

# **Resistin Elisa**

***KAPME50***



# History

---

## Summary of change :

| Previous Version :       | Current Version :                                                                                                       |
|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 230727                   | 250703                                                                                                                  |
| Outdated hazard warnings | Update of the hazard warnings in the<br>"WARNINGS AND PRECAUTIONS" section<br><br>Spanish translation has been included |



# Resistin-ELISA

Enzyme Immunoassay for the Quantitative Determination of human Resistin  
KAPME50  
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

## INTENDED USE

Measurement of human Resistin in human Serum and Plasma Sample

## INTRODUCTION

Resistin, a cysteine-rich protein of 11.3 kDa (1), was firstly found in mice (2) and constitutes together with RELM $\alpha$ , RELM $\beta$  and RELM $\gamma$  the protein family of resistin-like molecules (RELM).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

With optimized special sample buffer: reliable quantification of resistin - independent of the absolute content.

## REAGENTS PROVIDED

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

|     |   |
|-----|---|
| CAL | N |
|-----|---|

**Calibrators 1-5**, lyophilized: contain recombinant human Resistin. Calibrator values are given on vial labels and on quality certificate. **Reconstitute in 750  $\mu$ L Calibrator Diluent.**
- 3) 

|     |     |
|-----|-----|
| DIL | CAL |
|-----|-----|

**Calibrator Diluent**, 120 ml, ready for use.
- 4) 

|         |   |
|---------|---|
| CONTROL | N |
|---------|---|

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

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

**Biotin Conjugate**, 120  $\mu$ L, 100-fold concentrated solution, contains rabbit biotinylated anti-Resistin antibody, please dilute before use 1:100 in Dilution buffer.
- 6) 

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

**HRP Conjugate**, 120  $\mu$ L, 100-fold concentrated solution, contains HRP (Horseradish peroxidase)-labelled Streptavidin, please dilute before use **1:100** in **Dilution Buffer**.
- 7) 

|     |     |
|-----|-----|
| DIL | BUF |
|-----|-----|

**Dilution buffer**, 25 ml, ready for use.

- 8) 

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

**Washing Buffer**, 50 ml, 20-fold concentrated: Washing Buffer has to be diluted 1:20 with distilled or demineralised water before use.
- 9) 

|       |     |
|-------|-----|
| CHROM | TMB |
|-------|-----|

**Chromogenic Substrate**, 12 ml, ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP) substrate, stabilised Tetramethylbencidine.
- 10) 

|      |      |
|------|------|
| STOP | SOLN |
|------|------|

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

#### MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Distilled (Aqua destillata) or deionized water for dilution of the **Washing Buffer (A. dest.)**, 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  $\geq 590$  nm

#### 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.

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

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

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*

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.

#### 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* / Calibrator Diluent *DIL CAL* / Antibody Conjugate *BIOT CONJ CONC* / Enzyme Conjugate *SAV HRP CONC***

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):

Hazardous components:

Hazard statements (CLP):

Safety instructions (CLP):

Warning

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 %)

H317 - May cause an allergic skin reaction.

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.

**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 Resistin 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).

**METHOD**

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

**SPECIMEN**

Serum and Plasma

Serum as well plasma samples are suitable (significant deviation of Resistin levels in corresponding serum-, Heparin-, EDTA-, Citrate-plasma-Samples were not found. A possible dilution of the sample by the anticoagulant must be taken into account).

Haemolytic samples appear to show falsely high Resistin levels, using such samples should be checked out critically.

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

**Specimen collection**

Use standard venipuncture for the blood sampling. Haemolytic reactions are to be avoided.

**Required sample volume: 15 µL****Sample stability**

In firmly closable plastic tubes.

Storage at 20-25°C max. 2 days

Storage at -20°C max. 2 years

The storage of samples, over a period of 2 years at -20°C, showed no effect on the measured value. Freeze/thaw cycles of samples should be minimized.

**Interference**

Triglyceride, bilirubin and hemolysate in the sample do not interfere to a concentration of 100 mg/mL and 100 µg/mL or 1 mg/mL. However, the use of hemolytic, lipemic or icteric samples should be validated by the user.

**Sample Preparation**

- Dilution: 1:21 with **Calibrator Diluent**
- Pipette 300 µL Calibrator Diluent in PE-/PP-Tubes (application of a multi-stepper is recommended in larger series), add 15 µL Serum- or Plasma (dilution 1:21). After mixing use 2 x 100 µL of this dilution in the assay
- According to expected Resistin levels the dilution with Calibrator Diluent can be higher or lower. The excellent linearity of this test system allows sample dilution of 1:5 to 1:400.
- Because the Calibrator Diluent is special composed for the correct determination of Resistin, the dilution should be at least 1:5!

**TECHNICAL RECOMMENDATIONS****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 1-5 and Controls 1 and 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). 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 1-5** are reconstituted with the **Calibrator Diluent**.

The **Controls 1 and 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.

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

#### Dilution

After **reconstitution**, **dilute the Controls 1 and 2** with the **Calibrator Diluent** in the same ratio (**1:21**) as the samples.

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

The diluted **Washing Buffer** is stable for 4 weeks at 2-8°C. It has to be at room temperature for usage!

#### Antibody and Enzyme Conjugate

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

#### ASSAY PROCEDURE

When performing the assay, Blank, **Calibrators 1-5, Controls 1 and 2** and the samples should be pipetted as fast as possible (e.g. <15 minutes). To avoid distortions due to differences in incubation times, **Biotin Conjugate** and the **HRP Conjugate** as well as the succeeding **Chromogenic Substrate** should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples.

**Stop Solution** should be added to the plate in the same order as **Chromogenic Substrate**.

All determinations (Blank, **Calibrators 1-5, Controls 1 and 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 **Chromogenic Substrate**, stabilised Tetramethylbenzidine, is photosensitive—storage and incubation in the dark.

#### Shaking

The incubation steps should be performed at mean rotation frequency of a microtiter plate shaker. We recommend 350 rpm. Depending on the design of the shaker, the shaking frequency should 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.

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.

# ASSAY PROCEDURE

| Preparation of reagents |                      | Reconstitution:                      | Dilution                                                     |
|-------------------------|----------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| CAL 1-5                 | Calibrators          | in 750 µL Calibrator Diluent DIL CAL | -                                                            |
| Control 1               | Control 1            | in 250 µL Dilution Buffer DIL BUF    | 1:21 with Calibrator Diluent DIL CAL                         |
| Control 2               | Control 2            | in 250 µL Dilution Buffer DIL BUF    | 1:21 with Calibrator Diluent DIL CAL                         |
| BIOT CONJ CONC          | Biotin Conjugate     | -                                    | 1:100 with Dilution Buffer DIL BUF<br>→ BLOT CONJ CONC 1:100 |
| SAV HRP CONC            | HRP Conjugate        | -                                    | 1:100 with Dilution Buffer DIL BUF<br>→ SAV HRP CONC 1:100   |
| WASH SOLN CONC          | Washing Buffer conc. | -                                    | 1:20 with Aqua dest.<br>→ WASH SOLN CONC 1:20                |

Samples + Controls 1 and 2: dilute 1:21 in Calibrator Diluent , mix immediately

Before assay procedure bring all reagents to room temperature (20-25°C).

## Assay procedure in double determination

| Pipette | Reagents                         | Position                                            |
|---------|----------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 100 µL  | Calibrator Diluent (blank value) | A1/A2                                               |
| 100 µL  | Calibrator 1 (0.02 ng/mL)        | B1/B2                                               |
| 100 µL  | Calibrator 2 (0.1 ng/mL)         | C1/C2                                               |
| 100 µL  | Calibrator 3 (0.3 ng/mL)         | D1/D2                                               |
| 100 µL  | Calibrator 4 (0.6 ng/mL)         | E1/E2                                               |
| 100 µL  | Calibrator 5 (1.0 ng/mL)         | F1/F2                                               |
| 100 µL  | Control 1 (1:21 diluted)         | G1/G2                                               |
| 100 µL  | Control 2 (1:21 diluted)         | H1/H2                                               |
| 100 µL  | Sample SPE (1:21 diluted)        | in the rest of the wells according the requirements |

Cover the wells with the sealing tape.

## Sample Incubation: 2 h at 20-25°C, 350 rpm

|           |                                                                                                           |              |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 5x 300 µL | Aspirate the contents of the wells and wash 5x with 300 µL each Washing Buffer WASH SOLN CONC 1:20 / well | In each well |
| 100 µL    | Biotin Conjugate BLOT CONJ CONC 1:100                                                                     | In each well |

Cover the wells with the sealing tape.

## Incubation: 1 h at 20-25°C, 350 rpm

|           |                                                                                                           |              |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 5x 300 µL | Aspirate the contents of the wells and wash 5x with 300 µL each Washing Buffer WASH SOLN CONC 1:20 / well | In each well |
| 100 µL    | HRP Conjugate SAV HRP CONC 1:100                                                                          | In each well |

Cover the wells with the sealing tape.

## Incubation: 30 Minutes at 20-25°C, 350 rpm

|           |                                                                                                           |              |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 5x 300 µL | Aspirate the contents of the wells and wash 5x with 300 µL each Washing Buffer WASH SOLN CONC 1:20 / well | In each well |
| 100 µL    | Chromogenic Substrate                                                                                     | In each well |

Measure the absorbance within 30 min at **450 nm** with  $\geq 590$  nm as reference wavelength.

Measured extinction of the blank

0.05

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

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

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

$$0.2686 = x$$

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

$$0.2686 \times 21 = 5.64 \text{ ng/mL} = 0.00564 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### Calibrators

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

### Sensitivity

The analytical sensitivity was determined by measuring the blank value. For this purpose, the signal intensity of blank value + 2SD was converted into a resistin concentration using the calibration curve. The analytical sensitivity of the assay is 0.012 ng / mL.

### Interference

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

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

|         | <b>Triglyceride<br/>100 mg/ml</b> | <b>Bilirubin<br/>100 µg/ml</b> | <b>Haemolysate<br/>1000 µg/ml</b> |
|---------|-----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| Serum 1 | 101                               | 93                             | 94                                |
| Serum 2 | 115                               | 99                             | 99                                |
| Serum 3 | 104                               | 103                            | 147                               |

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

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

### Reproducibility and Precision

The inter- and intra assay coefficients of variability are in average < 10%. Exemplary determinations are shown in table 3 and table 4.

**Table 3:** Intra-Assay-Variation

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

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

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

**Recovery and Linearity**

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

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

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

Different human sera were spiked with recombinant human Resistin in varying concentrations (e.g. in Table 5). The recovery of Resistin yielded on average 98 % of the theoretically expected amount.

**EVALUATION OF RESULTS****Table 6:** The expected values for Resistin were determined with the DIAsource ELISA in healthy probands and analysed by Prof. Dr. J. Kratzsch. Institute for Laboratory Medicine, University of Leipzig.

| Female       |     |         |         | Resistin (ng/mL): |                      |              |
|--------------|-----|---------|---------|-------------------|----------------------|--------------|
| Age (Years): | n:  | AV Age: | AV BMI: | AV $\pm$ SD:      | 25.- 75. Percentile: | Min. – Max.: |
| 18 - 30      | 96  | 23.0    | 23.1    | 7.2 $\pm$ 2.6     | 5.4 – 8.8            | 3.1 – 14.7   |
| 31 - 40      | 63  | 36.5    | 24.3    | 8.1 $\pm$ 2.3     | 6.4 – 9.6            | 3.6 – 13.1   |
| 41 - 50      | 67  | 44.9    | 24.8    | 7.3 $\pm$ 2.5     | 5.7 – 8.1            | 4.0 – 16.1   |
| 51 - 60      | 29  | 54.7    | 25.0    | 7.2 $\pm$ 2.6     | 5.4 – 8.5            | 4.0 – 15.5   |
| 61 - 65      | 9   | 62.7    | 25.2    | 6.6 $\pm$ 1.1     | 6.0 – 6.7            | 5.4 – 9.3    |
| Male         |     |         |         | Resistin (ng/mL): |                      |              |
| Age (Years): | n:  | AV Age: | AV BMI: | AV $\pm$ SD:      | 25.- 75. Percentile: | Min. – Max.: |
| 18 - 30      | 107 | 23.9    | 24.1    | 6.4 $\pm$ 1.8     | 5.0 – 7.6            | 2.5 – 13.1   |
| 31 - 40      | 59  | 35.9    | 25.0    | 6.7 $\pm$ 3.2     | 4.8 – 7.4            | 3.8 – 26.9   |
| 41 - 50      | 66  | 45.0    | 25.2    | 6.5 $\pm$ 2.8     | 4.5 – 7.4            | 2.4 – 16.7   |
| 51 - 60      | 36  | 54.8    | 26.4    | 6.1 $\pm$ 2.1     | 4.7 – 7.2            | 3.2 – 13.3   |
| 61 - 68      | 20  | 63.2    | 25.6    | 7.2 $\pm$ 1.8     | 6.0 – 8.2            | 4.5 – 11.2   |

n=Number of Probands. AV=Average Value. BMI=Body Mass Index (kg/m<sup>2</sup>). SD=Standard Deviation

**Table 7:** Grouping of the expected values

| Sex  | Number | Mean [ng/mL] | Standard deviation | 2.5. Percentile | 9.5. Percentile |
|------|--------|--------------|--------------------|-----------------|-----------------|
| Male | 288    | 6.48         | 2.44               | 3.32            | 11.68           |

|               |     |      |      |      |       |
|---------------|-----|------|------|------|-------|
| <b>Female</b> | 264 | 7.41 | 2.47 | 3.68 | 13.60 |
| <b>Total</b>  | 552 | 6.93 | 2.49 | 3.58 | 13.12 |

## Instructions for use for scientific application

### SCIENTIFIC APPLICATION

Resistin is relevant e.g. in research of: Adiposity Insulin Resistance, Diabetes Arteriosclerosis Inflammation. Due to Assays high sensitivity (12 pg/mL) this is also suitable for measurements in cell culture supernatants and in non-serum / plasma samples (e.g. in breast milk, urine, saliva).

### SAMPLES SUITABLE FOR SCIENTIFIC APPLICATION

Serum and Plasma, common cell culture medium, saliva, breast milk and urine were found to be suitable specimens too. Resistin concentrations may be completely different in body fluids of human origin other than serum or cell culture supernatants. (See Table 8 for recovery and dilution recommendations). Due to the special Sample Buffer, external sample pre-treatment is not necessary.

**Table 8:** Samples were enriched with 0.3 ng/mL Resistin and measured in comparison to non-enriched sample. Relative recovery of added Resistin is shown.

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

### CROSS REACTIVITY

The cross-reactivities of several commercially available animal sera were tested in this assay. Commercially available sera from cattle, cat, chicken, dog, donkey, goat, guinea pig, horse, mouse, pig, rabbit, rat and sheep were diluted 1:10 and used in the test and the signal intensity was measured. No cross-reactivity could be detected.

### LITERATUR / LITERATURE

1. Aruna B. Ghosh S. Singh AK. Mande SC. Srinivas V. Chauhan R. Ehtesham NZ. Human recombinant resistin protein displays a tendency to aggregate by forming intermolecular disulfide linkages. *Biochemistry* 2003;42(36):10554-9.
2. Steppan CM. Lazar MA. Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13(1):18-23.
3. Yang RZ. Huang Q. Xu A. McLenithan JC. Eisen JA. Shuldiner AR. Alkan S. Gong DW. Eison JA. Comparative studies of resistin expression and phylogenomics in human and mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310(3):927-35.
4. Banerjee RR. Lazar MA. Resistin: molecular history and prognosis. *J Mol Med* 2003;81(4):218-26.
5. Banerjee RR. Lazar MA. Dimerization of resistin and resistin-like molecules is determined by a single cysteine. *J Biol Chem* 2001;276(28):25970-3.
6. Raghu P. Ghosh S. Soundarya K. Haseeb A. Aruna B. Ehtesham NZ. Dimerization of human recombinant resistin involves covalent and noncovalent interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313(3):642-6.
7. Patel SD. Rajala MW. Rossetti L. Scherer PE. Shapiro L. Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. *Science* 2004;304(5674):1154-8.
8. Kim KH. Zhao L. Moon Y. Kang C. Sul HS. Dominant inhibitory adipocyte-specific secretory factor (ADSF)/resistin enhances adipogenesis and improves insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(17):6780-5.
9. Chen J. Wang L. Boeg YS. Xia B. Wang J. Differential dimerization and association among resistin family proteins with implications for functional specificity. *J Endocrinol* 2002;175(2):499-504.
10. O.Beltowski J. Adiponectin and resistin--new hormones of white adipose tissue. *Med Sci Monit* 2003;9(2):RA55-61.
11. Morash BA. Ur E. Wiesner G. Roy J. Wilkinson M. Pituitary resistin gene expression: effects of age, gender and obesity. *Neuroendocrinology* 2004;79(3):149-56.
12. Minn AH. Patterson NB. Pack S. Hoffmann SC. Gavrilova O. Vinson C. Harlan DM. Shalev A. Resistin is expressed in pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310(2):641-5.
13. Fain JN. Cheema PS. Bahouth SW. Lloyd Hiler M. Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300(3):674-8.
14. Janke J. Engeli S. Gorzelniak K. Luft FC. Sharma AM. Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. *Obes Res* 2002;10(1):1-5.

15. Patel L. Buckels AC. Kinghorn IJ. Murdock PR. Holbrook JD. Plumpton C. Macphee CH. Smith SA. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300(2):472-6.
16. Youn BS. Yu KY. Park HJ. Lee NS. Min SS. Youn MY. Cho YM. Park YJ. Kim SY. Lee HK. Park KS. Plasma resistin concentrations measured by enzyme-linked immunosorbent assay using a newly developed monoclonal antibody are elevated in individuals with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(1):150-6.
17. Chen XD. Lei T. Xia T. Gan L. Yang ZQ. Increased expression of resistin and tumour necrosis factor- $\alpha$  in pig adipose tissue as well as effect of feeding treatment on resistin and cAMP pathway. *Diabetes Obes Metab* 2004;6(4):271-9.
18. Volarova de Courten B. Degawa-Yamauchi M. Considine RV. Tataranni PA. High serum resistin is associated with an increase in adiposity but not a worsening of insulin resistance in Pima Indians. *Diabetes* 2004;53(5):1279-84.
19. Shalev A. Patterson NB. Hirshberg B. Rother KI. Harlan DM. Resistin serum levels in type 1 diabetes pre- and post-islet transplantation. *Metabolism* 2004;53(4):403-4.
20. Fujinami A. Obayashi H. Ohta K. Ichimura T. Nishimura M. Matsui H. Kawahara Y. Yamazaki M. Ogata M. Hasegawa G. Nakamura N. Yoshikawa T. Nakano K. Ohta M. Enzyme-linked immunosorbent assay for circulating human resistin: resistin concentrations in normal subjects and patients with type 2 diabetes. *Clin Chim Acta* 2004;339(1-2):57-63.
21. Degawa-Yamauchi M. Bovenkerk JE. Juliar BE. Watson W. Kerr K. Jones R. Zhu Q. Considine RV. Serum resistin (FIZZ3) protein is increased in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(11):5452-5.
22. Azuma K. Katsukawa F. Oguchi S. Murata M. Yamazaki H. Shimada A. Saruta T. Correlation between serum resistin level and adiposity in obese individuals. *Obes Res* 2003;11(8):997-1001.
23. Wang H. Chu WS. Hemphill C. Elbein SC. Human resistin gene: molecular scanning and evaluation of association with insulin sensitivity and type 2 diabetes in Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(6):2520-4.
24. Brichard SM. Delparte ML. Lambert M. Adipocytokines in anorexia nervosa: a review focusing on leptin and adiponectin. *Horm Metab Res* 2003;35(6):337-42.
25. Kawanami D. Maemura K. Takeda N. Harada T. Nojiri T. Imai Y. Manabe I. Utsunomiya K. Nagai R. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314(2):415-9.
26. Verma S. Li SH. Wang CH. Fedak PW. Li RK. Weisel RD. Mickle DA. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation* 2003;108(6):736-40.
27. Kaser S. Kaser A. Sandhofer A. Ebenbichler CF. Tilg H. Patsch JR. Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309(2):286-90.
28. Lu SC. Shieh WY. Chen CY. Hsu SC. Chen HL. Lipopolysaccharide increases resistin gene expression in vivo and in vitro. *FEBS Lett* 2002;530(1-3):158-62.
29. Zhong Q. Lin CY. Clarke KJ. Kemppainen RJ. Schwartz DD. Judd RL. Endothelin-1 inhibits resistin secretion in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296(2):383-7.
30. Barton M. Carmona R. Ortmann J. Krieger JE. Traupe T. Obesity-associated activation of angiotensin and endothelin in the cardiovascular system. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35(6):826-37.
31. Ort TA. A. A.; MacDougall. J.R.; Nelson. P.J.; Rothenberg. M.E.; Wu. F.; Eisen. A.; Halvorsen. Y.-D.C. Recombinant human FIZZ3/Resistin Stimulates Lipolysis in Cultured Human Adipocytes. Mouse Adipose Explants and in Normal Mice. *Endocrinology* 2005; doi:10.1210/en.2004-1421.

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

**Summary of the Assay**

| Reagent preparation:                                                                                                                                                 | Reconstitution:                     | Dilution:                           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Calibrators 1 – 5                                                                                                                                                    | in <b>750 µl</b> Calibrator Diluent |                                     |
| Control 1                                                                                                                                                            | in <b>250 µl</b> Dilution Buffer    | <b>1:21</b> with Calibrator Diluent |
| Control 2                                                                                                                                                            | in <b>250 µl</b> Dilution Buffer    | <b>1:21</b> with Calibrator Diluent |
| Biotin Conjugate                                                                                                                                                     |                                     | <b>1:100</b> with Dilution Buffer   |
| HRP Conjugate                                                                                                                                                        |                                     | <b>1:100</b> with Dilution Buffer   |
| Washing Buffer                                                                                                                                                       |                                     | <b>1:20</b> with <b>Aqua. dest.</b> |
| <b>Sample dilution: 1:21</b> (e.g. 15 µl Serum with 300 µl Calibrator Diluent).<br>Before assay procedure bring all reagents to room temperature ( <b>20-25°C</b> ). |                                     |                                     |

**Assay Procedure for Double Determination**

| Pipette                                                                                                    | Reagents                                                                      | Position        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 100 µl                                                                                                     | Calibrator Diluent (blank value)                                              | A1/2            |
| 100 µl                                                                                                     | Calibrator <b>1</b> (0.02 ng/ml)                                              | B1/2            |
| 100 µl                                                                                                     | Calibrator <b>2</b> (0.1 ng/ml)                                               | C1/2            |
| 100 µl                                                                                                     | Calibrator <b>3</b> (0.3 ng/ml)                                               | D1/2            |
| 100 µl                                                                                                     | Calibrator <b>4</b> (0.6 ng/ml)                                               | E1/2            |
| 100 µl                                                                                                     | Calibrator <b>5</b> (1.0 ng/ml)                                               | F1/2            |
| 100 µl                                                                                                     | Control 1 (diluted)                                                           | G1/2            |
| 100 µl                                                                                                     | Control 2 (diluted)                                                           | H1/2            |
| 100 µl                                                                                                     | Sample dilution                                                               | following wells |
| Cover the wells with the sealing tape.                                                                     |                                                                               |                 |
| <b>Incubation: 2 h at 20-25°C, ≥ 350 rpm</b>                                                               |                                                                               |                 |
| 5x 300 µl                                                                                                  | Aspirate the contents of the wells and wash 3x with <b>300 µl</b> Wash Buffer | each well       |
| 100 µl                                                                                                     | <b>1:100</b> diluted Biotin Conjugate                                         | each well       |
| <b>Incubation: 1 h at 20-25°C, ≥350 rpm</b>                                                                |                                                                               |                 |
| 5x 300 µl                                                                                                  | Aspirate the contents of the wells and wash 3x with <b>300 µl</b> Wash Buffer | each well       |
| 100 µl                                                                                                     | <b>1:100</b> diluted HRP Conjugate                                            | each well       |
| <b>Incubation: 30 min at 20-25°C, ≥350 rpm</b>                                                             |                                                                               |                 |
| 5x 300 µl                                                                                                  | Aspirate the contents of the wells and wash 3x with <b>300 µl</b> Wash Buffer | each well       |
| 100 µl                                                                                                     | Chromogenic Substrate                                                         | each well       |
| <b>Incubation: 30 min in the dark at 20-25°C</b>                                                           |                                                                               |                 |
| 100 µl                                                                                                     | Stop Solution                                                                 | each well       |
| Measure the absorbance within <b>30 min</b> at <b>450 nm</b> with <b>≥ 590 nm</b> as reference wavelength. |                                                                               |                 |

Revision date : 2025-07-03



# Resistin-ELISA

Inmunoensayo Enzimático para la Determinación Cuantitativa de Resistina humana  
KAPME50  
USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

es

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

## INDICACIONES

Medición de la resistina humana en muestras séricas y plasmáticas

## INTRODUCCIÓN

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Con tampón de muestra especial optimizado: cuantificación fiable de la resistina, independientemente del contenido absoluto.

## REACTIVOS PROPORCIONADOS

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

|     |   |
|-----|---|
| CAL | N |
|-----|---|

**Calibradores 1-5**, liofilizados: contienen resistina recombinante humana. Los valores del calibrador se indican en las etiquetas de los viales y en el certificado de calidad. **Reconstituya en 750  $\mu$ l de diluyente de calibrador.**
- 3) 

|     |     |
|-----|-----|
| DIL | CAL |
|-----|-----|

**Diluyente de calibrador**, 120 ml, listo para usar.
- 4) 

|         |   |
|---------|---|
| CONTROL | N |
|---------|---|

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

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

**Conjugado con biotina**, 120  $\mu$ l, solución concentrada 100 veces, contiene anticuerpo anti-resistina biotinilado de conejo. Diluir antes de usar en una proporción de 1:100 en tampón de dilución.

- 6) 

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

**Conjugado con HRP**, 120 µl, solución concentrada 100 veces, contiene estreptavidina marcada con HRP (peroxidasa de rábano picante). Diluir antes de usar en una proporción de **1:100** en **tampón de dilución**.
- 7) 

|     |     |
|-----|-----|
| DIL | BUF |
|-----|-----|

**Tampón de dilución**, 25 ml, listo para usar.
- 8) 

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

**Tampón de lavado**, 50 ml, solución concentrada 20 veces: antes de usarse, el tampón de lavado debe diluirse en proporción 1:20 con agua destilada o desmineralizada.
- 9) 

|       |     |
|-------|-----|
| CHROM | TMB |
|-------|-----|

**Sustrato cromogénico**, 12 ml, listo para usar, sustrato de peroxidasa de rábano picante (HRP), tetrametilbencidina estabilizada.
- 10) 

|      |      |
|------|------|
| STOP | SOLN |
|------|------|

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

## MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

Agua destilada (*Aqua destillata*) o desionizada para la dilución del **tampón de lavado (Agua destilada)**, 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

## ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

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

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

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

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

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

## Suero humano

Los componentes siguientes contienen suero humano: Controles 1 y 2 **CONTROL N**

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

## 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:

**Tampón de dilución DIL BUF / Diluyente calibrador DIL CAL / Conjugado con anticuerpo BIOT CONJ CONC / Conjugado enzimático SAV HRP CONC**

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



GHS07

Símbolos de riesgo (CLP):

Palabra de advertencia (CLP):

Componentes peligrosos:

Indicaciones de peligro (CLP):

Instrucciones de seguridad (CLP):

Advertencia

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 %)

H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

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 local/nacional.

#### **Tampón de lavado 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

#### **Solución de parada STOP SOLN**

La solución de parada contiene ácido sulfúrico 0,2 M

EUH210 Existe disponible una Ficha de datos de seguridad bajo solicitud

#### **EQUIPO DE PROTECCIÓN Y MEDIDAS DE PRIMEROS AUXILIOS**

Después del contacto con la piel: Quitarse inmediatamente toda la ropa contaminada. Aclarar la piel con agua o ducharse.

Consultar con un médico en caso de reacción cutánea.

Después del contacto con los ojos: aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. Consultar con un oftalmólogo en caso de irritación ocular.

En caso de ingestión: Llamar a un médico si se encuentra mal.

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

#### **MÉTODO**

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

#### **MUESTRA**

Suero y plasma

Tanto el suero como las muestras de plasma son adecuados (no se encontró una desviación significativa de los niveles de resistina en las muestras correspondientes de suero, heparina, EDTA, citrato y plasma. Se debe tener en cuenta una posible dilución de la muestra por el anticoagulante).

Al parecer, las muestras hemolíticas muestran altos niveles de resistina falsos, por lo que dichas muestras deben revisarse de manera crítica.

Gracias al tampón de muestra especial, no se requiere una preparación de muestra externa antes del ensayo.

#### **Recogida de las muestras**

Utilice venopunción estándar para la muestra de sangre. Deben evitarse reacciones hemolíticas.

#### **Volumen necesario de la muestra: 15 µl**

#### **Estabilidad de la muestra**

en tubos de plástico firmemente cerrados.

Conservación a 20-25 °C máx. 2 días

Conservación a -20 °C máx. 2 años

La conservación de las muestras durante un período de 2 años a -20 °C no mostró ningún efecto sobre el valor medido. Los ciclos de congelación/descongelación de las muestras deben reducirse al mínimo.

#### **Interferencia**

Los triglicéridos, la bilirrubina y el hemolisado presentes en la muestra no interfieren en concentraciones de 100 mg/ml y 100 µg/ml o 1 mg/ml. Sin embargo, el uso de muestras hemolíticas, lipémicas o ictericas debe ser validado por el usuario.

#### **Preparación de la muestra**

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

- De acuerdo con los niveles de resistina esperados, la dilución con el diluyente de calibrador puede ser superior o inferior. La excelente linealidad de este sistema de prueba permite la dilución de la muestra de 1:5 a 1:400.
- Puesto que el diluyente de calibrador está especialmente compuesto para la correcta determinación de la resistina, la dilución debe ser de al menos 1:5.

## RECOMENDACIONES 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**: Los **calibradores 1-5** y los **controles 1 y 2** deben almacenarse a -20 °C (máximo 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). El **tampón de dilución** diluido a 1:20 es estable durante 4 semanas a 2-8 °C.

### Preparación de los reactivos

Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (20-25 °C) antes de utilizarlos. 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 1-5** se reconstituyen con el **diluyente de calibrador**.

Los **controles 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.

Los calibradores y los controles reconstituidos pueden conservarse durante 4 semanas a -20 °C. Evite los ciclos repetidos de congelación/descongelación.

### Dilución

Después de la **reconstitución**, **diluya los controles 1 y 2** con el **diluyente de calibrador** en la misma proporción **(1:21) que la muestra**.

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

El **tampón de lavado** diluido será estable durante 4 semanas a 2-8 °C. Para usarse debe estar a temperatura ambiente.

### Conjugado con anticuerpo y enzima

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

## PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Al realizar el ensayo, el blanco, los **calibradores 1-5**, los **controles 1 y 2** y las muestras deben pipetearse lo más rápido posible (por ejemplo, en menos de 15 minutos). Para evitar distorsiones debidas a diferencias en los tiempos de incubación, el **conjugado con biotina** y el **conjugado con HRP**, así como el **sustrato cromogénico** posterior, deben añadirse a la placa en el mismo orden y en el mismo intervalo de tiempo que las muestras.

La **solución de parada** debe añadirse a la placa en el mismo orden que el **sustrato cromogénico**.

Todas las determinaciones (en blanco, **calibradores 1-5**, **controles 1 y 2** y muestras) deben analizarse por duplicado. Se recomienda 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**. El **sustrato cromogénico**, tetrametilbencidina estabilizada, es fotosensible, por lo que debe almacenarse e incubarse en la oscuridad.

### Agitación

Los pasos de incubación deben realizarse a una frecuencia de rotación media de un agitador de placas de microvaloración. Recomendamos 350 rpm. Dependiendo del diseño del agitador, se debe ajustar la frecuencia de agitación. 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.

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

#### PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

| Preparación de los reactivos |                        | Reconstitución:                              | Dilución                                                          |
|------------------------------|------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| CAL 1-5                      | Calibradores           | en 750 µl de diluyente de calibrador DIL CAL | -                                                                 |
| Control 1                    | Control 1              | en 250 µl de tampón de dilución DIL BUF      | 1:21 con el diluyente de calibrador DIL CAL                       |
| Control 2                    | Control 2              | en 250 µl de tampón de dilución DIL BUF      | 1:21 con el diluyente de calibrador DIL CAL                       |
| BIOT CONJ CONC               | Conjugado con biotina  | -                                            | 1:100 con el tampón de dilución DIL BUF<br>→ BLOT CONJ CONC 1:100 |
| SAV HRP CONC                 | Conjugado con HRP      | -                                            | 1:100 con el tampón de dilución DIL BUF<br>→ SAV HRP CONC 1:100   |
| WASH SOLN CONC               | Tampón de lavado conc. | -                                            | 1:20 con agua destilada<br>→ WASH SOLN CONC 1:20                  |

| Muestras + controles 1 y 2: diluya 1:21 en diluyente de calibrador, mezcle inmediatamente                      |                                                                                                                         |                                                       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Antes del procedimiento del ensayo todos los reactivos deben estar a una temperatura ambiente de (20 - 25 °C). |                                                                                                                         |                                                       |
| Procedimiento del ensayo en determinación doble                                                                |                                                                                                                         |                                                       |
| Pipeta                                                                                                         | Reactivos                                                                                                               | Posición                                              |
| 100 µl                                                                                                         | Diluyente de calibrador (valor en blanco)                                                                               | A1/A2                                                 |
| 100 µl                                                                                                         | Calibrador 1 (0,02 ng/ml)                                                                                               | B1/B2                                                 |
| 100 µl                                                                                                         | Calibrador 2 (0,1 ng/ml)                                                                                                | C1/C2                                                 |
| 100 µl                                                                                                         | Calibrador 3 (0,03 ng/ml)                                                                                               | D1/D2                                                 |
| 100 µl                                                                                                         | Calibrador 4 (0,06 ng/ml)                                                                                               | E1/E2                                                 |
| 100 µl                                                                                                         | Calibrador 5 (1,0 ng/ml)                                                                                                | F1/F2                                                 |
| 100 µl                                                                                                         | Control 1 (1:21 diluido)                                                                                                | G1/G2                                                 |
| 100 µl                                                                                                         | Control 2 (1:21 diluido)                                                                                                | H1/H2                                                 |
| 100 µl                                                                                                         | Muestra SPE (1:21 diluida)                                                                                              | En el resto de los pocillos conforme a los requisitos |
| Tape los pocillos con la cinta selladora.                                                                      |                                                                                                                         |                                                       |
| Incubación de la muestra: 2 h a 20 - 25 °C, 350 rpm                                                            |                                                                                                                         |                                                       |
| 5x 300 µl                                                                                                      | Aspire el contenido de los pocillos y lave 5 veces con 300 µl cada una con tampón de lavado WASH SOLN CONC 1:20/pocillo | En cada pocillo                                       |
| 100 µl                                                                                                         | Conjugado con biotina BLOT CONJ CONC 1:100                                                                              | En cada pocillo                                       |
| Tape los pocillos con la cinta selladora.                                                                      |                                                                                                                         |                                                       |
| Incubación: 1 h a 20 - 25 °C, 350 rpm                                                                          |                                                                                                                         |                                                       |
| 5x 300 µl                                                                                                      | Aspire el contenido de los pocillos y lave 5 veces con 300 µl cada una con tampón de lavado WASH SOLN CONC 1:20/pocillo | En cada pocillo                                       |

|                                                                                                      |                                                                                                                                              |                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 100 µl                                                                                               | Conjugado con HRP <b>SAV HRP CONC 1:100</b>                                                                                                  | En cada pocillo |
| Tape los pocillos con la cinta selladora.                                                            |                                                                                                                                              |                 |
| <b>Incubación: 30 minutos a 20 - 25 °C, 350 rpm</b>                                                  |                                                                                                                                              |                 |
| 5x 300 µl                                                                                            | Aspire el contenido de los pocillos y <b>lave 5 veces</b> con <b>300 µl</b> cada una con tampón de lavado <b>WASH SOLN CONC 1:20/pocillo</b> | En cada pocillo |
| 100 µl                                                                                               | Sustrato de cromógeno                                                                                                                        | En cada pocillo |
| <b>Incubación: 30 minutos en la oscuridad a 20 - 25 °C a temperatura ambiente</b>                    |                                                                                                                                              |                 |
| 100 µl                                                                                               | Solución de parada <b>STP</b>                                                                                                                | En cada pocillo |
| Mida la absorbancia antes de 30 min a <b>450 nm</b> con ≥590 nm como longitud de onda de referencia. |                                                                                                                                              |                 |

#### CONTROL DE CALIDAD

Las buenas prácticas de laboratorio (BPL) requieren incluir controles en cada ensayo. 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 BPL 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

#### 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 **1,0**.

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

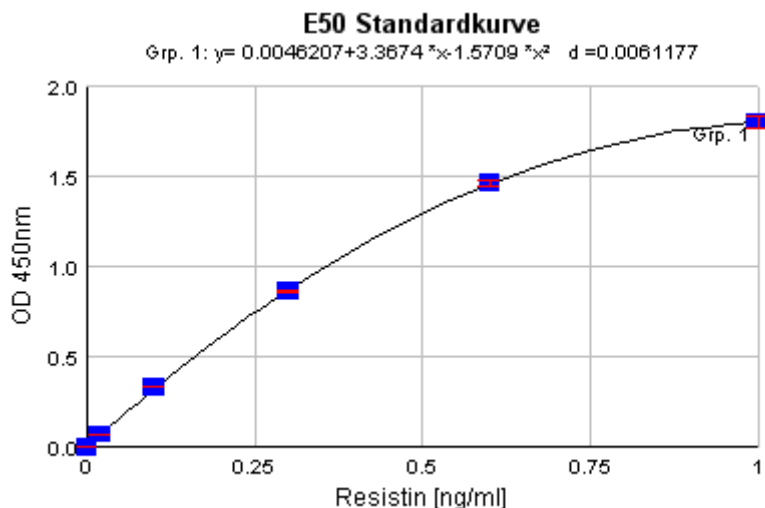
#### ESTABLECIMIENTO DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Los calibradores suministrados contienen las siguientes concentraciones de resistina recombinante:

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

- 1) Calcule el valor medio de la absorbancia del blanco a partir de la determinación duplicada (pocillo A1/A2).
- 2) Reste la absorbancia media del blanco de las absorbancias medias de todas las demás muestras, controles y calibradores.
- 3) Trace las concentraciones de calibrador en el eje de la X en función del valor medio de la absorbancia de los calibradores en el eje de la Y.
- 4) Recomendación: El cálculo de la curva de calibración debe efectuarse utilizando un programa informático porque por lo general la curva no se describe idealmente (sin la transformación correspondiente) mediante regresión lineal. Para la evaluación normalmente son adecuados un **ajuste de curva polinomial de un grado más alto**, un **ajuste de curva logística de cuatro parámetros (4-PL)** o una **regresión no lineal** (como podría ser una alineación spline o en escala milimetrada en casos individuales).
- 5) Las **concentraciones de resistina** de las muestras diluidas o de los sueros de control diluidos en ng/ml (o pg/ml según la unidad escogida para los calibradores) se calculan de este modo, las concentraciones de resistina de las **muestras sin diluir** y del control se calcula **multiplicando por el factor de dilución respectivo**.

#### Curva de calibración



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

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

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

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

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

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

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

$$0,2686 = x$$

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

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

## EFICACIA DIAGNÓSTICA

### Calibradores

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

### Sensibilidad

La sensibilidad analítica se determinó midiendo el valor en blanco. Para ello, la intensidad de la señal del valor en blanco + 2SD se convirtió en una concentración de resistina utilizando la curva de calibración. La sensibilidad analítica del ensayo arroja 0,012 ng/ml.

### Interferencia

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

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

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

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

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

### Reproducibilidad y precisión

Los coeficientes de variabilidad inter e intraensayo son, en promedio, inferiores al 10 %. Las determinaciones de ejemplo se muestran en la tabla 3 y la tabla 4.

**Tabla 3:** Variación intraensayo

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

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

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

### Recuperación y linealidad

El ELISA Resistin de DIAsource es auténtico en un rango de dilución muy amplio. La linealidad de las diluciones séricas es excelente en un rango muy amplio (véase la tabla 5).

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

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

Se añadió resistina humana recombinante a diferentes sueros en concentraciones diversas (p. ej. Tabla 5) La recuperación de resistina arrojó una media del 98% de la cantidad esperada en teoría.

### EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

**Tabla 6:** Los valores esperados para la resistina se determinaron con el ELISA de DIAsource en donantes sanos y fueron analizados por el Prof. Dr. J. Kratzsch. Departamento de Medicina de Laboratorio, Hospital Universitario de Leipzig.

| Mujer          |    |          |         | Resistina (ng/ml): |                     |              |
|----------------|----|----------|---------|--------------------|---------------------|--------------|
| Edad (años):   | n: | VP edad: | VP IMC: | VP ± DE:           | 25 - 75. Percentil: | Mín. – Máx.: |
| <b>18 – 30</b> | 96 | 23,0     | 23,1    | <b>7,2 ± 2,6</b>   | 5,4 – 8,8           | 3,1 – 14,7   |
| <b>31 – 40</b> | 63 | 36,5     | 24,3    | <b>8,1 ± 2,3</b>   | 6,4 – 9,6           | 3,6 – 13,1   |
| <b>41 – 50</b> | 67 | 44,9     | 24,8    | <b>7,3 ± 2,5</b>   | 5,7 – 8,1           | 4,0 – 16,1   |
| <b>51 – 60</b> | 29 | 54,7     | 25,0    | <b>7,2 ± 2,6</b>   | 5,4 – 8,5           | 4,0 – 15,5   |
| <b>61 – 65</b> | 9  | 62,7     | 25,2    | <b>6,6 ± 1,1</b>   | 6,0 – 6,7           | 5,4 – 9,3    |

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

n=número de probandos. **AV**=valor promedio. **IMC**=índice de masa corporal (kg/m<sup>2</sup>). **DE**=desviación estándar

**Tabla 7:** Agrupación de los valores esperados

| Sexo   | Número | Media<br>[ng/ml] | Desviación estándar | 2.5.<br>Percentil | 9.5.<br>Percentil |
|--------|--------|------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| Hombre | 288    | 6,48             | 2,44                | 3,32              | 11,68             |
| Mujer  | 264    | 7,41             | 2,47                | 3,68              | 13,60             |
| Total  | 552    | 6,93             | 2,49                | 3,58              | 13,12             |

## Instrucciones de uso para aplicación científica

### APLICACIÓN CIENTÍFICA

La resistina es importante, por ejemplo, en la investigación sobre: Adiposidad, resistencia a la insulina, diabetes, arteriosclerosis, inflamación. Debido a la alta sensibilidad de los ensayos (12 pg/ml), también son adecuados para realizar mediciones en sobrenadantes de cultivos celulares y en muestras que no sean de suero o plasma (por ejemplo, en leche materna, orina o saliva).

### MUESTRAS ADECUADAS PARA APLICACIÓN CIENTÍFICA

El suero y el plasma, los medios de cultivo celular comunes, la saliva, la leche materna y la orina también resultaron ser muestras adecuadas.

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

(Consulte la tabla 8 para las recomendaciones de recuperación y dilución). Gracias al tampón de muestra especial, no es necesario realizar un pretratamiento externo de la muestra.

**Tabla 8:** Las muestras se enriquecieron con 0,3 ng/ml de resistina y se midieron en comparación con muestras no enriquecidas. Se muestra la recuperación relativa de la resistina añadida.

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

### REACTIVIDAD CRUZADA

En este ensayo se analizaron las reactividades cruzadas de varios sueros animales disponibles en el mercado.

Se diluyeron en una proporción de 1:10 sueros disponibles comercialmente procedentes de ganado vacuno, gatos, pollos, perros, burros, cabras, cobayas, caballos, ratones, cerdos, conejos, ratas y ovejas, se utilizaron en la prueba y se midió la intensidad de la señal. No se detectó ninguna reactividad cruzada.

### BIBLIOGRAFÍA/LITERATURA

1. Aruna B. Ghosh S. Singh AK. Mande SC. Srinivas V. Chauhan R. Ehtesham NZ. Human recombinant resistin protein displays a tendency to aggregate by forming intermolecular disulfide linkages. *Biochemistry* 2003;42(36):10554-9.
2. Stepan CM. Lazar MA. Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13(1):18-23.
3. Yang RZ. Huang Q. Xu A. McLenithan JC. Eisen JA. Shuldiner AR. Alkan S. Gong DW. Eison JA. Comparative studies of resistin expression and phylogenomics in human and mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310(3):927-35.
4. Banerjee RR. Lazar MA. Resistin: molecular history and prognosis. *J Mol Med* 2003;81(4):218-26.
5. Banerjee RR. Lazar MA. Dimerization of resistin and resistin-like molecules is determined by a single cysteine. *J Biol Chem* 2001;276(28):25970-3.
6. Raghu P. Ghosh S. Soundarya K. Haseeb A. Aruna B. Ehtesham NZ. Dimerization of human recombinant resistin involves covalent and noncovalent interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313(3):642-6.
7. Patel SD. Rajala MW. Rossetti L. Scherer PE. Shapiro L. Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. *Science* 2004;304(5674):1154-8.
8. Kim KH. Zhao L. Moon Y. Kang C. Sul HS. Dominant inhibitory adipocyte-specific secretory factor (ADSF)/resistin enhances adipogenesis and improves insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(17):6780-5.
9. Chen J. Wang L. Boeg YS. Xia B. Wang J. Differential dimerization and association among resistin family proteins with implications for functional specificity. *J Endocrinol* 2002;175(2):499-504.
10. O.Beltowski J. Adiponectin and resistin--new hormones of white adipose tissue. *Med Sci Monit* 2003;9(2):RA55-61.
11. Morash BA. Ur E. Wiesner G. Roy J. Wilkinson M. Pituitary resistin gene expression: effects of age, gender and obesity. *Neuroendocrinology* 2004;79(3):149-56.
12. Minn AH. Patterson NB. Pack S. Hoffmann SC. Gavrilova O. Vinson C. Harlan DM. Shalev A. Resistin is expressed in pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310(2):641-5.
13. Fain JN. Cheema PS. Bahouth SW. Lloyd Hiler M. Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300(3):674-8.

14. Janke J. Engeli S. Gorzelniak K. Luft FC. Sharma AM. Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. *Obes Res* 2002;10(1):1-5.
15. Patel L. Buckels AC. Kinghorn IJ. Murdock PR. Holbrook JD. Plumpton C. Macphee CH. Smith SA. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300(2):472-6.
16. Youn BS. Yu KY. Park HJ. Lee NS. Min SS. Youn MY. Cho YM. Park YJ. Kim SY. Lee HK. Park KS. Plasma resistin concentrations measured by enzyme-linked immunosorbent assay using a newly developed monoclonal antibody are elevated in individuals with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(1):150-6.
17. Chen XD. Lei T. Xia T. Gan L. Yang ZQ. Increased expression of resistin and tumour necrosis factor-alpha in pig adipose tissue as well as effect of feeding treatment on resistin and cAMP pathway. *Diabetes Obes Metab* 2004;6(4):271-9.
18. Volarova de Courten B. Degawa-Yamauchi M. Considine RV. Tataranni PA. High serum resistin is associated with an increase in adiposity but not a worsening of insulin resistance in Pima Indians. *Diabetes* 2004;53(5):1279-84.
19. Shalev A. Patterson NB. Hirshberg B. Rother KI. Harlan DM. Resistin serum levels in type 1 diabetes pre- and post-islet transplantation. *Metabolism* 2004;53(4):403-4.
20. Fujinami A. Obayashi H. Ohta K. Ichimura T. Nishimura M. Matsui H. Kawahara Y. Yamazaki M. Ogata M. Hasegawa G. Nakamura N. Yoshikawa T. Nakano K. Ohta M. Enzyme-linked immunosorbent assay for circulating human resistin: resistin concentrations in normal subjects and patients with type 2 diabetes. *Clin Chim Acta* 2004;339(1-2):57-63.
21. Degawa-Yamauchi M. Bovenkerk JE. Juliar BE. Watson W. Kerr K. Jones R. Zhu Q. Considine RV. Serum resistin (FIZZ3) protein is increased in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(11):5452-5.
22. Azuma K. Katsukawa F. Oguchi S. Murata M. Yamazaki H. Shimada A. Saruta T. Correlation between serum resistin level and adiposity in obese individuals. *Obes Res* 2003;11(8):997-1001.
23. Wang H. Chu WS. Hemphill C. Elbein SC. Human resistin gene: molecular scanning and evaluation of association with insulin sensitivity and type 2 diabetes in Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(6):2520-4.
24. Brichard SM. Delporte ML. Lambert M. Adipocytokines in anorexia nervosa: a review focusing on leptin and adiponectin. *Horm Metab Res* 2003;35(6):337-42.
25. Kawanami D. Maemura K. Takeda N. Harada T. Nojiri T. Imai Y. Manabe I. Utsunomiya K. Nagai R. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314(2):415-9.
26. Verma S. Li SH. Wang CH. Fedak PW. Li RK. Weisel RD. Mickle DA. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation* 2003;108(6):736-40.
27. Kaser S. Kaser A. Sandhofer A. Ebenbichler CF. Tilg H. Patsch JR. Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309(2):286-90.
28. Lu SC. Shieh WY. Chen CY. Hsu SC. Chen HL. Lipopolysaccharide increases resistin gene expression in vivo and in vitro. *FEBS Lett* 2002;530(1-3):158-62.
29. Zhong Q. Lin CY. Clarke KJ. Kempainen RJ. Schwartz DD. Judd RL. Endothelin-1 inhibits resistin secretion in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296(2):383-7.
30. Barton M. Carmona R. Ortmann J. Krieger JE. Traupe T. Obesity-associated activation of angiotensin and endothelin in the cardiovascular system. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35(6):826-37.
31. Ort TA. A. A.; MacDougall. J.R.; Nelson. P.J.; Rothenberg. M.E.; Wu. F.; Eisen. A.; Halvorsen. Y.-D.C. Recombinant human FIZZ3/Resistin Stimulates Lipolysis in Cultured Human Adipocytes. Mouse Adipose Explants and in Normal Mice. *Endocrinology* 2005; doi:10.1210/en.2004-1421.

**Otras traducciones de estas instrucciones de uso disponibles para su descarga en nuestra página web: <https://www.diasource-diagnostics.com/>**

**Resumen del ensayo**

| Preparación de los reactivos:                                                                                                                                                                                                | Reconstitución:                             | Dilución:                                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------|
| <b>Calibradores 1 - 5</b>                                                                                                                                                                                                    | en <b>750 µl</b> de diluyente de calibrador |                                            |
| <b>Control 1</b>                                                                                                                                                                                                             | en <b>250 µl</b> de tampón de dilución      | <b>1:21</b> con el diluyente de calibrador |
| <b>Control 2</b>                                                                                                                                                                                                             | en <b>250 µl</b> de tampón de dilución      | <b>1:21</b> con el diluyente de calibrador |
| <b>Conjugado con biotina</b>                                                                                                                                                                                                 |                                             | <b>1:100</b> con tampón de dilución        |
| <b>Conjugado con HRP</b>                                                                                                                                                                                                     |                                             | <b>1:100</b> con tampón de dilución        |
| <b>Tampón de lavado</b>                                                                                                                                                                                                      |                                             | <b>1:20</b> con <b>agua destilada</b>      |
| <b>Dilución de la muestra: 1:21</b> (p. ej. 15 µl de suero con 300 µl de diluyente de calibrador).<br>Antes del procedimiento del ensayo todos los reactivos deben estar a una temperatura ambiente de <b>(20 - 25 °C)</b> . |                                             |                                            |

**Procedimiento del ensayo en determinación doble**

| Pipeteo                                                                                                            | Reactivos                                                                                   | Posición            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 100 µl                                                                                                             | Diluyente de calibrador (valor en blanco)                                                   | A1/2                |
| 100 µl                                                                                                             | Calibrador <b>1</b> (0,02 ng/ml)                                                            | B1/2                |
| 100 µl                                                                                                             | Calibrador <b>2</b> (0,1 ng/ml)                                                             | C1/2                |
| 100 µl                                                                                                             | Calibrador <b>3</b> (0,3 ng/ml)                                                             | D1/2                |
| 100 µl                                                                                                             | Calibrador <b>4</b> (0,6 ng/ml)                                                             | E1/2                |
| 100 µl                                                                                                             | Calibrador <b>5</b> (1,0 ng/ml)                                                             | F1/2                |
| 100 µl                                                                                                             | Control 1 (diluido)                                                                         | G1/2                |
| 100 µl                                                                                                             | Control 2 (diluido)                                                                         | H1/2                |
| 100 µl                                                                                                             | Dilución de la muestra                                                                      | Siguientes pocillos |
| Tape los pocillos con la cinta selladora.                                                                          |                                                                                             |                     |
| <b>Incubación: 2 h a 20-25 °C, ≥350 rpm</b>                                                                        |                                                                                             |                     |
| 5x 300 µl                                                                                                          | Aspire el contenido de los pocillos y lávelos 3 veces con <b>300 µl</b> de tampón de lavado | Todos los pocillos  |
| 100 µl                                                                                                             | <b>1:100</b> de conjugado con biotina diluido                                               | Todos los pocillos  |
| <b>Incubación: 1 h a 20-25 °C, ≥350 rpm</b>                                                                        |                                                                                             |                     |
| 5x 300 µl                                                                                                          | Aspire el contenido de los pocillos y lávelos 3 veces con <b>300 µl</b> de tampón de lavado | Todos los pocillos  |
| 100 µl                                                                                                             | <b>1:100</b> de conjugado con HRP diluido                                                   | Todos los pocillos  |
| <b>Incubación: 30 min a 20-25 °C, ≥350 rpm</b>                                                                     |                                                                                             |                     |
| 5x 300 µl                                                                                                          | Aspire el contenido de los pocillos y lávelos 3 veces con <b>300 µl</b> de tampón de lavado | Todos los pocillos  |
| 100 µl                                                                                                             | Sustrato de cromógeno                                                                       | Todos los pocillos  |
| <b>Incubación: 30 min en un lugar oscuro a 20-25 °C</b>                                                            |                                                                                             |                     |
| 100 µl                                                                                                             | Solución de parada                                                                          | Todos los pocillos  |
| Mida la absorbancia antes de <b>30 min</b> a <b>450 nm</b> con <b>≥590 nm</b> como longitud de onda de referencia. |                                                                                             |                     |

Fecha de revisión: 03-07-2025