiponectin), concentrations are given on vial labels and on quality certificate in ng/ml. <b>5 x 750 µl</b> |      |                                                                                                                                         |     |                                                                                                                                                                  |
| 3)    | CONTROL                                                                                      |      |      | <b>Control Serum 1 &amp; 2</b> , lyophilized (human serum), concentration is given on quality certificate in ng/ml. <b>2 x 500 µl</b>                 |      |                                                                                                                                         |     |                                                                                                                                                                  |
| 4)    | <table border="1"><tr><td>Ab</td><td>BIOT</td></tr><tr><td>SAV</td><td>HRP</td></tr></table> |      |      | Ab                                                                                                                                                    | BIOT | SAV                                                                                                                                     | HRP | <b>Antibody-Conjugate, 12 ml, ready for use</b> , mouse-anti-hAdiponectin-antibody biotinylated + streptavidin horseradish peroxidase conjugat. <b>1 x 12 ml</b> |
| Ab    | BIOT                                                                                         |      |      |                                                                                                                                                       |      |                                                                                                                                         |     |                                                                                                                                                                  |
| SAV   | HRP                                                                                          |      |      |                                                                                                                                                       |      |                                                                                                                                         |     |                                                                                                                                                                  |
| 5)    | DIL                                                                                          | BUF  |      | <b>Dilution buffer</b> , ready for use. <b>1 x 125 ml</b>                                                                                             |      |                                                                                                                                         |     |                                                                                                                                                                  |
| 6)    | WASH                                                                                         | SOLN | CONC | <b>Washing Buffer</b> , 20-fold concentrated solution. <b>1 x 50 ml</b>                                                                               |      |                                                                                                                                         |     |                                                                                                                                                                  |
| 7)    | <table border="1"><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td></tr></table>                                |      |      | CHROM                                                                                                                                                 | TMB  | <b>Chromogenic Substrate</b> , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP)-substrate, stabilised Tetramethylbencidine. <b>1 x 12 ml</b> |     |                                                                                                                                                                  |
| CHROM | TMB                                                                                          |      |      |                                                                                                                                                       |      |                                                                                                                                         |     |                                                                                                                                                                  |
| 8)    | <table border="1"><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table>                                |      |      | STOP                                                                                                                                                  | SOLN | <b>Stopping Solution</b> , ready for use, 0.2 M sulphuric acid , <b>1 x 12 ml</b>                                                       |     |                                                                                                                                                                  |
| STOP  | SOLN                                                                                         |      |      |                                                                                                                                                       |      |                                                                                                                                         |     |                                                                                                                                                                  |
| 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-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 <b>750 µL</b> Dilution Buffer                    | -                                        |
| Control Sera                                                                   |                                                                                                      | in <b>500 µL</b> Dilution Buffer                    | <b>1:310</b> with <b>Dilution buffer</b> |
| Washing Buffer                                                                 |                                                                                                      | -                                                   | <b>1:20</b> with <b>Aqua dest.</b>       |
| Sample dilution: with Dilution Buffer <b>1:310</b>                             |                                                                                                      |                                                     |                                          |
| Before assay procedure bring all reagents to room temperature <b>20-25°C</b> . |                                                                                                      |                                                     |                                          |
| Assay Procedure in Double Determination:                                       |                                                                                                      |                                                     |                                          |
| Pipette                                                                        | Reagents                                                                                             | Position                                            |                                          |
| 100 µL                                                                         | Dilution Buffer ( <b>Blank</b> )                                                                     | A1/A2                                               |                                          |
| 100 µL                                                                         | Calibrator <b>1 (2 ng/mL)</b>                                                                        | B1/B2                                               |                                          |
| 100 µL                                                                         | Calibrator <b>2 (10 ng/mL)</b>                                                                       | C1/C2                                               |                                          |
| 100 µL                                                                         | Calibrator <b>3 (30 ng/mL)</b>                                                                       | D1/D2                                               |                                          |
| 100 µL                                                                         | Calibrator <b>4 (70 ng/mL)</b>                                                                       | E1/E2                                               |                                          |
| 100 µL                                                                         | Calibartor <b>5 (100 ng/mL)</b>                                                                      | F1/F2                                               |                                          |
| 100 µL                                                                         | Control Serum <b>1</b> (1:310 diluted)                                                               | G1/G2                                               |                                          |
| 100 µL                                                                         | Control Serum <b>2</b> (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: <b>1 h at 20-25°C, 350 rpm</b>                              |                                                                                                      |                                                     |                                          |
| 3 x 300 µL                                                                     | Aspirate the contents of the wells and <b>wash</b> 3 x with 300 µL each Washing Buffer / <b>well</b> |                                                     | In each well                             |
| 100 µL                                                                         | Antibody-POD-Conjugate                                                                               |                                                     | In each well                             |
| Cover the wells with the sealing tape.                                         |                                                                                                      |                                                     |                                          |

|                                                      |                                                                                                      |              |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>Incubation: 30 Minutes at 20-25°C, 350 rpm</b>    |                                                                                                      |              |
| 3 x 300 µL                                           | Aspirate the contents of the wells and <b>wash</b> 3 x with 300 µL each Washing Buffer / <b>well</b> | In each well |
| 100 µL                                               | Substrate Solution                                                                                   | In each well |
| <b>Incubation: 15 Minutes in the Dark at 20-25°C</b> |                                                                                                      |              |
| 100 µL                                               | Stopping Solution                                                                                    | In each well |
|                                                      | Measure the absorbance within 30 min at <b>450 nm</b> with $\geq 590$ 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

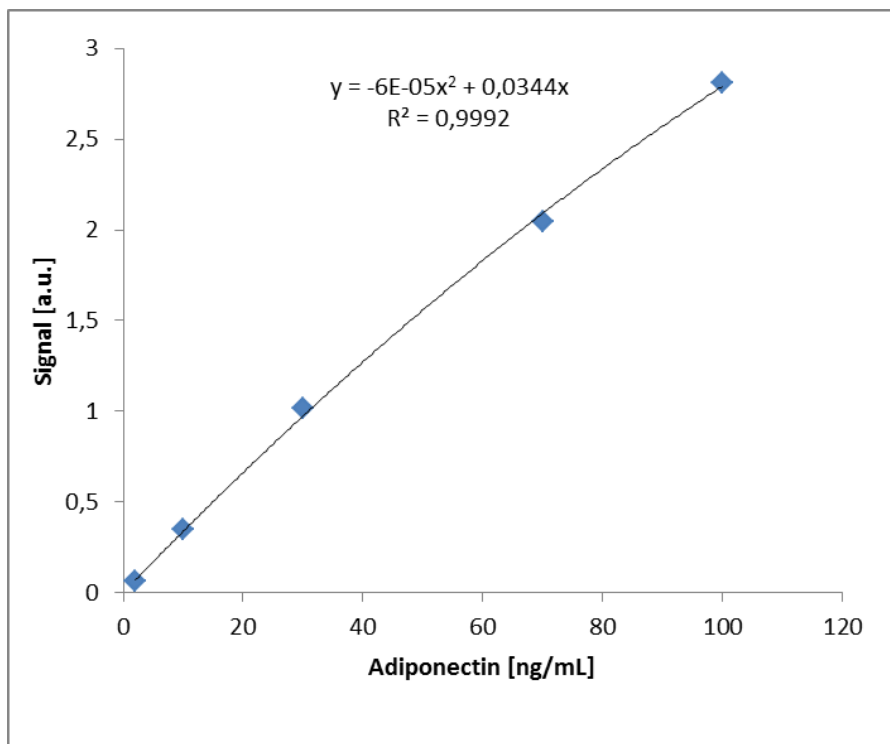
| Calibrator | 1 | 2  | 3  | 4  | 5   |
|------------|---|----|----|----|-----|
| ng/mL      | 2 | 10 | 30 | 70 | 100 |

- 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 <sub>(450-620 nm)</sub> | 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 2<sup>nd</sup> 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 <sup>th</sup> Percentile [µg/ml] | 95 <sup>th</sup> Percentile [µg/ml] |
|--------|------------|--------------|----------------|--------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Female | 101        | <b>10.2</b>  | 9.1            | 4.6                | 4.0                                | 19.4                                |
| Male   | 125        | <b>6.8</b>   | 6.1            | 4.1                | 2.0                                | 13.9                                |
| total  | 226        | <b>8.3</b>   | 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 <sup>th</sup> Percentile [µg/ml] | 95 <sup>th</sup> Percentile [µg/ml] |
|--------|------------|--------------|----------------|--------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Female | 131        | <b>8.71</b>  | 8.18           | 4.32               | 3.05                               | 15.6                                |
| Male   | 134        | <b>8.97</b>  | 8.12           | 5.13               | 3.36                               | 18.6                                |
| total  | 265        | <b>8.84</b>  | 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         | <b>12.82</b> | 11.7           | 2.33                  | 26.5                   |
| 8 – 9.99      | 40         | <b>8</b>     | 8.09           | 3.96                  | 14.9                   |
| 10-11.99      | 55         | <b>8.02</b>  | 7.14           | 3.36                  | 13.8                   |
| 12 – 13.99    | 26         | <b>8.21</b>  | 7.54           | 4.5                   | 13.2                   |
| 14 – 15.99    | 59         | <b>8.12</b>  | 8.09           | 3.67                  | 13.7                   |
| 16 – 19.99    | 41         | <b>7.97</b>  | 7.79           | 2.74                  | 13.3                   |
| alle          | 267        | <b>8.88</b>  | 8.18           | 3.33                  | 16.7                   |
| 20 – 29.99    | 47         | <b>6.72</b>  | 6.38           | 2.50                  | 12.25                  |
| 30 – 39.99    | 38         | <b>7.38</b>  | 6.69           | 1.98                  | 19.29                  |
| 40 – 49.99    | 55         | <b>8.42</b>  | 8.20           | 2.41                  | 17.85                  |
| 50 – 59.99    | 47         | <b>9.61</b>  | 8.55           | 2.15                  | 19.85                  |
| > 60          | 32         | <b>9.52</b>  | 8.57           | 3.00                  | 21.10                  |
| alle          | 226        | <b>8.33</b>  | 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 | --           | <b>29.80 ± 12.49</b> | 26.1     | 19.5 -35.2           | 16.9 - 61.4  |
| < 3.99             | 9  | 15.73 ± 0.79 | <b>14.43 ± 7.76</b>  | 11.2     | 8.2 - 21.8           | 2.3 - 26.7   |
| 4.0 - 7.99         | 11 | 16.01 ± 1.94 | <b>8.46 ± 4.73</b>   | 9.3      | 2.9 - 12.1           | 1.4 - 15.6   |
| 8.0 - 9.99         | 22 | 17.58 ± 3.84 | <b>7.92 ± 3.00</b>   | 8.2      | 5.2 - 10.0           | 3.6 - 15.1   |
| 10.0 - 11.99       | 33 | 17.83 ± 1.86 | <b>7.66 ± 4.59</b>   | 6.6      | 5.0 - 8.8            | 3.1 - 20.9   |
| 12.0 - 13.99       | 11 | 19.85 ± 2.31 | <b>8.22 ± 5.64</b>   | 7.5      | 6.5 - 9.2            | 4.9 - 13.2   |
| 14.0 - 15.99       | 27 | 19.91 ± 1.72 | <b>8.83 ± 9.25</b>   | 8.9      | 5.2 - 11.8           | 2.6 - 17.7   |
| 16.0 – 19.99       | 18 | 21.64 ± 2.64 | <b>9.00 ± 3.22</b>   | 8.7      | 6.9 - 11.2           | 2.7 - 14.0   |
| 20.0 - 29.99       | 24 | 23.12 ± 5.01 | <b>7.39 ± 3.35</b>   | 7.3      | 5.7 - 9.0            | 3.4 - 17.8   |
| 30.0 - 39.99       | 17 | 23.20 ± 2.86 | <b>9.19 ± 3.89</b>   | 8.6      | 7.2 - 10.4           | 3.6 - 19.3   |
| 40.0 - 49.99       | 26 | 24.50 ± 4.11 | <b>9.93 ± 3.59</b>   | 9.5      | 7.5 - 11.6           | 4.4 - 19.6   |
| 50.0 - 59.99       | 21 | 24.61 ± 3.31 | <b>11.5 ± 5.49</b>   | 10.0     | 8.0 - 15.9           | 2.0 - 23.1   |
| >60.0              | 8  | 24.63 ± 1.89 | <b>15.6 ± 4.64</b>   | 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/m<sup>2</sup>) SD=Standard Deviation

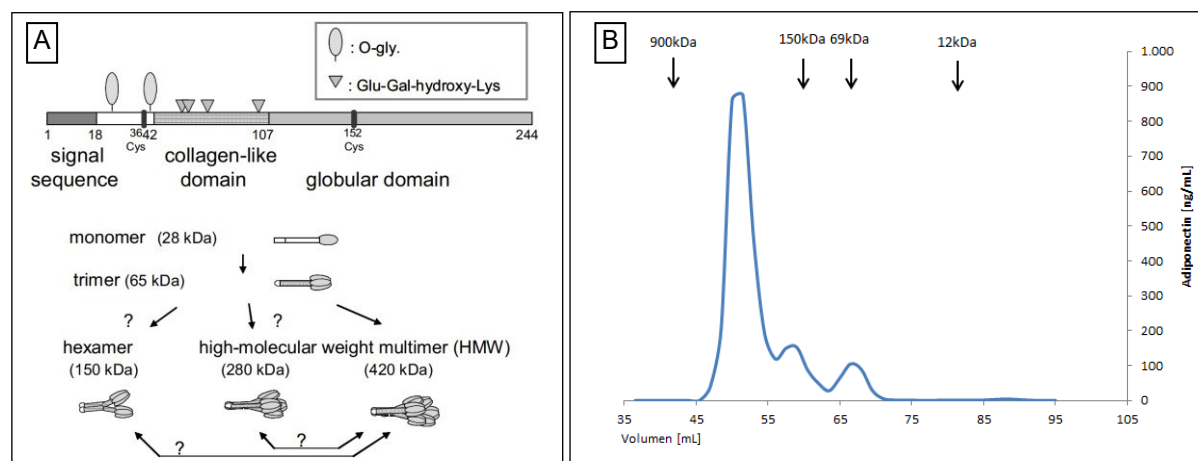
## 12. Performance Characteristics

### 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 al<sup>9</sup>). (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.

<sup>9</sup> 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       |

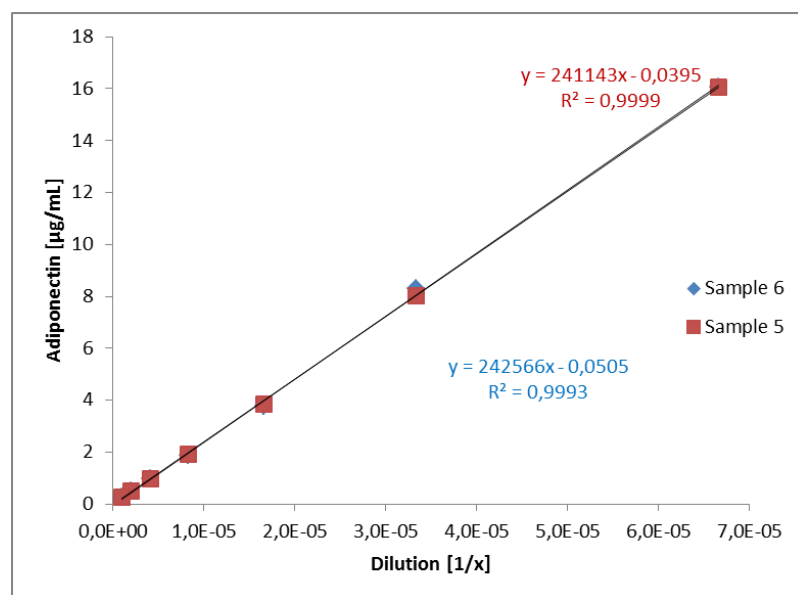
### Linearity

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   | <b>109</b> |
| 37.5                                    | 51.84           | 59.98   | <b>116</b> |
| 18.75                                   | 26.55           | 26.7    | <b>101</b> |
| 9.375                                   | 13.35           | 15.15   | <b>113</b> |

#### 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.

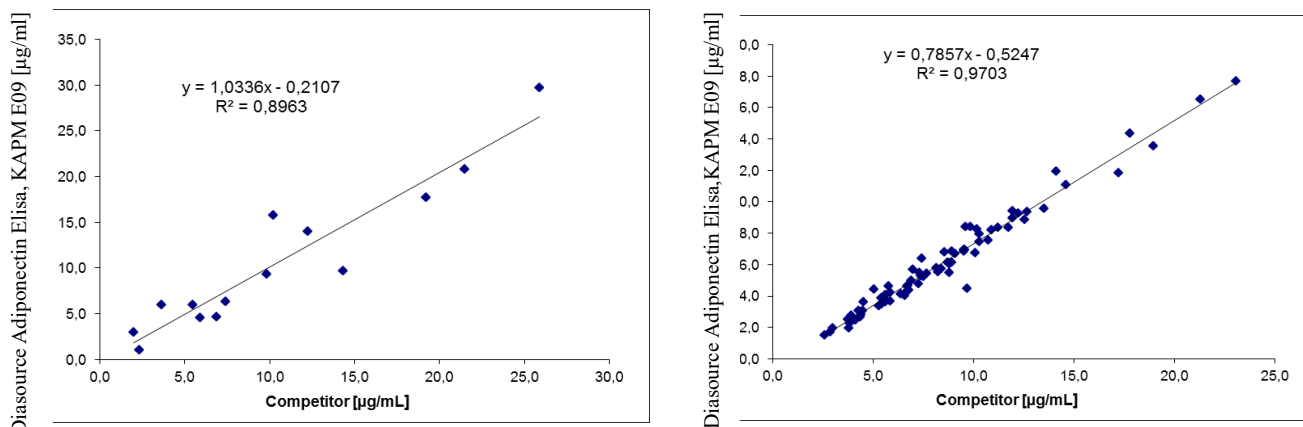
**Table 6** Interference. Serum samples were enriched with different amount of triglycerides, bilirubin or haemoglobin. The relative amount of adiponectin measured in comparison with native serum is shown here [%].

| Triglyceride<br>100 mg/mL | Bilirubin<br>100 µg/mL | Hemoglobin<br>1 mg/mL | Hemoglobin<br>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<br>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 : 2025-07-03]

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



# Adiponectin-ELISA

Enzimoimmunoensayo para la Determinación cuantitativa de adiponectina humana en Suero y plasma

KAPME09

IN VITRO DIAGNOSTIC USE

es

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

| 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 ditrímero, 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 DIASource solo es adecuado para diagnósticos in vitro y no para uso interno en seres humanos y animales. Siga estrictamente el protocolo de prueba. Utilice la versión válida del prospecto que se incluye con el kit. Asegúrese de que ha comprendido todo. DIASource no se hace responsable de ninguna pérdida o daño (salvo que lo exija la ley) causado por el incumplimiento de las instrucciones proporcionadas. Hay una ficha de datos de seguridad disponible bajo petición.

No utilice material que presente daños evidentes, esté contaminado por microorganismos o se haya derramado.

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

Se deben tomar las precauciones adecuadas y seguir las buenas prácticas de laboratorio en el almacenamiento, la manipulación y la eliminación de los reactivos del kit. La eliminación de los componentes del kit debe realizarse de acuerdo con la normativa local.

#### Suero humano

Los siguientes componentes contienen suero humano: **Controls 1 y 2 CONTROL N, y Calibrators 1-5 CAL N.**

El suero humano de origen de los controles proporcionados en este kit se ha analizado y se ha comprobado que no es reactivo al antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), al virus de la hepatitis C (VHC) y al virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2 (VIH). No existe ningún método conocido que pueda garantizar totalmente la ausencia de agentes infecciosos; por lo tanto, todos los componentes y las muestras de los pacientes deben tratarse como potencialmente infecciosos.

#### 4.1 Componentes

A continuación se enumeran todos los componentes del producto que contienen sustancias peligrosas en concentraciones declarables de conformidad con el Reglamento europeo 1272/2008:

##### Dilution Buffer *DIL BUF* Antibody-Conjugate *Ab BIOT SAV HRP*

Los tampones contienen los ingredientes peligrosos que se enumeran a continuación, por lo que el etiquetado de las dos mezclas es el siguiente:



Indicaciones de peligro (CLP):

GHS07

Palabra de advertencia (CLP):

Advertencia

Componentes peligrosos:

2-metilisotiazol-3(2H)-ona (< 0,06 %)

masa de reacción de 5-cloro-2-metil-2H isotiazol-3-ona y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona (3:1) (< 0,015 %)

Indicaciones de peligro (CLP):

H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Consejos de precaución (CLP):

P280 - Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección y protección auditiva.

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 abundante agua.

P501 - Eliminar el contenido/el recipiente de conformidad con la normativa nacional sobre eliminación.

##### Washing Buffer *WASH SOLN CONC*

El tampón contiene una mezcla de 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona y 2-metil-4-isotiazolin-3-ona (< 0,015 %) como conservante.

EUH208 Contiene masa de reacción de 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-ona y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona (3:1). Puede provocar una reacción alérgica.

EUH210 Existe disponible una Ficha de datos de seguridad bajo solicitud.

##### Stop Solution *STOP SOLN*

La solución de parada contiene ácido sulfúrico 0,2 M.

EUH210 Existe disponible una Ficha de datos de seguridad bajo solicitud.

#### 4.2 Protective equipment and first aid measures

Después del contacto con la piel: Qúitese inmediatamente toda la ropa contaminada. Enjuague la piel con agua o dúchese. En caso de reacciones cutáneas, consulte a un médico.

Después del contacto con los ojos: Enjuague cuidadosamente con agua durante varios minutos. Qúitese las lentes de contacto, si las lleva y es fácil hacerlo. Continúe enjuagando. En caso de irritación ocular, consulte a un oftalmólogo.

Después de la ingestión: Llame a un médico si se encuentra mal.

Evite el contacto con los ingredientes. En la ficha de datos de seguridad de Adiponectin ELISA encontrará información detallada sobre el equipo de protección personal y las medidas de primeros auxilios. Puede acceder a ella electrónicamente a través del sitio web de DIASource en <https://diasource-diagnostics.com/> o solicitarla a través de [products.support@diasource.be](mailto:products.support@diasource.be).

#### 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), añada **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 × 100 µl** de esta muestra diluida a **1:310** en el ensayo.
- 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) |  | <b>Placa de microvaloración</b> , lista para usar, recubierta con anticuerpo anti-adiponectina de ratón. Los pocillos se pueden separar en tiras de <b>(8 x 12) pocillos</b>                   |
| 2) | CAL N                                                                             | <b>Cal N</b> , liofilizado (adiponectina humana nativa); las concentraciones se facilitan en las etiquetas del vial y en el certificado de calidad en ng/ml. <b>5 x 750 µl</b>                 |
| 3) | CONTROL                                                                           | <b>Suero control 1 y 2</b> , liofilizado (suero humano); la concentración se facilita en el certificado de calidad en ng/ml. <b>2 x 500 µl</b>                                                 |
| 4) | Ab BIOT<br>SAV HRP                                                                | <b>Conjugado de anticuerpo</b> , 12 ml, listo para usar, conjugado de anticuerpo anti-adiponectina humana de ratón biotinilado + estreptavidina-peroxidasa de rábano picante. <b>1 x 12 ml</b> |
| 5) | DIL BUF                                                                           | <b>Tampón de dilución</b> , listo para usar. <b>1 x 125 ml</b>                                                                                                                                 |
| 6) | WASH SOLN CONC                                                                    | <b>Tampón de lavado</b> , solución concentrada 20 veces. <b>1 x 50 ml</b>                                                                                                                      |
| 7) | CHROM TMB                                                                         | <b>Sustrato cromogénico</b> , listo para usar, sustrato de peroxidasa de rábano picante (HRP), tetrametilbencidina estabilizada. <b>1 x 12 ml</b>                                              |
| 8) | STOP SOLN                                                                         | <b>Solución de parada</b> , lista para usar, ácido sulfúrico 0,2 M, <b>1 x 12 ml</b>                                                                                                           |
| 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 liofilizados 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.

N.º de catálogo: KAPME09

N.º de revisión: 250703

**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 pipetearse 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, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-tetrametilbencidina estabilizada, es fotosensible—consérvese e incube 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 <b>750 µl</b> de tampón de dilución | -                                          |
| Sueros control                                                                                                       |                                        | En <b>500 µl</b> de tampón de dilución | <b>1:310</b> con <b>tampón de dilución</b> |
| Tampón de lavado                                                                                                     |                                        | -                                      | <b>1:20</b> con <b>agua destilada</b>      |
| <b>Dilución de la muestra:</b> con tampón de dilución a <b>1:310</b>                                                 |                                        |                                        |                                            |
| Antes del procedimiento del ensayo todos los reactivos deben estar a una temperatura ambiente de <b>20 - 25 °C</b> . |                                        |                                        |                                            |
| <b>Procedimiento del ensayo en determinación doble:</b>                                                              |                                        |                                        |                                            |
| Pipetear                                                                                                             | Reactivos                              | Posición                               |                                            |
| 100 µl                                                                                                               | Tampón de dilución ( <b>blanco</b> )   | A1/A2                                  |                                            |
| 100 µl                                                                                                               | Calibrador <b>1 (2 ng/ml)</b>          | B1/B2                                  |                                            |
| 100 µl                                                                                                               | Calibrador <b>2 (10 ng/ml)</b>         | C1/C2                                  |                                            |
| 100 µl                                                                                                               | Calibrador <b>3 (30 ng/ml)</b>         | D1/D2                                  |                                            |
| 100 µl                                                                                                               | Calibrador <b>4 (70 ng/ml)</b>         | E1/E2                                  |                                            |
| 100 µl                                                                                                               | Calibrador <b>5 (100 ng/ml)</b>        | F1/F2                                  |                                            |
| 100 µl                                                                                                               | Suero control <b>1</b> (diluido 1:310) | G1/G2                                  |                                            |

|                                                            |                                                                                                                     |                                                       |
|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| 100 µl                                                     | Suero control <b>2</b> (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.                  |                                                                                                                     |                                                       |
| <b>Incubación de la muestra: 1 h a 20 - 25 °C, 350 rpm</b> |                                                                                                                     |                                                       |
| 3 x 300 µl                                                 | Aspire el contenido de los pocillos y <b>lave</b> 3 veces con 300 µl cada una con tampón de lavado / <b>pocillo</b> | En cada pocillo                                       |
| 100 µl                                                     | Conjugado de anticuerpo-POD                                                                                         | En cada pocillo                                       |
| Tape los pocillos con la cinta selladora.                  |                                                                                                                     |                                                       |

|                                                            |                                                                                                                     |                 |
|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| <b>Incubación: 30 minutos a 20 - 25 °C, 350 rpm</b>        |                                                                                                                     |                 |
| 3 x 300 µl                                                 | Aspire el contenido de los pocillos y <b>lave</b> 3 veces con 300 µl cada una con tampón de lavado / <b>pocillo</b> | En cada pocillo |
| 100 µl                                                     | Solución de sustrato                                                                                                | En cada pocillo |
| <b>Incubación: 15 minutos en la oscuridad a 20 - 25 °C</b> |                                                                                                                     |                 |
| 100 µl                                                     | Solución de parada                                                                                                  | En cada pocillo |
|                                                            | Mida la absorbancia antes de 30 min a <b>450 nm</b> con $\geq 590$ 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

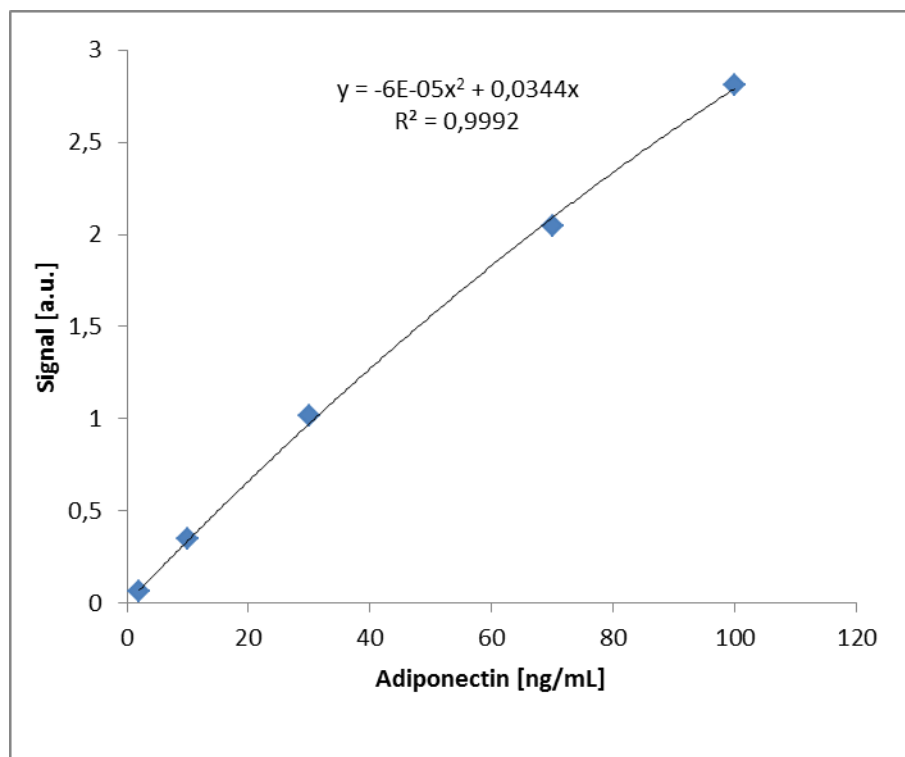
| Calibrador | 1 | 2  | 3  | 4  | 5   |
|------------|---|----|----|----|-----|
| ng/ml      | 2 | 10 | 30 | 70 | 100 |

- 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 <sub>(450-620 nm)</sub> | 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 2º grado).

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

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

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

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

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 reumatoídes 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

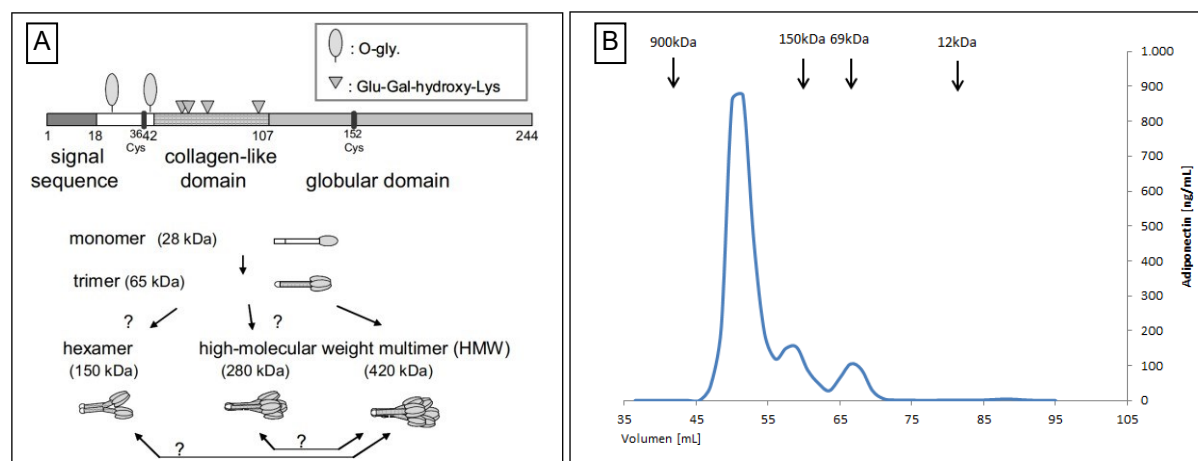
## 12. Eficacia diagnóstica

### 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 proteinéica 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.

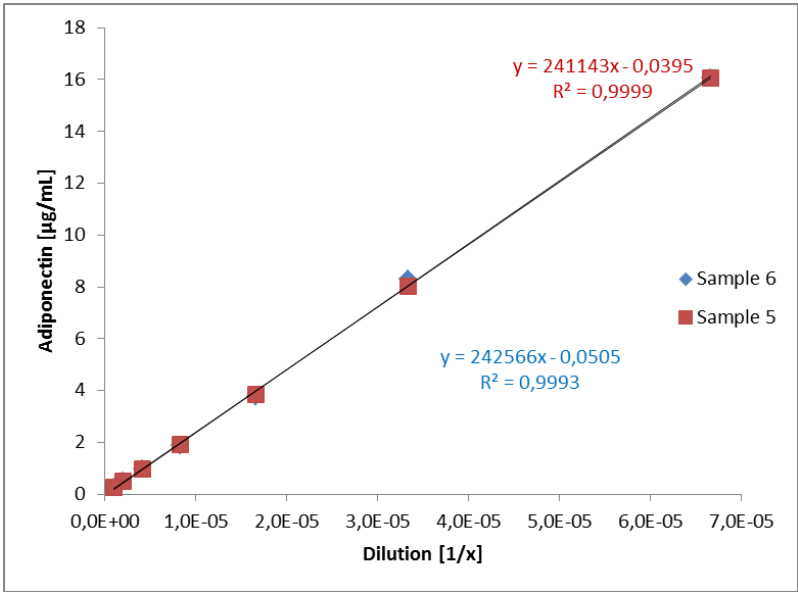


Figura 3 Linealidad. La concentración de adiponectina se midió en dos muestras humana diluidas de 1:1500 a 1:96000.

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.

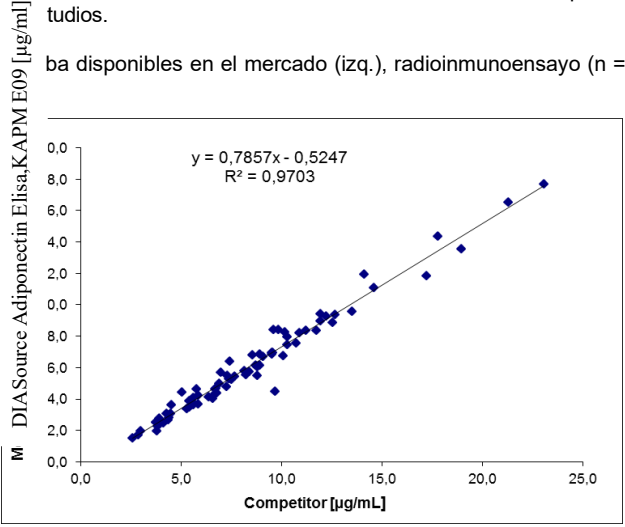
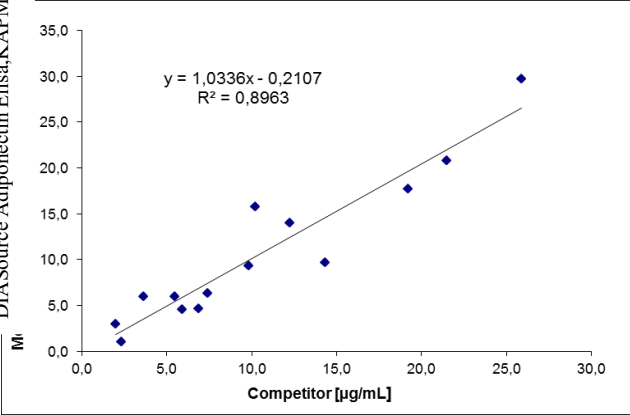
**Tabla 6 Interferencia.** Las muestras de suero se enriquecieron con distintas cantidades de triglicéridos, bilirrubina o hemoglobina. Aquí se muestra la cantidad relativa de adiponectina medida en comparación con suero nativo [%].

| Triglicéridos<br>100 mg/ml | Bilirrubina<br>100 µg/ml | Hemoglobina<br>1 mg/ml | Hemoglobina<br>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, desviación absoluta de los resultados de medida es diferente, se aplica un factor. En la figura 4 se muestran los resultados de ambas pruebas.

**Figura 4** Comparación del KAPME09 de DIASource con sistemas de prueba 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: 2025-07-03