

# Leptin RIA-CT

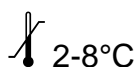
Radioimmunoassay mit beschichteten Röhrchen  
für die quantitative Bestimmung von  
**humanem Leptin**  
Deutsch

Radioimmunoassay with coated tubes  
for quantitative Determination of  
**human Leptin**  
English

Europäische Union / European Union\*:  
**für in-vitro-Diagnostik / for in-vitro diagnostics**  
Rest of the world: for research use only. Not for use in diagnostic procedures



DE/CA40/00809/4



125 tubes



**REF R44**



Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH



: Aspenhastr. 25 • D-72770 Reutlingen / Germany  
Telefon: + 49 - (0) 7121 51484-0 • Fax: + 49 - (0) 7121 51484-10  
E-Mail: [contact@mediagnost.de](mailto:contact@mediagnost.de) • <http://www.mediagnost.d>

EN/ DE/ FR/ IT/ ES/ PT/ NL/ DK/ SE/ PL/ HU/ SK/ CZ/ BG/ EE/ GR/ RO/ SL/ FI

Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ Symbolen/ Symboler/ Symboler/ Symbole/ Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ Символи/ Símbolid/ Σύμβολα/ Simboluri/ Simboli/ Symbolit

DIN EN ISO 15223-1



Expiry date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Data di scadenza/ Fecha de caducidad/ Data de validade/ Uiterste gebruiksdatum/ Udløbsdato/ Bäst före-datum/ Termin ważności/ Lejárati idő/ Čas expirácie/ Doba expirace/ Срок на годност/ Aegumiskuurpäev/ Ημερομηνία λήξης/ Data de expirare/ Rok uporabe/ Viimeinen käyttöpäivä



Consider instructions for use/ Bitte Gebrauchsanweisung beachten/ Consultez la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las instrucciones de uso/ Respeitar as instruções de utilização/ A.u.b de gebruiksaanwijzing volgen/ Se brugsanvisningen/ Läs anvisningarna före användning/ Proszę przeczytać instrukcję obsługi/ Vegye figyelembe a használati utasításban foglaltakat/ Postupujte podľa pokynov na použitie/ Dodržujte návod k použití/ Моля, спазвайте инструкцията за употреба/ Palun järgige kasutusjuhendit/ Λάβετε υπόψη σας τις οδηγίες χρήσης/ Vá rugám sã respectați instrucțiunile de utilizare/ Upošteвайте navodila za uporabo/ Lue käyttöohje huolellisesti!



In vitro Diagnostic Medical Device (for in vitro diagnostic use)/ In-vitro-Diagnostikum (zur In-vitro-Diagnostik)/ Dispositif médical de diagnostic in vitro (Pour usage diagnostique in vitro)/ Dispositivo medico per diagnostica in vitro (per uso diagnostico in vitro)/ Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (para uso diagnóstico in vitro)/ Dispositivo Médico para Diagnóstico in vitro (Para Utilização de Diagnóstico in vitro)/ Medisch hulpmiddel voor diagnostiek in vitro (voor diagnostisch gebruik in vitro)/ Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik (Udelukkende til in vitro diagnostisk anvendelse)/ Medicinteknisk produkt avsedd för in vitro-diagnostik (för in vitro-diagnostiskt bruk)/ Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro/ In vitro orvosdiagnosztikai termék (in vitro diagnosztikai használatához)/ In vitro diagnostický zdravotnický materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro“)/ Медицинско устройство за ин-витро диагностика (за ин-витро диагностика)/ in vitro diagnostikaseade (in vitro diagnostika tegemiseks)/ In vitro διαγνωστικό (για διάγνωση in vitro)/ Dispozitiv de diagnosticare in vitro (pentru diagnosticarea in-vitro)/ In vitro diagnostika (o in vitro diagnostiki)/ in vitro-diagnostiikkakäyttö



Lot-Batch Number/ Charge-Chargennummer/ Lot-Code du lot/ Lotto-Numero di lotto/ Lote-Código de lote/ Lote-Código do Lote/Lot-Partijnummer/ Lot-Batchcode/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-sarzs szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-număr lot/ Številka serije/ erä



Manufactured by/ Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/Fabricado por/ Fabricado por/ Vervaardigd doo/Fabrikation af /Tillverkad av/ Wyprodukowane przez/ Gyártotta / Vyrobené/ Vyrobeno v/ Производител/ Тootja/ Κατασκευάζεται από/ Produs de/ Proizvajalec/ Valmistaja



Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referência/ Referentienummer/ Referencenummer /Beställningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/Katalógové číslo/ Objednací číslo/Каталожен номер/Tellimisnumber/ Αρ. παραγγελίας/Număr comandă/ Številka naročila/ viite tai tilausnumero



Store at between/ Lagerung bei zwischen/ Conserver à entre/ Conservare a tra/ Conservar a temp. Entre/ Armazena entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilítada temperatuuridel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ Skladiščenje med/ Säilytys x-y Celsiusasteen lämpötilassa



Contains sufficient for x tests/ Inhalt ausreichend für x Tests/ Contient suffisant pour x tests/ Contenuto sufficiente per x test/ Contenido suficiente para x pruebas/ Conteúdo suficiente para x testes/ Bevat voldoende voor x bepalingen/ Ineholder tilstrækkeligt til x prøver/ Innehållet räcker till x analyser/ Zawartość na x testów/ Tartalma x teszt elvégzésére elegendő/ Obsahuje materiál pre x testov/ Obsah dostačuje pro x testů/ Съдържание достатъчно за x тестове/ Sisust jätkub x katse jaoks/ Το περιεχόμενο επαρκεί για x δοκιμές/ Conținut suficient pentru x teste/ Vsebina zadostuje za x preizkusov/ Sisältö riittää x testille



Radioactive/ radioaktiv/ Radioactif/ Radioattivo/ radioactivo/ radioactief/ radioaktiv/ radioaktiv/ radioaktywny /radioaktiv/ rádioaktívne/ radioaktivní/ радиоактивно/ radioaktiivne/ Ραδιενεργό/radioactive/ radioaktivno/ radioaktiivinen



Incubation time/ Inkubationszeit/ Temps d'incubation/ Tempo d'incubazione/ Tiempo de incubación/ Tempo de incubação/ incubatietijd/Inkubationstid/ inkubationstid/ Czas inkubacji/ Inkubációs idő/ Inkubačná lehota/ Inkubační doba/ Инкубационен период/ Inkubatsiooniaeg/ Χρόνος επώασης/ Timp de incubare/ Inkubacijska doba/ inkubaatioaika



Incubate at/ Inkubation bei/ Incuber à/ Incubare a/incubar a/Incubar a/ incubatietemperatuur/ Inkubation ved/ inkubation vid/ Inkubacja przy/ Inkubáció hőmérséklete/ Inkubácia pri/ Inkubace při/ Инкубира се при/ Inkubatsioon temperatuuril/ Επώαση στους/ Incubare la/ Inkubacija pri/ inkubaatiolämpötila



Mix tubes with a Vortex mixer/ Mix Röhrchen mit Vortex Mixer/ Mélanger à l'aide d'un vortex/ Miscelare la provetta con agitatore Vortex/ Tubos de mezcla con mezclador de vortex/ Misturar os tubos com um agitador Vortex/ buisjes mengen met een Vortex/ Blanderør med Vortex-mixer/ Blanda rören med en vortexblandare/ Miksowanie rurek w mikserze Vortex/ Csövecskék keverése örvénykeverővel/ Premiešat' pomocou prístroja Vortex/ Promíchat pomocí přístroje Vortex/ Разбъркване на епруветките с миксер Vortex/ Segada torukesi Vortexi mikseriga/ Αναμίξτε τους σωληνίσκους με αναδευτήρα Vortex/ Amestecați eprubetele cu ajutorul unui agitator vortex/ Mešanje cevčic z mešalnikom Vortex/ Sekoita putket Vortex sekoittajalla



All/ alle/ Tout/ Tutto/ Todo/ tudo/ alle/ alle/ alla/ wszystkie/ minden/ všetko/ všechno/всички/kõik/ όλα/ toate/Vsi/kaikki



Not/ Nicht/ Non/ Non/ No/ Não/ niet/ Ikke/ inte/ nie/ Nem/ не/ mitte / όχι / Nu /Ne/ ei

## Exemplary version, do not use to perform assays

|                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| <b>B0</b>                             | Maximal Binding/ maximale Bindung/ Liaison maximale/ legame max./ Enlace máximo/ Ligaçāo máxima/ maximale binding/ maksimal binding/ maximal binding/ maksymalne wiązanie/maximális kötés/ Maximálne väzby/ Maximální vazby/ максимално свързване/ maksimaalne sidumine/ Μέγιστη δέσμευση/ legătura maximă/ Maksimalna vez/ Maksimaalinen sidos   |
| <b>TC</b>                             | Total Counts/ Total Counts/ Coups totaux/ Conte totali/ Conteo total/ Total de Contagens/ totaaltellingen/ Samlede tællinger/ totalt antal/ Licznik całkowity/ Teljes szám/ Celkový počet/ Celkový počet/ Общо количество/ Σύνολο αποικιών/ Număr total/ Skupno število/ Kokonaissykkykset  |
| <b>T</b>                              | Streptavidin-coated Tubes/ Streptavidin-beschichtete Röhrchen/ tubes revêtus de streptavidine/ Provette rivestite di streptavidina/ Tubos recubiertos con estreptavidina/ Tubos revestidos com Streptavidina/ buisjes met streptavidin gecoat/ Streptavidin-coatede rør/ streptavidinbelagda rör/ Rurki z powłoką streptawidynowym/ Streptavidin-bevonatú csővecskék/ Rúrky s vrstvou streptavidínu/ Trubičky s vrstvou streptavidínu/ Натоварени със стрептавидин епруветки/ Streptavidiniiga kaetud torukesed/ Σωληνίσκοι επικαλυμμένοι με στρεπταβιδίνη/ Εпруβете асорерите Streptavidin/ Cevçice, prekrité s streptavidinom/ Streptavidiinilla pinnoitetut putket |
| <b>Rec in</b>                         | Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituir en/ Reconstituir em/ reconstituieren in/ Rekonstituér i/ rekonstituera/ Rekonstytuować w/ Helyreállítás/ Znovu pripravít za/ Znovu pripravít za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti/ Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ rekonstituoi  |
| <b>SPE</b>                            | Sample/ Probe/ Echantillon/ campione/ Muestra/ Amostra/ monster/ Prøve/ prov/ Próbka/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probă/ Vzorec/ Näyte   |
| <b>A</b>                              | Buffer/ Puffer/ Tampon/ Tampone/ Tampón/ Tampão/ Buffer / / Buffer / buffert / Bufor / /puffer /pufoer /pufr /Буфер /puhver /Ρυθμιστικό/ Tampon / Pufer / Puskuri   |
| <b>C</b>                              | Tracer/ Tracer/ Traceur/ Tracciatore/ Trazador/ Marcador/ tracer/ Tracer/ spårämne/ Indykator/ Nyomjelző/ Indikátor/ Indikátor/ Трейсер/ Kandur/ Ιχνηθέτης/ Indicator/ Sledilna snov/ indikaattori  |
| <b>R</b>                              | Capture Antibody/ Fang-Antikörper/ Anticorps de capture/ Anticorpo di cattura/ Anticuerpos de captura/ Anticorpo de captura/ vanger-antilichaam/ Fæstet antistof/ fångande antikropp/ Przechwytywanie antycjal/ Elfogó antitest/ Zachytenie protilátky/ Zachycení protilátky/ Захващащо антицяло/ Haarde-antikehad/ Ακίνητοποιημένο αντίσωμα/ Captură anticorpi/ Lovilna protitelesa/ sekundäärinen vasta-aine  |
| <b>S</b>                              | Specific Antibody/ spezifischer Antikörper/ Anticorps spécifique/ Anticorpo specific/ Anticuerpos específicos/ Anticorpo específico/ specifieke antilichaam/ Specifisk antistof/ specifisk antikropp/ Określone antycyjal/ specifikus antitest/ Špecifická protilátka/ Špecifická protilátka/ Специфично антицяло/ eriomased antikehad/ Ειδικό αντίσωμα/ anticorpi  |
| <b>F-L</b>                            | Calibrator X/ Kalibrator X/ calibrateur X/ calibratore X/ calibrador X/ calibrador X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrátor X/ kalibrátor X/ калибратор X/ kalibraator X/ Βαθμονομητής X/ calibrator X/ kalibrator X/ kalibraattori X  |
| <b>N</b>                              | Control X/ Kontrolle X/ Contôle X/ controllo X/ control X/ Controle X/ controle X/ Kontrol X/ Kontroll X/ kontrolne X/ Ellenőrző X/ Kontrolné X/ Kontrolni X/ Контролен X/ Kontroll X/ ελέγχου X/ control X/ Kontrolni X/ Kontrolli X   |
| <b>ASP</b>                            | Aspirate liquid completely/ Flüssigkeit vollständig absaugen/ Aspirer le liquide complètement/ Aspirare completamente il liquid/ Succionar todo el liquid/ Aspirar completamente o liquid/ vloeistof volledig opzuigen/ / Sug upp all vätska/ Całkowicie odessać ciecz/ Folyadék teljes elszívása/ Kvarpalinu úplne odsat/ Kapalinu úplně odsát/ Аспирирайте течността напълно/ Tõmmata vedelik täielikult sisse/ Αναρροφήστε πλήρως το υγρό/ Aspirați lichidul complet/ Zsesavanje tekočine v celoti/ ime neste täydellisesti  |
| <b>MEASURE</b>                        | Count radioactivity of all Tubes/ Radioaktivität aller Röhrchen messen/ Compter l'activité de tous les tubes/ Misurare la radioattività di tutte le provette/ Medir la radioactividad de todos los tubos/ Medir a radioactividade de todos os tubos/ Literature/ Literatur/ Bibliographie/ Letterario/ Bibliografía/ Literatura documentação/ literatuur/ Litteratur/ litteratur/ Literatura/ Irodalom/ Literatúra/ Literatura/ Литература/ Kirjandus/ Βιβλιογραφία/ Bibliografie/ literatura/ Lähdeluettelo  |
| <b>Literature</b>                     |   |
| <b>International Test Description</b> | International test description/ internationale Testanleitung/ description internationale de test/ Istruzioni per il test internazionali/ Descripción de ensayo internacional/ Descrição internacional do teste/ internationale testbeskrivning/ internationell testbeskrivning/ Opis testu międzynarodowego/ nemzetközi teszt-útmutató/ Medzinárodný návod k testu/ Mezinárodní návod k testu/ rahvusvaheline katse kirjeldus/ Διεθνείς οδηγίες για εργαστηριακές δοκιμές/ instrucțiuni internaționale pentru testare/ mednarodna navodila za preizkus/ Kansainvälinen käyttöohje   |

**Inhaltsverzeichnis/  
Table of Contents**

|   |    |
|---|----|
| TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN + EINSATZMÖGLICHKEITEN | 5  |
| EINFÜHRUNG                                      | 5  |
| VERWENDUNGSZWECK                                | 6  |
| METHODIK  | 6  |
| ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG             | 7  |
| PROBEN: Eignung, Vorbereitung und Lagerung      | 7  |
| MATERIALIEN                                     | 8  |
| TECHNISCHE HINWEISE                             | 8  |
| WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN             | 9  |
| TESTDURCHFÜHRUNG                                | 10 |
| AUSWERTUNG                                      | 11 |
| REFERENZWERTE                                   | 11 |
| TECHNICAL FEATURES+APPLICATIONS                 | 14 |
| INTRODUCTION                                    | 14 |
| INTENDED USE                                    | 15 |
| PRINCIPLE                                       | 15 |
| PERFORMANCE CHARACTERISTICS                     | 16 |
| SPECIMEN COLLECTION, PREPARATION AND STORAGE    | 16 |
| REAGENTS PROVIDED                               | 17 |
| MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED             | 17 |
| REAGENT PREPARATION                             | 17 |
| WARNINGS AND PRECAUTIONS                        | 17 |
| ASSAY PROCEDURE                                 | 19 |
| CALCULATION OF RESULTS                          | 19 |
| EXPECTED NORMAL VALUES                          | 20 |
| LITREATURE / LITERATUR                          | 28 |
| KURZANLEITUNG – Mediagnost hLEPTIN RIA CT R44   | 30 |
| SUMMARY – Mediagnost LEPTIN RIA-CT R44          | 31 |
| REF R44 International Test Description          | 32 |

\*

## PACKUNGSBEILAGE DEUTSCH

### TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN + EINSATZMÖGLICHKEITEN

- ◆ Messung der gesamt-Leptin-Konzentration in **Serum, Plasma**
- ◆ Kalibriert am Internationalen Standard der **WHO: NIBSC Code 97/594**
- ◆ Hoch affine Antikörper keine Beeinträchtigungen durch Leptin-Bindungsproteine
- ◆ **Einzelkalibrators** mit **0 - 64 ng/mL** sind im Kit enthalten
- ◆ Einfache Handhabung: gebrauchsfertiger Kalibrator/ weiter Kalibratorbereich
- ◆ Einsatz kleiner Serumvolumina, Messungen von Kapillarblut

### EINFÜHRUNG

1994 wurde das Proteohormon Leptin als das Produkt des ob-Gens identifiziert (1,2). Es besitzt ein Molekulargewicht von 16 kD und man nimmt an, daß es eine Schlüsselrolle bei der Regulierung des Körpergewichts spielt. Seine Aminosäuresequenz weist keine größeren Homologien zu anderen Proteinen auf (1). Leptin wird fast ausschließlich von differenzierten Fettzellen produziert (3-5). Es wirkt auf das zentrale Nervensystem ein, vor allem auf den Hypothalamus, wobei es die Nahrungsaufnahme unterdrückt und den Energieverbrauch steigert (2,6-9). Es existieren unterschiedlich gespleißte Formen des Leptin-Rezeptors, die sich in ihrer Länge unterscheiden. Sie gehören zu der Cytokin-Klasse-1-Rezeptor-Familie (10-12) und kommen ubiquitär im Körper vor (10,11,13,14). Dies läßt auf eine umfassende Funktion von Leptin schließen, die bis jetzt aber noch nicht völlig verstanden wird.

Eines der vielen Leptin Bindungsproteine stellt eine zirkulierende Form eines Leptin-Rezeptors dar (15).

Neben seinem Einfluß auf den Stoffwechsel besitzt Leptin auch einen starken Einfluß auf eine Anzahl endokriner Achsen. In männlichen Mäusen schwächte es die durch Hungern induzierte ausgeprägte Abnahme von LH, Testosteron und Thyroxin bzw. die Zunahme von ACTH und Corticosteron ab. In weiblichen Mäusen verhinderte Leptin die durch Hungern induzierte Verzögerung des Eisprungs (16). Ob/ob-Mäuse, die aufgrund einer ob-Genmutation einen Leptin-Mangel aufweisen, sind unfruchtbar. Dieser Defekt konnte durch Leptinapplikation korrigiert werden, jedoch nicht durch Gewichtsverlust infolge von Nahrungskarenz (17). Dies läßt darauf schließen, dass Leptin eine wichtige Rolle für die Reproduktion spielt.

Die Wirkung von Leptin kann wenigstens teilweise auf den supprimierenden Effekt von Leptin auf die Bildung und Sekretion von Neuropeptid Y (NPY) durch Neuronen des Nucleus arcuatus erklärt werden (6,18,19). NPY ist ein starker Stimulator für den Appetit (20,21) und ist bekanntermaßen an der Regulation verschiedener Hypophysen-Hormone beteiligt. Dazu gehören z.B. die Suppression von Wachstumshormon durch Stimulierung von Somatostatin (22,23), die Suppression von Gonadotropinen (23) und die Stimulierung der Hypophysen-Nebennieren-Achse (21).

Die wichtigste Variable, die die zirkulierende Leptinkonzentration bestimmt, ist die Körperfettmasse (24-26). Bei regelmäßiger Nahrungszufuhr reflektiert Leptin den Anteil von Fettgewebe (27). Die Leptinkonzentration steigt exponentiell mit der Fettmasse an. Diese konstitutive Synthese von Leptin wird durch eine Vielzahl von nicht-hormonellen und hormonellen Faktoren moduliert. Stimulatoren bei Nagern und Menschen sind Überernährung (28,29), Insulin (3,5,30-33) und Glucocorticoide (5,34-36). Hemmfaktoren sind Fasten (27), cAMP und  $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten (35).

Generell läßt sich sagen, daß Leptin einen wesentlichen Bestandteil einer Vielzahl von metabolischen und endokrinen Feedback-Schleifen darstellt.

Für die klinische Verwendung ist es wichtig zu wissen, daß die Leptinwerte eine moderate zirkadiane Variation zeigen, mit einem Maximum gegen 2 Uhr nachts (37). Die Leptinwerte zu dieser Zeit sind um etwa 30 - 100% höher als die Werte, die morgens oder am frühen Nachmittag

gemessen werden. Zusammen mit der Nahrungsaufnahme müssen diese Schwankungen bei der Entnahme von Blutproben berücksichtigt werden. Unter standardisierten Bedingungen, z.B. normaler Essensrhythmus und Blutabnahme am Morgen oder frühen Nachmittag, reicht eine Leptin-Messung für eine informative Aussage aus.

Für eine aussagekräftige Interpretation der gemessenen Leptin-Werte werden Referenz-Bereiche benötigt. Da die Körperfettmasse die Werte am meisten beeinflusst, sollten Referenz-Bereiche auf Körperfettmasse bezogen sein (Body Mass Index, BMI, oder Prozent Körperfett, bestimmt durch Bioelektrische Impedanz-Schätzung, BIA). Es besteht eine Altersabhängigkeit (38) der Leptinwerte. Außerdem besitzen Frauen bei gleicher Fettmasse einen höheren Leptinspiegel als Männer (39,40). Daher sollten die Referenzbereiche zusätzlich noch das Geschlecht und die pubertäre Entwicklung berücksichtigen.

Der bei fettleibigen Menschen vorliegende meist hohe Leptinspiegel läßt auf eine Leptin-Unempfindlichkeit schließen (20, 26, 37, 38, 41, 42). Bei einer kleinen Anzahl von Patienten wurden jedoch unverhältnismäßig niedrige Leptinwerte, bezogen auf die Körperfettmasse, gefunden. Weitere Studien werden nötig sein, um zu beweisen, daß diese Patienten ein neues pathophysiologisches Krankheitsbild repräsentieren: Leptinmangel. Da Leptin von großer Wichtigkeit für reproduktive Funktionen ist, können möglicherweise neue pathophysiologische Mechanismen entdeckt werden, die Unfruchtbarkeit mit einer ungenügenden Leptin-Produktion verknüpfen.

## VERWENDUNGSZWECK

Mit diesem Immunoassay Kit kann humanes Leptin in Serum oder Plasma (EDTA-/Heparin-Plasma) bestimmt werden.

Sofern ein normaler Essrhythmus vorliegt, reicht die Einzel-Messung einer Blutprobe, die morgens oder am frühen Nachmittag gewonnen wurde, völlig aus.

Der Vergleich der Ergebnisse mit BMI-bezogenen Referenzwerten kann bei der Einschätzung eines relativen Leptinmangels als mögliche Ursache für Fettleibigkeit helfen bzw. Hinweise auf eine Leptin-Resistenz geben.

Aufgrund seiner hohen Korrelation mit der Körperfettmasse kann die Leptin-Bestimmung unter standardisierten Bedingungen als einfacher und kostengünstiger Test für die Bestimmung des Körperfettes genutzt werden.

## METHODIK

Der Radioimmunoassay für humanes Leptin verwendet einen polyklonalen Antikörper mit hoher spezifischer Affinität für Leptin. Leptin wird quantitativ erkannt, eventuell vorhandene Bindungsproteine von Leptin stören den Test nicht. Die Röhren wurden mit Streptavidin beschichtet. Die Separation erfolgt durch einen biotinylierten Sekundär-Antikörper mit Bindungsspezifität für den Primär-Antikörper. Die Kalibratoren und der <sup>125</sup>I-Tracer wurden aus rekombinantem Leptin hergestellt.

### Kalibrierung des Assays:

Der Assay ist am Internationalen Standard für human Leptin kalibriert. Der Standard der WHO wird unter Code 97/594 (43) vom NIBSC (44) vertrieben. Eine Ampulle der Präparation, in 1 mL Verdünnungspuffer des Kits rekonstituiert, wird mit dem Nominalgehalt von 5000 ng rekombinanten human Leptin bestimmt.

Die Kalibratoren bestehen aus rekombinantem Leptin in Konzentrationen von **1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 ng/mL**.



## ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG

Die **analytische Sensitivität** des R44 beträgt **0,1 ng/mL** (zweifache Standardabweichung des Null-Kalibrators).

Der Mediagnost Leptin RIA R44 ist über einen sehr weiten Bereich verdünnungsecht. Die **Linearität von Serenverdünnungen** ist hervorragend (s. Abb 9)

Die **Wiederfindung** von rekombinantem hLeptin in verschiedenen Humansenen betrug im **Mittel 97%** der theoretisch zu erwartenden Menge.

Die Inter- und Intra-Assay Variationskoeffizienten liegen beide deutlich unter 10 %. Beispielhafte Bestimmungen sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 1 :** Inter-Assay-Varianz

|                | <b>Mittelwert (ng/mL)</b> | <b>Standardabweichung (ng/mL)</b> | <b>VK (%)</b> |
|----------------|---------------------------|-----------------------------------|---------------|
| <b>Probe 1</b> | 8.975                     | 0.48                              | 5.3           |
| <b>Probe 2</b> | 6.3                       | 0.32                              | 5.1           |
| <b>Probe 3</b> | 20.9                      | 1.05                              | 5.0           |

**Tabelle 2:** Intra-Assay-Varianz

|                | <b>Anzahl der Bestimmungen</b> | <b>Mittelwert (ng/mL)</b> | <b>Standardabweichung (ng/mL)</b> | <b>VK (%)</b> |
|----------------|--------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|---------------|
| <b>Probe 1</b> | 6                              | 19,67                     | 0,87                              | 4,4           |
| <b>Probe 2</b> | 6                              | 6,95                      | 0,33                              | 4,8           |

### PROBEN: Eignung, Vorbereitung und Lagerung

Geeignet sind Serum- und Heparin/EDTA-Plasmaproben (in korrespondierenden Serum- und EDTA-Plasma-Proben wurden keine signifikanten Abweichungen im hLeptin-Gehalt gefunden). Eine spezielle externe Probenvorbereitung ist nicht nötig.

### Warnhinweis

Biotin-Konzentrationen von >125 ng/mL in R44 zeigten signifikante Interferenzen mit dem Assay-System und führten zu falsch hohen Werten. Daher können Proben von Patienten mit hochdosierter Biotintherapie (>10 mg/Tag) für die Leptinmessung mit diesem Test nicht verwendet werden.

Generell sollten Proben so schnell wie möglich nach der Abnahme gekühlt werden. Falls zwischen Abnahme und Bestimmung ein längerer Zeitraum liegt, sollten die unverdünnten Proben bei -20°C oder kälter in fest verschließbaren Plastikgefäßen aufbewahrt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Serum/Plasma sollte prinzipiell vermieden werden (gegebenenfalls subaliquotieren) einige Zyklen (5x) haben in unseren Versuchen jedoch auf die messbare hLeptin Konzentration keine Auswirkungen gehabt.

Die hohe Sensitivität des Assays erlaubt hLeptin Messungen in kleinen Probenvolumina. Im Allgemeinen ist durch den großen Messbereich des Kits eine vorbereitende Serum- oder Plasma-Verdünnung nicht notwendig. Für die meisten Untersuchungen (Serum- oder Plasmaproben und keine Extremwerte zu erwarten) sollten unverdünnte Proben mit 25 µL pro Röhrchen eingesetzt, geeignet sein. Falls Werte von über 64 ng/mL erreicht werden können, sollte und kann die Probe


## Exemplary version, do not use to perform assays

vorab in Testpuffer A verdünnt werden, z.B. bei stark adipösen Patienten (BMI>35kg/m<sup>2</sup>) wird eine Vorverdünnung von 1:10 empfohlen.

Die hLeptin-Konzentrationen in anderen humanen Körperflüssigkeiten und in Kulturüberständen können stark von den Serumwerten abweichen.

## MATERIALIEN

### Inhalt der Testpackung

|   |  |
|---|--|
| <b>T</b>  | <b>Röhrchen</b> , 125 Stück, beschichtet mit Streptavidin.   |
| <b>F-L</b>  | <b>Kalibratoren</b> , gebrauchsfertig, <b>750 µL</b> , enthalten rekombinantes humanes Leptin Die Kalibrationskurve deckt einen Bereich von <b>1-64 ng/mL</b> (1; 2; 4; 8;16 ;32 und 64 ng/mL) Leptin ab. Für den Assay werden jeweils <b>25 µL pro Röhrchen</b> eingesetzt. |
| <b>A</b>  | <b>Testpuffer</b> , gebrauchsfertig, <b>125 mL</b> , zur Rekonstitution von <b>R, S, C, N</b> .  |
| <b>S</b>  | <b>Spezifischer Antikörper</b> , lyophilisiert, <b>7 mL</b> , Rekonstituieren in <b>7 mL A</b> .   |
| <b>R</b>  | <b>Fang-Antikörper</b> , lyophilisiert, <b>7 mL</b> , biotinyliertes anti-Kaninchen-IgG. Rekonstituieren in <b>7 mL A</b> .  |
| <b>C</b>  | <b>Tracer</b> , lyophilisiert, <b>13 mL</b> , 2,25 µCi bzw. < 83 kBq in <b>13 mL A</b> rekonstituieren, rot gefärbt.   |
| <b>N</b>  | <b>Kontrolle</b> , lyophilisiert, <b>750 µL</b> , in <b>750 µL A</b> rekonstituieren. Soll-Konzentration auf dem Zertifikat +/- 2SD.   |
|  | <b>Packungsbeilage</b>   |
|   | <b>Qualitätszertifikat</b>   |

### Zusätzlich benötigte Materialien

Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen

Vortex-Mischgerät

Gamma-Zähler

Schüttler

## TECHNISCHE HINWEISE

Der Assay ist strikt nach dem Testprotokoll durchzuführen.

Reagenzien mit unterschiedlichen Lot-Nummern sollten nicht vermischt werden. Die Reagenzien sind ungeöffnet lichtgeschützt und bei 2° - 8°C gelagert mindestens haltbar bis zum Verfallsdatum (s. Etikett).

Für die Rekonstitution der lyophilisierten Komponenten muss der im Kit erhaltene Testpuffer A verwendet werden. Es empfiehlt sich zum Rekonstituieren die Reagenzien 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen zu lassen und sie anschließend kräftig mit einem Vortex-Mixer zu mischen. Schaumbildung sollte jedoch vermieden werden. Dies gilt insbesondere für die Kontrolle N!

Die Haltbarkeit der geöffneten Reagenzien entspricht der Tracer **C** Haltbarkeit.

Rekonstituierte Komponenten sollten bei -20°C (oder kälter) aufbewahrt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Alle Komponenten des Kits müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden, die evtl. in manchen Puffern vorhandenen Präzipitate müssen vor Gebrauch durch Mischen und Erwärmen wieder gelöst werden. Inkubation bei Raumtemperatur bedeutet: Inkubation bei 20 - 25°C.



## WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Mediagnost Kit ist nur **zur In-vitro Diagnostik** und nicht zur inneren Anwendung bei Mensch und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur exakt wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben eingesetzt werden. Mediagnost GmbH kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht, soweit keine gesetzliche Regelung anderes besagt.

**VORSICHT: Dieser Kit enthält Material humanen und/oder tierischen Ursprungs. Die Bestandteile des Kits sind so zu handhaben, als ob sie infektiös seien.**

Bitte verwenden Sie keine abgelaufenen, offensichtlich beschädigten, mikrobiell kontaminierten oder ausgelaufenen Reagenzien.

Angemessene Vorsichtsmaßnahmen und die Regeln der guten Laborpraxis müssen bei Lagerung, Gebrauch und Entsorgung der Bestandteile des Kits eingehalten werden. Die Entsorgung der Bestandteile des Kits muss nach den örtlichen Vorschriften erfolgen.

### **Menschliches Serum:**

in folgenden Komponenten enthalten: **N**

Das humane Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, ist durch von der US-amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde FDA empfohlene Nachweisverfahren auf die Präsenz von Antikörpern gegen human Immuninsuffizienz Virus (HIV I und II), gegen Hepatitis B-Oberflächenantigen und gegen Hepatitis C Virus geprüft und für negativ befunden worden. Da kein Test das Vorhandensein von infektiösen Erregern völlig ausschließen kann, sollten die Reagenzien gemäß der Vorgaben der Biosicherheitsstufe 2 gehandhabt werden.

### **NaAzid**

< 0,02% Natriumazid

Die Reagenzien enthalten als Konservierungsmittel Na-Azid, allerdings sehr verdünnt (0,02%). Die Reagenzien enthalten als Konservierungsmittel Na-Azid, allerdings sehr stark verdünnt (0,02%). Ein Sicherheitsdatenblatt ist auf Anfrage erhältlich.

### Erste-Hilfe Maßnahmen:

*Nach Hautkontakt:* Nach Berührung mit der Haut während mindestens 15 Minuten mit genügend Wasser abwaschen. Kontaminierte Kleidung und Schuhe wechseln.

*Nach Augenkontakt:* Nach Berührung mit den Augen während mindestens 15 Minuten mit genügend Wasser spülen. Ausreichende Spülung durch Spreizung der Augenlider sicherstellen.

*Nach Verschlucken:* Mund mit Wasser ausspülen, vorausgesetzt die Person ist bei Bewusstsein. Sofort einen Arzt zuziehen.

*Nach Verschlucken:* Mund mit Wasser ausspülen, vorausgesetzt die Person ist bei Bewusstsein. Sofort einen Arzt zuziehen.

**Beim Umgang mit radioaktivem und potentiell infektiösem Material müssen folgende Richtlinien befolgt werden:**

Das Material sollte in speziell ausgewiesenen Bereichen gelagert und verwendet werden.

Essen, Trinken und Rauchen ist in diesem Bereich verboten!

Niemals mit dem Mund pipettieren!

Direkter Kontakt mit diesem Material muss vermieden werden! Deshalb Laborkleidung und Einmalhandschuhe tragen.

Verschüttete Reagenzien müssen sofort aufgewischt und kontaminierte Flächen und Geräte mit einem geeigneten Detergenz gereinigt werden.

Unbenutzte radioaktive Materialien und radioaktiver Abfall müssen entsprechend den Empfehlungen der nationalen Aufsichtsbehörden gelagert werden.

### **Radioaktivität**

Vor der Bestellung oder dem Gebrauch radioaktiver Produkte ist es notwendig, die **Einhaltung der nationalen Bestimmungen** oder Gesetze die deren Anwendung regeln, sicherzustellen. Örtliche Vorschriften der jeweiligen Einrichtung, die Umgang und Verhalten im Radioaktiv-Arbeitsbereich regeln, müssen befolgt werden. Die hier gegebenen Ratschläge ersetzen nicht die lokalen Regeln, Anweisungen oder Ausbildungen der jeweiligen Einrichtung, ebenso wenig die Anordnungen des zuständigen Strahlenschutzbeauftragten. Es ist wichtig, die Richtlinien der guten Laborpraxis zu erfüllen, daneben gilt es die Besonderheiten im Umgang mit dem Radionuklid Jod-125 zu beachten. Jod-125 hat eine Halbwertszeit T<sub>1/2</sub> von 60 Tagen und emittiert 35,5 keV Gamma-Strahlung,

## Exemplary version, do not use to perform assays

27 – 32 keV Röntgen-Strahlung und keine Beta-Strahlung. Effektive Abschirmung ist durch Blei möglich, die Halbwertschichtdicke beträgt 0,02 mm Blei, Reduktion auf 10% ist durch 0,2 mm zu bewerkstelligen.

Zur Reduzierung der Strahlendosis sollte die Zeit des Umgangs mit Radioaktivität minimiert werden (Arbeitsschritte vorplanen), sowie die Entfernung zur Strahlenquelle maximiert werden (Verdopplung der Entfernung reduziert die Strahlendosis auf ein Viertel). Unsachgemäßes Öffnen von Gefäßen oder Pipettieren von Lösungen kann zur Bildung von Aerosolen, also Freisetzung von Radioaktivität in Tröpfchenform, führen und muss vermieden werden. Der pH-Wert von Lösungen, die Jod enthalten, sollte nicht im sauren Bereich sein, da dies zur Freisetzung von flüchtigem elementarem Jod führen kann.

Einige Jod-Verbindungen können durch Gummihandschuhe diffundieren, deshalb sollten zwei Paar oder Polyethylen- und Gummihandschuhe getragen werden.

Zur Reinigung von kontaminierten Flächen oder Gegenständen sollte, um das Jod-125 chemisch zu stabilisieren, alkalische Natriumthiosulfatlösung und Papier od. Zellstoff verwendet werden.

### Warnhinweis

Biotin-Konzentrationen von >125 ng/mL in R44 zeigten signifikante Interferenzen mit dem Assay-System und führten zu falsch hohen Werten. Daher können Proben von Patienten mit hochdosierter Biotintherapie (>10 mg/Tag) für die Leptinmessung mit diesem Test nicht verwendet werden.

## TESTDURCHFÜHRUNG

| Nr.   | Röhrchen       | A, F – L, N, Proben | R   | S   | C   |
|-------|----------------|---------------------|-----|-----|-----|
| 1,2   | TC             | ---                 | --- | --- | 100 |
| 3,4   | B <sub>0</sub> | A: 25               | 50  | 50  | 100 |
| 5-18  | Kalibratoren   | F-L: 25             | 50  | 50  | 100 |
| 19,20 | Kontrolle      | N: 25               | 50  | 50  | 100 |
| 21,22 | Probe 1        | 25                  | 50  | 50  | 100 |
| 23,24 | Probe 2        | 25                  | 50  | 50  | 100 |
| etc.  |                |                     |     |     |     |

(Alle Volumina in µL)

- Beschriftung der Röhrchen:  
1, 2 Gesamtaktivität (total counts, TC),  
3, 4 Nullkalibrator (B<sub>0</sub>),  
5 - 18 Kalibratoren F bis L als Doppelwerte,  
19, 20 Kontrolle N,  
ab 21 Proben als Doppelwerte.
- Zugabe von je 25 µL Reagenz A (Testpuffer) in Röhrchen 3, 4.  
Zugabe von je 25 µL der Reagenzien F- L (Kalibratoren) in Röhrchen 5-18:  
5, 6 Kalibrator F,  
7, 8 Kalibrator G; usw. bis 18.
- Zugabe von je 25 µL Kontrolle N in Röhrchen 19 und 20.
- Zugabe von je 25 µL Probe ab Röhrchen 21.
- Zugabe von 50 µL Reagenz R (Fang-Antikörper), ab Röhrchen 3.
- Zugabe von 50 µL Reagenz S (Spez. Antikörper), ab Röhrchen 3.
- Zugabe von 100 µL Reagenz C (Tracer) in alle Röhrchen.  
Röhrchen 1 und 2 (Gesamtaktivität) mit Stopfen verschließen und bis zum Schritt 12) beiseite stellen.
- Die restlichen Röhrchen über Nacht (mindestens 15 Stunden) bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bei 350 upm inkubieren.
- Flüssigkeit ab Röhrchen 3 dekantieren oder vollständig absaugen, dabei darf die Beschichtung der Röhrchen nicht beschädigt werden.
- Zugabe von je 500 µL Testpuffer A
- Flüssigkeit vollständig dekantieren oder absaugen, siehe Punkt 9).

12) Alle Röhrchen im Gamma-Counter für 1 (bis 3) min zählen.

## AUSWERTUNG

### Berechnung der Kalibrationskurve

Die bereitgestellten Kalibratoren enthalten folgende Leptin-Konzentrationen:

| Kalibrator | B <sub>0</sub> | F | G | H | I | J  | K  | L  |
|------------|----------------|---|---|---|---|----|----|----|
| ng/mL      | 0              | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 |

- 1) Ermittlung des **Mittelwerts** (MW) der Doppelbestimmungen (entspricht der Bindung B).
- 1) Der Mittelwert des Nullkalibrators (Röhrchen 3&4) entspricht B<sub>0</sub>.
- 2) Berechnung der Prozentverhältnisse (%B/B<sub>0</sub>).
- 3) Auftragen von %B/B<sub>0</sub> gegen die Konzentrationen der Kalibratoren in halb-logarithmischem oder logit-log Maßstab auf Papier oder per Computerauswertung
- 4) Qualitätskontrolle, Berechnung des Nullkalibrators in %:  
B<sub>0</sub>/Gesamtaktivität (MW Röhrchen 3&4 / MW Röhrchen 1&2) x100%. Soll: %B<sub>0</sub>/TC > 20%

### Ermittlung der Proben-Konzentrationen:

Die Leptin-Konzentration (Abszisse, x-Achse) wird entsprechend dem %B/B<sub>0</sub>-Wert der Probe aus dem Schaubild abgelesen.

Beispiel:

Mittelwert der Röhrchen 3 und 4 (Nullkalibrator, B<sub>0</sub>): 8648 cpm

Mittelwert der Röhrchen 21 und 22 (Probe 1): 4283 cpm

$$\%B/B_0 = \frac{\text{Probe}}{B_0} \times 100\% = \frac{4283}{8648} \times 100\% = 49,5\%$$

Ein Wert von 49,5% auf der Ordinate (y-Achse) entspricht in dem hier gewählten Beispiel einem Abszissen-Wert von 7,28 ng/mL.

Bei vorausgegangener Verdünnung der Probe ergibt sich die Leptin-Konzentration der Probe durch Multiplikation des aus der Grafik (oder mit Hilfe eines Computer-Programms) ermittelten Werts mit dem Verdünnungsfaktor.

### Konzentration der Kontrolle:

Der aus der Kalibrationskurve ermittelte Wert für die Kontrolle N sollte innerhalb des zertifizierten Bereichs liegen. Die ermittelten Leptin-Konzentrationen der Proben können nur als valide angesehen werden, wenn die Kontrolle mit einem Wert innerhalb des Sollbereichs gefunden wird. Andernfalls ist eine Fehleranalyse durchzuführen als deren Resultat die Ergebnisse des Testes akzeptiert oder verworfen werden.

## REFERENZWERTE

Die Serum-Leptin-Konzentrationen spiegeln hauptsächlich die Körper-Fettmasse wieder. Schlanke Personen besitzen niedrige, fettleibige Personen hohe Leptin-Werte. Außerdem besteht ein eindeutiger Geschlechtsunterschied zwischen Mann (niedrigere Werte) und Frau (höhere Werte) bei gegebenem Körperfett-Verhältnis. Die Entwicklung während der Pubertät besitzt ebenfalls einen Einfluss auf den Leptin-Wert. Diese Abhängigkeiten müssen mit in Betracht gezogen werden, bevor Erwartungsbereiche für Leptin-Werte aufgestellt werden können.

Es gibt verschiedene Methoden, den Körperfett-Anteil zu bestimmen, z.B. Berechnung des Body Mass Index (BMI, Gewicht (in kg) dividiert durch das Quadrat der Größe (in m)), Bioelektrische Impedanz-Schätzung (BIA) oder total body dual energy x-ray absorptiometry (DXA). Obwohl die Genauigkeit bei der Einschätzung der tatsächlichen Körperfettmasse durch den BMI schlechter

ist als bei den höherentwickelten Methoden wie BIA oder DXA, besitzt die Angabe des BMI mehrere Vorteile:

- 1) Der BMI ist unabhängig von den angewandten Regressionsmodellen.
- 2) Der BMI ist leicht zu bestimmen, da nur Größe und Gewicht angegeben werden müssen.
- 3) Der BMI ist meist auch nachträglich noch bestimmbar.
- 4) Der BMI ist die präziseste Messung bei kurzfristigen Änderungen der Fettmasse, z.B. während des Fastens.

Daher wurden die folgenden Erwartungsbereiche für Serum-Leptinkonzentrationen auf der Basis des BMI als die wichtigste einschränkende, unabhängige Variable, unter Einbeziehung des Geschlechts und der pubertären Entwicklung, erstellt (45; s. nachstehende Abbildungen 1 bis 8 und Tabellen 4 bis 11). Ab einem Alter von 20 Jahren wurde keine signifikante Altersabhängigkeit der Werte mehr gefunden. Die aufgeführten und nach Geschlecht und Alter getrennten Erwartungswerte können bei gegebenem BMI des Patienten zum Vergleich mit gemessenen Leptin-Werten von normalen Patienten genutzt werden, um pathologische Abweichungen festzustellen.

Die besten Regressionen für die verschiedenen Personengruppen (siehe Abbildungen 1 bis 8) ergeben sich mit folgender Exponentialfunktion:

$$\text{Leptin} = a \cdot e^{(b \cdot \text{BMI})}$$

Die 5. und 95. Perzentile werden durch folgende Gleichungen wiedergegeben:

$$\text{Leptin} = a \cdot e^{(b \cdot \text{BMI} - c)}$$

bzw.  $\text{Leptin} = a \cdot e^{(b \cdot \text{BMI} + c)}$

Bei halb-logarithmischer Auftragung (y-Achse = log Leptin) ergeben diese Funktionen Geraden. Die Werte für a, b und c sind in Tabelle 3 getrennt nach Geschlecht, pubertärer Entwicklung und für Erwachsene angegeben. Mit diesen Werten können die Erwartungsbereiche für Leptin im Bedarfsfall leicht auch auf höhere oder niedrigere BMI-Bereiche ausgeweitet werden.

Beispiel:

Die 50. Perzentile für Jungen im Tanner-Stadium 3 & 4 wird durch die folgende Kurve wiedergegeben:

$$\text{Leptin} = 0,0181 \cdot e^{(0,2067 \cdot \text{BMI})}$$

Die 5. Perzentile entspricht:  $\text{Leptin} = 0,0181 \cdot e^{(0,2067 \cdot \text{BMI} - 1,1919)}$

und die 95. Perzentile entspricht:  $\text{Leptin} = 0,0181 \cdot e^{(0,2067 \cdot \text{BMI} + 1,1919)}$

In einem halb-logarithmischen Diagramm entsprechen diese Funktionen parallelen Geraden mit gleichen Abständen zur 50. Perzentile.

#### Berechnung der Standardabweichung (SA; Z-Werte):

Eine geeignete Methode, die Abweichung einer gemessenen Leptin-Konzentration vom entsprechenden Referenzbereich festzustellen, ist die Berechnung der Standardabweichung. Hierbei wird der gemessene Leptin-Wert bei gegebenem BMI des Patienten zu dem Leptin-Wert der entsprechenden Geschlechts- und Altersgruppe in das Verhältnis gesetzt. Die berechnete Abweichung entspricht der x-fachen Standardabweichung. Auf diese Weise können die Leptin-Werte nach BMI, Geschlecht und pubertäre/s Entwicklung/Alter eingestuft werden und für weitere Analysen gepoolt werden. Dadurch kann z.B. der Einfluss von BMI, Geschlecht und Alter für die weiteren Analysen eliminiert werden.

Aufgrund der logarithmischen Abhängigkeit der Leptin-Werte berechnet sich die Leptin-SA wie folgt:

$$\text{Leptin SA} = \frac{\ln(\text{Leptin}) - \ln(a) - b \cdot \text{BMI}}{d}$$

In dieser Gleichung steht "ln" für den natürlichen Logarithmus (bezogen auf die Basis e). Die Konstanten a, b und d sind in Tabelle 3 getrennt für Geschlecht und Alter angegeben.

Beispiel:

Ein Junge im Tanner-Stadium 3, BMI = 25 kg/m<sup>2</sup>, gemessene Leptin-Konzentration = 5 ng/mL:

$$\text{Leptin SA} = \frac{\ln(5) - \ln(0,0181) - 0,2067 \cdot 25}{0,6850} = 0,66$$

#### Abschätzung der optimalen Probenverdünnung:

Da die Serum-Leptin-Werte abhängig von der Körperfettmasse über mehrere Größenordnungen variieren, ist eine adäquate Verdünnung Voraussetzung für eine hohe Messgenauigkeit. Um die Messgenauigkeit optimal auszunutzen, können die Proben daher so verdünnt werden, dass die End-Konzentrationen nahe an diesen Wert herankommen. Die Erwartungsbereiche stellen eine nützliche Hilfe dar, um die erwarteten Leptin-Werte bezogen auf BMI, Geschlecht und Alter einzuschätzen.

Beispiel:

Erwachsene Frau, BMI = 45 kg/m<sup>2</sup> (130 kg, 1,70 m Größe). Der durchschnittliche Leptin-Wert bei einem BMI von 45 kg/m<sup>2</sup> liegt nach den Referenzbereichen für erwachsene Frauen bei ca. 224 ng/mL. Die gut geeignete Verdünnung wäre hier also z.B. 1:30.

## PACKAGE INSERT ENGLISH

### TECHNICAL FEATURES+APPLICATIONS

- ◆ Measures total Leptin concentration in **serum, EDTA/Heparin plasma**
- ◆ Calibrated against the **WHO** International Standard: **NIBSC Code 97/594**
- ◆ High affinity antibodies, no influence of Leptin Bindingprotein
- ◆ ready-to-use calibrators with **0-64 ng/mL** are
- ◆ Small serum volumina sufficient, measurement in capillar blood possible
- ◆ Easy handling

### INTRODUCTION

Leptin, the product of the ob gene (1,2), is a single-chain proteohormone, discovered 1994, with a molecular weight of 16 kD, which is thought to play a key role in the regulation of body weight. Its amino acid sequence exhibits no major homologies with other proteins (1). Leptin is almost exclusively produced by differentiated adipocytes (3-5). It acts on the central nervous system, in particular the hypothalamus, thereby suppressing food intake and stimulating energy expenditure (2,6-9). Leptin receptors - alternatively spliced forms exist that differ in length - belong to the cytokine class I receptor family (10-12). They are found ubiquitously in the body (10, 11, 13, 14) indicating a general role of leptin, which is currently not fully understood. A circulating form of the leptin receptor exists which acts as one of several leptin binding proteins (15). Besides its metabolic effects, leptin was shown to have a strong influence on a number of endocrine axes. In male mice, it blunted the starvation-induced marked decline of LH, testosterone, thyroxine and the increase of ACTH and corticosterone. In female mice, leptin prevented the starvation-induced delay in ovulation (16). Ob/ob mice, which are leptin deficient due to an ob gene mutation, are infertile. This defect could be corrected by administration of leptin, but not through weight loss due to fasting (17), suggesting that leptin is pivotal for reproductive functions.

All these actions may, at least in part, be explained by the suppressive effect of leptin on neuropeptide Y (NPY) expression and secretion by neurons in the arcuate nucleus (6,18,19). NPY is a strong stimulator of appetite (20,21) and is known to be involved in the regulation of various pituitary hormones, e.g. suppression of GH through stimulation of somatostatin (22,23), suppression of gonadotropins (23) or stimulation of the pituitary-adrenal axis (21).

The most important variable that determines circulating leptin levels is body fat mass (24-26). Obviously, under conditions of regular eating cycles, leptin reflects the proportion of adipose tissue (27) showing an exponential relationship (37). This constitutive synthesis of leptin is modulated by a number of non-hormonal and hormonal variables. Stimulators in both rodents and humans are overfeeding (28,29), insulin (3,5,30-33) and glucocorticoids (5,34-36). Suppression has been shown for fasting (27), cAMP and beta-3-adrenoceptor agonists (35). From these findings it becomes clear that leptin is an integral component of various metabolic and endocrine feedback loops (38).

For clinical purposes, it is important to note that serum leptin levels show a moderate circadian variation with a peak during the night at about 2 a.m. (37). The leptin values at this time are about 30 to 100 % higher than the levels measured in the morning or early afternoon. This variation together with the influence of food intake needs to be taken into account, when blood samples are collected.

Under fairly standardized conditions, i.e. normal eating cycles and blood sampling in the morning or early afternoon, a single leptin measurement is informative.

For the appropriate interpretation of measured leptin levels, reference ranges are required. Because body fat mass is the major confounding variable, these ranges should be referred to measures of the percentage body fat such as body mass index (BMI) or percent body fat determined by, e.g., bioelectric impedance assessment (BIA). Leptin levels are higher in females than in males (38,39)



and an age dependence was shown in children and adolescents (40). Therefore, reference ranges referring to measures of body fat should be stratified according to gender and pubertal development.

Leptin levels are high in most obese patients suggesting the presence of leptin insensitivity (20,26,37,38,41,42). In a small percentage of patients, however, leptin levels have been found inappropriately low with respect to their fat mass. It remains for future studies to prove that these patients represent a new pathophysiologic entity: leptin deficiency. Since leptin has also been shown to be of great importance for reproductive functions, possible new pathophysiologic mechanisms may be discovered relating infertility to insufficient leptin production.

The discovery of leptin has released an avalanche of research activities seeking to understand the regulation and actions of this new hormone. Most importantly, it has provided a key to better understand the physiology of body weight regulation and to unveil possible pathophysiologic mechanisms in both obesity and eating disorders. Further, it may provide new insights into certain causes of infertility.

### **INTENDED USE**

This radio immunoassay kit is suited for measuring human leptin in serum or plasma EDTA-/Heparin-Plasma).

Under conditions of normal eating cycles, measurement in a single blood sample collected in the morning or early afternoon is sufficient.

The comparison with BMI-related reference ranges may be useful to detect conditions of relative **leptin deficiency** as a possible cause of obesity or provide an indication for **leptin resistance** respectively.

Due to its high correlation with body fat mass leptin measurements under standardized conditions may be used as a simple and inexpensive test for determination of **body fat**.

### **PRINCIPLE**

For the Radioimmunoassay for the determination of human Leptin a polyclonal rabbit-antibody of high specificity is used. Leptin is measured quantitatively and binding protein does not influence the test results. Tubes were coated with streptavidin and separation is facilitated by biotinylated anti-rabbit-antibody.

Calibrators are prepared of recombinant human leptin in concentrations between **1, 2, 4, 8, 16, 32 and 64 ng/mL**.

### **Calibration of the Assay**

The Assay is calibrated against the International Standard for human leptin. The standard preparation of the WHO with code 97/594 (y) is available from the NIBSC (z). One ampoule of the preparation, reconstituted in 1 mL Assay Buffer, will be quantified with the nominal content of 5000 ng human leptin.

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### Sensitivity

The analytical **sensitivity** of the assay yields **0.1 ng/mL** (2x SD of zero calibrator)

### Intra-Assay-Variation

|          | Number of determinations | Mean value [ng/mL] | Standard Deviation [ng/mL] | VC% |
|----------|--------------------------|--------------------|----------------------------|-----|
| Sample 1 | 6                        | 19.67              | 0.87                       | 4.4 |
| Sample 2 | 6                        | 6.95               | 0.33                       | 4.8 |

### Inter-Assay-Variation

|          | Mean value (ng/mL) | Standard deviation (ng/mL) | VC% (%) |
|----------|--------------------|----------------------------|---------|
| Sample 1 | 8.975              | 0.48                       | 5.3     |
| Sample 2 | 6.3                | 0.32                       | 5.1     |
| Sample 3 | 20.9               | 1.05                       | 5.0     |

### Linearity

The Leptin RIA Lep R44 can be used for diluted samples. The linearity of serum dilutions is excellent (Fig.9).

### Recovery

Serum spiking experiments with recombinant human leptin yielded a recovery of 97% ( $\pm$  2%).

## SPECIMEN COLLECTION, PREPARATION AND STORAGE

**Serum** as well as EDTA/Heparin **plasma samples** are suitable (significant deviation of hLeptin levels in corresponding Serum or -Plasma samples were not found). An external sample preparation prior to assay is not required.

### Warning statement


Biotin concentrations of >125 ng/mL in R44 showed significant interference with the assay system and result in false high values. Therefore samples from patients under high dose biotin therapy (>10 mg/day) cannot be used for Leptin measurement by this test.

Samples should be handled as recommended in general: as fast as possible and chilled as soon as possible. In case there will be a longer period between the sample withdrawal and determination store the undiluted samples frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  or below in tightly closable plastic tubes. Avoid on principal repeated freeze-thaw cycles of serum/plasma (if required, please subaliquote) although Leptin levels were found to be unaffected by few cycles (5x) in our experiments.

The high sensitivity of the assay allows measurement of hLeptin in small sample volumes. Because of the wide effective range of this RIA kit a preparative sample dilution is generally not necessary. For most of the determinations (serum or plasma samples, and no extreme values expected) **the use of undiluted samples 25  $\mu\text{L}$  per tube, should be appropriate.** In case Leptin levels of more than 64 ng/mL are expected, e.g. obese patients (BMI>35), the sample should and can be diluted, e.g. 1:10.

The hLeptin concentrations may be completely different in body fluids of human origin other than serum or cell culture supernatants.

## REAGENTS PROVIDED

|  |   |
|--|---|
| <b>T</b>   | <b>Tubes</b> , ready for use: coated with Streptavidin, 125 Tubes.  |
| <b>F-L</b>   | <b>Calibrators</b> , ready for use: <b>750 µL</b> , contain recombinant Leptin. Calibrator values are between 1 – 64 ng/mL (1; 2; 4; 8; 16; 32; 64 ng/mL) recombinant human leptin. Use <b>25 µL</b> / tube.              |
| <b>A</b>   | <b>Assay Buffer</b> , ready for use, <b>125 mL</b> .  |
| <b>N</b>   | <b>Control Serum</b> , lyophilized, <b>750 µL</b> , contains human serum, reconstitute with <b>750 µL Assay Buffer A</b> . Exact human leptin concentration and the <b>acceptable range</b> are given on the certificate. |
| <b>S</b>   | <b>Specific Antibody</b> , lyophilized, <b>7 mL</b> , contains anti-human leptin antibody. Reconstitute in <b>7 mL Assay Buffer A</b> .   |
| <b>R</b>   | <b>Capture-Antibody</b> , lyophilized, <b>7 mL</b> , biotinylated ant-rabbit-IgG, reconstitute in <b>7 mL Assay Buffer A</b> .  |
| <b>C</b>   | <b>Tracer</b> , lyophilized, <b>13 mL</b> , < 2.25 µCi or < 83 kBq, reconstitute in <b>13 mL Assay Buffer A</b> , red coloured.   |
|  | <b>Instructions for use</b>   |
|  | <b>Quality Certificate</b>  |

## MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Precision pipettes (100 and 200 µL) Micropipettes and multichannel pipettes with disposable plastic tips  
Vortex-mixer  
Shaking Device  
Gamma Counter

## REAGENT PREPARATION

In conducting the assay, follow strictly the test protocol. Room temperature incubation means: Incubation at 20 - 25°C.

Reagents with different lot numbers should not be mixed. All reagents are stable unopened until the expiry date, if stored in the dark at 2° - 8°C (see label).

**Control N** Reagent **R**, **S** and **C** have to be reconstituted in **Assay Buffer A**. It is recommended to keep the reconstituted reagents at room temperature for 30 minutes and then to mix them thoroughly but gently (no foam should result) with a Vortex mixer.

The shelf-life of the reagents after opening is in accordance with the **Tracer C** shelf life.

Reconstituted Components (**Control N** and Reagent **R**, **S**, and **C**) should be stored at -20°C (or below). Repeated freeze-thaw cycles have to be avoided.

Before use, all kit components should be brought to room temperature. **Precipitates, possible in buffers, should be dissolved before use through mixing and warming.**

## WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

Possession and use of the kit are subject to the regulations of the national nuclear regulatory authorities.

Reagents with different lot numbers should not be mixed.

- Reagents contain sodium azide as preservative, however, highly diluted (0.02%).
- Safety Data Sheet available on request.

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

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

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

Caution: This kit contains material of human and/or animal origin. Source human serum for the Control provided in this kit was tested by recommended methods and found non-reactive for Hepatitis-B surface antigen (HBsAg), Hepatitis C virus (HCV), and Human Immunodeficiency Virus 1 and 2 (HIV) antibodies. No known test methods can offer total

## Exemplary version, do not use to perform assays

assurance of the absence of infectious agents; therefore, all components and patient's specimens should be treated as potentially infectious.

**Radioactivity** - Before ordering or using radioactive materials, it is necessary to take the appropriate actions to ensure compliance with national regulations governing their use. Local rules in each establishment, which define actions and behaviour in the radioactivity working areas, should also be adhered to. The advice given here does not replace any local rules, instructions or training in the establishment, or advice from the radiation protection advisers. It is important to follow the code of good laboratory practice in addition to the specific precautions relating to the radionuclide I-125 used.

Iodine-125 has a radioactive half-life  $T_{1/2}$  of 60 days and emits 35.5 keV gamma radiation, 27 – 32 keV x-rays and no beta radiation. Shielding is effectively done by lead, first half value layer is 0.02 mm lead, reduction to 10 % is made by 0.2 mm.

To reduce the radiation dose time spent handling radioactivity should be minimized (plan ahead), and distance from source of radiation should be maximized (doubling the distance from the source quarters the radiation dose).

Formation of aerosols, e. g. by improper opening and mixing of vials or pipetting of solutions which may cause minute droplets of radioactivity become airborne, is a hazard and should be avoided.

Solutions containing iodine should not be made acidic, because this might lead to the formation of volatile elemental iodine.

As some iodo-compounds can penetrate rubber gloves, it is advisable to wear two pairs, or polyethylene gloves over rubber.

For cleaning of contaminated areas or equipment, the Iodine-125 should be rendered chemically stable by using alkaline sodium thiosulphate solution together with paper or cellulose tissue.

### **General first aid procedures:**

Skin contact: Wash affected area thoroughly with water. Discard contaminated cloths and shoes.

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

Ingestion: If swallowed, wash out mouth thoroughly with water. Immediately see a physician.

Do not eat, drink or smoke in these areas.

Never pipette the materials with the mouth.

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

### **The handling of radioactive and potentially infectious material must comply with the following guidelines:**

The material should be stored and used in a special designated area.

Do not eat, drink or smoke in these areas.

Never pipette the materials with the mouth.

Avoid direct contact with these materials by wearing laboratory coats and disposable gloves.

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

Unused radioactive material and radioactive waste should be disposed according to the recommendations of the national regulatory authorities.

### **Warning statement**

Biotin concentrations of >125 ng/mL in R44 showed significant interference with the assay system and result in false high values. Therefore, samples from patients under high dose biotin therapy (>10 mg/day) cannot be used for Leptin measurement by this test.

## ASSAY PROCEDURE

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

When performing the assay, the Calibrators, Control and the samples should be pipette as fast as possible.

### Flow Chart of Assay Protocol

| #     | Tube           | A, F-L, N Samples | R   | S   | C   |
|-------|----------------|-------------------|-----|-----|-----|
| 1,2   | TC             | ---               | --- | --- | 100 |
| 3,4   | B <sub>0</sub> | A: 25             | 50  | 50  | 100 |
| 5-18  | Calibrators    | F-L: 25           | 50  | 50  | 100 |
| 19,20 | Control        | N: 25             | 50  | 50  | 100 |
| 21,22 | Sample 1       | 25                | 50  | 50  | 100 |
| 23,24 | Sample 2       | 25                | 50  | 50  | 100 |
| etc.  |                |                   |     |     |     |

(All volumes are given in µL)

- 1) Labelling of the assay tubes should be done in the following order:
  - 1, 2 total counts (TC),
  - 3, 4 zero calibrator (B<sub>0</sub>),
  - 5 - 18 duplicates of calibrators (F to L),
  - 19, 20 duplicates of control (N),
  - 21, 22 etc. duplicates of samples.
- 2) Add 25 µL of reagent A (assay buffer) to tubes 3 and 4.  
Add 25 µL of reagents F - L (calibrators) to tubes 5 - 18:
  - 5, 6 calibrator F
  - 7, 8 calibrator G, etc.
- 3) Add 25 µL of control (reagent N) to tubes 19 and 20.
- 4) Add 25 µL of the first sample to tubes 21 and 22, etc.
- 5) Add 50 µL reagent R (capture-antibody) beginning with tube 3.
- 6) Add 50 µL reagent S (spec. antibody) beginning with tube 3.
- 7) Add 100 µL reagent C (tracer) to all tubes.
- 8) Remove tubes 1 and 2 (total counts) or seal with a stopper.
- 9) Shake the tubes on a shaking device (350 rpm) overnight (at least 15 h) at room temperature.
- 10) Decant or aspirate the liquid (except tubes 1 and 2!) completely.  
Take care that the coating of the tubes remains intact.
- 11) Add 500 µL of assay buffer A to the tubes (except tubes 1 and 2!).
- 12) Decant or aspirate the liquid (see step 10).
- 13) Count the radioactivity of all tubes in a Gamma Counter for 1 to 3 min.

## CALCULATION OF RESULTS

### Establishing the Calibration Curve

| Calibrator | B <sub>0</sub> | F | G | H | I | J  | K  | L  |
|------------|----------------|---|---|---|---|----|----|----|
| ng/mL      | 0              | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 |

1. Calculate the average counts of each pair of tubes. This equals to the binding value B.
2. The mean of the zero calibrator (tubes 3 and 4) equals B<sub>0</sub>.
3. Calculate the percent bound (% B/B<sub>0</sub>) by dividing the B values by B<sub>0</sub>:  

$$\%B/B_0 = B/B_0 \times 100\%$$
4. Plot % B/B<sub>0</sub> versus the calibrator concentrations on a semi-logarithmic or logit-log paper respectively. For convenience, it is recommended to use computer assisted data reduction programs.

Exemplary version, do not use to perform assays

5. Calculate the 'percentage bound of the zero calibrator':  
Average of tubes 3, 4 ( $B_0$ ) divided by average of tubes 1, 2 (total counts) multiplied by 100%.  
It should be  $\%B_0/TC > 20\%$ .

**Evaluation of sample concentrations:**

Read the concentration value (abscissa) corresponding to the  $\%B/B_0$  of the sample as in the example given below:

|  |          |
|--|----------|
| average counts of zero calibrator ( $B_0$ ): | 8648 cpm |
| average counts of sample tube:               | 4283 cpm |

$$\begin{aligned}\%B/B_0 &= \text{sample counts} / B_0 \times 100\% \\ &= 4283 / 8648 \times 100\% \\ &= 0.495 \times 100\% = 49.5\%\end{aligned}$$

For a 49.5% value on the y-axis (ordinate) a value of 7.28 ng/mL on the x-axis (abscissa) may be obtained.

In case of dilution of the samples, multiplication of this value determined graphically or by the aid of a computer program with the dilution factor gives the leptin concentration of the sample.

**Concentration of the control:**

The control N should fit with the labelled concentration range. The measured Leptin concentration are only valid, if the measured value of the control is in the labelled concentration range. Otherwise process analysis is required and depending on the results the measured values are accepted or not.

**EXPECTED NORMAL VALUES**

Serum leptin levels are mainly determined by body fat mass with low levels in lean individuals and high levels in obese subjects. In addition, there is a clear gender difference with higher levels in females at a given percentage body fat. Further, leptin levels are influenced by pubertal development. Any attempt, therefore, to give ranges of expected leptin levels must account for these relationships.

Various methods for the estimation of body fat are available such as calculation of body mass index (weight (kg) divided by the square of height (m)) (BMI), bioelectric impedance assessment (BIA) or total body dual energy x-ray absorptiometry (DXA). Although the accuracy of BMI with respect to reflecting true fat mass is inferior to other more sophisticated methods such as BIA or DXA, BMI provides a number of advantages:

- 1) It is independent of the regression models applied.
- 2) It is easy to determine, only weight and height measurements are required.
- 3) It is retrospectively mostly available.
- 4) It is the most precise measure during short-term changes of fat mass, e.g. during fasting.

Therefore, the following expectation ranges of serum leptin levels were referred to BMI as the major confounding independent variable and were stratified according to gender and pubertal development (45; see figures 1-8 and tables 4 - 11). After the age of 20 years, no significant age dependence was observed. These gender and age adjusted expectation ranges may be used to compare a measured leptin level at a given BMI with normal subjects to detect pathologic deviations.

The best-fit regression lines for the various subgroups are exponential curves of the form leptin =  $a \cdot e^{(b \cdot \text{BMI})}$ .

The 5th and 95th percentiles are given by the following equations:

$$\text{leptin} = a \cdot e^{(b \cdot \text{BMI} - c)} \text{ and } \text{leptin} = a \cdot e^{(b \cdot \text{BMI} + c)} \text{ respectively.}$$



## Exemplary version, do not use to perform assays

In a semi-logarithmic plot (y-axis = log leptin), these curves give straight lines. The values for a, b and c are given in table 3 according to gender and pubertal stage and also for adults. Using these values, the expectation ranges of leptin levels can be easily extended to lower or higher BMI ranges if required.

Example:

The 50th percentile for boys at Tanner stages 3 and 4 is given by the following curve:

$$\text{leptin} = 0.0181 \cdot e^{(0.2067 \cdot \text{BMI})}$$

The 5th percentile is given by:  $\text{leptin} = 0.0181 \cdot e^{(0.2067 \cdot \text{BMI} - 1.1919)}$

and the 95th percentile is given by:  $\text{leptin} = 0.0181 \cdot e^{(0.2067 \cdot \text{BMI} + 1.1919)}$

In a semi-logarithmic plot, these lines are parallel with an equal distance to the 50th percentile.

### Calculation of standard deviation scores (SDS; Z-scores)

A convenient method to detect any deviation of a measured leptin level from the corresponding reference range is to calculate its standard deviation score by relating the leptin level at the patient's BMI to the average leptin value of the corresponding sex and age group and expressing its deviation by the x-fold standard deviation. This method may be considered as normalization to the normal reference cohort. Thus, the leptin values can be adjusted for BMI, gender and pubertal stage/age (i.e., the influence of gender, age and BMI are removed) and may be pooled for further analysis.

Accounting for the logarithmic distribution of leptin levels, the leptin SDS can be calculated by the following equation:

$$\text{leptin SDS} = (\ln(\text{leptin}) - \ln(a) - b \cdot \text{BMI}) / d$$

In this equation, ln represents the natural logarithm (referring to the basis e). The constants a, b and d are given in table 3 according to gender and pubertal stage/age.

Example:

A boy at Tanner stage 3, BMI = 25 kg/m<sup>2</sup>, measured leptin concentration = 5 ng/mL.

$$\begin{aligned} \text{leptin SDS} &= (\ln(5) - \ln(0.0181) - 0.2067 \cdot 25) / 0.6850 = \\ &= (1.6094 - (-4.0118) - 5.1675) / 0.6850 = 0.66 \end{aligned}$$

### Estimation of optimal dilution of samples

Because serum leptin levels vary widely over several orders of magnitude, depending mainly on the body fat mass, adequate dilution might be a prerequisite for precise measurement. Therefore, samples should be diluted such, that the leptin concentration is near this value in order to take maximum advantage of the precision of the kit. The reference ranges provide a useful tool for a good estimation of the expected leptin value according to BMI, gender and age.

Example:

Adult woman, BMI = 45 kg/m<sup>2</sup> (130 kgs, 1.70 m height). From the reference range for adult women, the average leptin level at a BMI of 45 kg/m<sup>2</sup> is approximately 224 ng/mL. The optimal dilution would be 1:30.

**Appendix / Anhang**

**Table 3:** Constants a, b, c and d for calculation of leptin reference ranges and leptin SDS based on BMI. Groups of normal healthy individuals were stratified according to gender and pubertal stage/age. TS= Tanner stage, n= number of subjects, a,b,c and d = constants as defined in the text.

**Tabelle 3:** Konstanten a, b, c und d für die Berechnung der Referenzbereiche und Leptin Standardabweichungen basierend auf dem BMI. Gruppen von normalen, gesunden Personen wurden nach Geschlecht und pubertärem Entwicklungsstadium/Alter getrennt. TS = Tanner-Stadium, n = Anzahl der Personen, a, b, c und d = Konstanten (siehe Text).

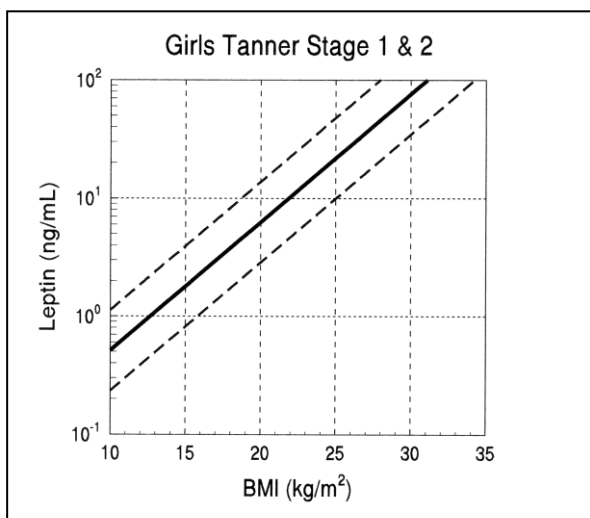
| <b>Gruppe</b>     | <b>n</b> | <b>a</b> | <b>b</b> | <b>c</b> | <b>d</b> | <b>Cohort</b>     |
|-------------------|----------|----------|----------|----------|----------|-------------------|
| <b>männlich</b>   |          |          |          |          |          | <b>Males:</b>     |
| <b>TS 1&amp;2</b> | 136      | 0,0146   | 0,2706   | 0,8821   | 0,5379   | <b>TS 1&amp;2</b> |
| <b>TS 3&amp;4</b> | 50       | 0,0181   | 0,2067   | 1,1919   | 0,6850   | <b>TS 3&amp;4</b> |
| <b>TS 5</b>       | 112      | 0,0316   | 0,1462   | 1,0821   | 0,6558   | <b>TS 5</b>       |
| <b>Erwachsene</b> | 380      | 0,0130   | 0,2200   | 1,1053   | 0,6740   | <b>Adults</b>     |
| <b>weiblich:</b>  |          |          |          |          |          | <b>Females</b>    |
| <b>TS 1&amp;2</b> | 136      | 0,0422   | 0,2499   | 0,7849   | 0,4786   | <b>TS 1&amp;2</b> |
| <b>TS 3&amp;4</b> | 43       | 0,0543   | 0,2357   | 0,5745   | 0,3379   | <b>TS 3&amp;4</b> |
| <b>TS 5</b>       | 157      | 0,2550   | 0,1508   | 0,7053   | 0,4301   | <b>TS 5</b>       |
| <b>Erwachsene</b> | 587      | 0,3042   | 0,1467   | 0,8548   | 0,5212   | <b>Adults</b>     |

**Table 4:** Girls Tanner stages 1 and 2  
**Tabelle 4:** Mädchen im Tanner-Stadium 1 und 2

| Percentile / Perzentile (µg/L) |      |      |      |       |       |
|--------------------------------|------|------|------|-------|-------|
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )       | 1    | 5    | 50   | 95    | 99    |
| 11                             | 0.22 | 0.30 | 0.66 | 1.45  | 1.99  |
| 12                             | 0.28 | 0.39 | 0.85 | 1.86  | 2.56  |
| 13                             | 0.36 | 0.50 | 1.09 | 2.38  | 3.29  |
| 14                             | 0.46 | 0.64 | 1.40 | 3.06  | 4.22  |
| 15                             | 0.60 | 0.82 | 1.79 | 3.93  | 5.42  |
| 16                             | 0.76 | 1.05 | 2.30 | 5.04  | 6.96  |
| 17                             | 0.98 | 1.35 | 2.95 | 6.47  | 8.93  |
| 18                             | 1.25 | 1.73 | 3.79 | 8.31  | 11.5  |
| 19                             | 1.61 | 2.22 | 4.87 | 10.7  | 14.7  |
| 20                             | 2.07 | 2.85 | 6.25 | 13.7  | 18.9  |
| 21                             | 2.65 | 3.66 | 8.03 | 17.6  | 24.3  |
| 22                             | 3.41 | 4.70 | 10.3 | 22.6  | 31.2  |
| 23                             | 4.37 | 6.03 | 13.2 | 29.0  | 40.0  |
| 24                             | 5.62 | 7.75 | 17.0 | 37.2  | 51.4  |
| 25                             | 7.21 | 9.95 | 21.8 | 47.8  | 65.9  |
| 26                             | 9.26 | 12.8 | 28.0 | 61.4  | 84.7  |
| 27                             | 11.9 | 16.4 | 35.9 | 78.8  | 109.0 |
| 28                             | 15.3 | 21.1 | 46.1 | 101.0 | 140.0 |
| 29                             | 19.6 | 27.0 | 59.2 | 130.0 |       |
| 30                             | 15.2 | 34.7 | 76.1 |       |       |
| 31                             | 32.3 | 44.6 | 97.7 |       |       |
| 32                             | 41.5 | 57.2 | 125. |       |       |
| 33                             | 53.2 | 73.4 |      |       |       |
| 34                             | 68.4 | 94.3 |      |       |       |
| 35                             | 87.8 | 121. |      |       |       |
| 36                             | 113  |      |      |       |       |
| 37                             | 145  |      |      |       |       |

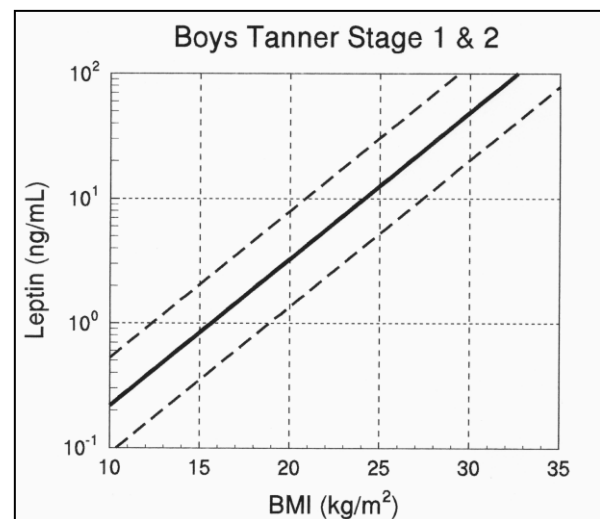
**Table 5:** Boys Tanner stages 1 and 2  
**Tabelle 5:** Jungen im Tanner-Stadium 1 und 2

| Percentile / Perzentile (µg/L) |       |       |       |       |       |
|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )       | 1     | 5     | 50    | 95    | 99    |
| 11                             | 0.08  | 0.12  | 0.29  | 0.69  | 0.99  |
| 12                             | 0.01  | 0.16  | 0.38  | 0.91  | 1.30  |
| 13                             | 0.14  | 0.20  | 0.49  | 1.19  | 1.71  |
| 14                             | 0.19  | 0.26  | 0.65  | 1.56  | 2.24  |
| 15                             | 0.24  | 0.35  | 0.85  | 2.04  | 2.93  |
| 16                             | 0.32  | 0.46  | 1.11  | 2.68  | 3.84  |
| 17                             | 0.41  | 0.60  | 1.45  | 3.51  | 5.04  |
| 18                             | 0.55  | 0.79  | 1.90  | 4.60  | 6.60  |
| 19                             | 0.72  | 1.03  | 2.50  | 6.03  | 8.66  |
| 20                             | 0.94  | 1.35  | 3.27  | 7.90  | 11.3  |
| 21                             | 1.24  | 1.77  | 4.29  | 10.4  | 14.9  |
| 22                             | 1.62  | 2.33  | 5.62  | 13.6  | 19.5  |
| 23                             | 2.12  | 3.05  | 7.37  | 17.8  | 25.5  |
| 24                             | 2.78  | 3.99  | 9.66  | 23.3  | 33.5  |
| 25                             | 3.65  | 5.24  | 12.7  | 30.6  | 43.9  |
| 26                             | 7.78  | 6.87  | 16.9  | 40.1  | 57.5  |
| 27                             | 6.27  | 9.0   | 21.7  | 52.5  | 75.4  |
| 28                             | 8.22  | 11.8  | 28.5  | 68.9  | 98.8  |
| 29                             | 10.7  | 15.5  | 37.4  | 90.3  | 129.0 |
| 30                             | 14.1  | 20.3  | 48.9  | 118.0 |       |
| 31                             | 18.5  | 26.6  | 64.2  |       |       |
| 32                             | 24.3  | 34.8  | 84.1  |       |       |
| 33                             | 31.8  | 45.6  | 110.0 |       |       |
| 34                             | 41.7  | 59.8  | 144.0 |       |       |
| 35                             | 54.6  | 78.4  |       |       |       |
| 36                             | 71.6  | 102.0 |       |       |       |
| 37                             | 93.9  | 134.0 |       |       |       |
| 38                             | 123.0 |       |       |       |       |



**Figure 1:** Reference ranges of human serum levels referring to BMI: Girls Tanner stage 1 & 2 (see text for details).

**Abb.1:** Referenzbereiche für humane Serumwerte bezogen auf den BMI: Mädchen im Tanner-Stadium 1 + 2 (s. Text).



**Figure 2:** Reference ranges of human serum levels referring to BMI: Boys Tanner stage 1 & 2 (see text for details).

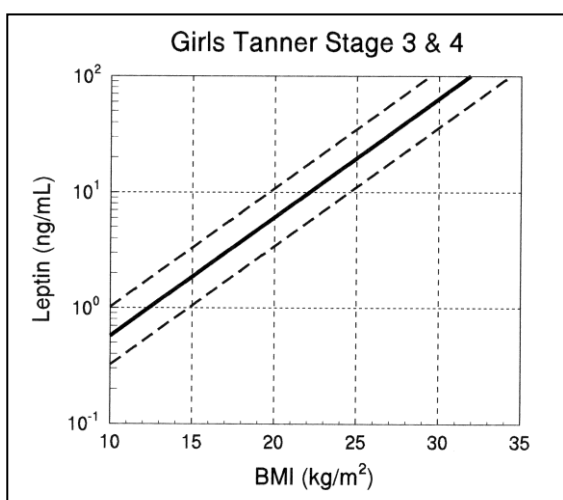
**Abb.2:** Referenzbereiche für humane Serumwerte bezogen auf den BMI: Jungen im Tanner-Stadium 1 + 2 (s. Text).

**Table 6:** Girls Tanner stages 3 and 4  
**Tabelle 6:** Mädchen im Tanner-Stadium 3 und 4

| Percentile / Perzentile (µg/L) |       |       |       |       |       |
|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )       | 1     | 5     | 50    | 95    | 99    |
| 11                             | 0.32  | 0.41  | 0.73  | 1.29  | 1.63  |
| 12                             | 0.41  | 0.52  | 0.92  | 1.63  | 2.06  |
| 13                             | 0.52  | 0.66  | 1.16  | 2.07  | 2.61  |
| 14                             | 0.65  | 0.83  | 1.47  | 2.61  | 3.31  |
| 15                             | 0.83  | 1.05  | 1.87  | 3.31  | 4.19  |
| 16                             | 1.05  | 1.33  | 2.36  | 4.19  | 5.30  |
| 17                             | 1.33  | 1.68  | 2.99  | 5.30  | 6.71  |
| 18                             | 1.68  | 2.13  | 3.78  | 6.71  | 8.49  |
| 19                             | 2.13  | 2.69  | 4.79  | 8.5   | 10.8  |
| 20                             | 2.69  | 3.41  | 6.06  | 10.7  | 13.6  |
| 21                             | 3.41  | 4.31  | 7.67  | 13.61 | 17.2  |
| 22                             | 4.32  | 5.46  | 9.71  | 17.2  | 21.8  |
| 23                             | 5.46  | 6.91  | 12.3  | 21.8  | 27.6  |
| 24                             | 6.91  | 8.75  | 15.6  | 27.6  | 34.9  |
| 25                             | 8.75  | 11.1  | 19.7  | 34.9  | 44.2  |
| 26                             | 11.1  | 14.0  | 24.9  | 44.2  | 56.0  |
| 27                             | 14.0  | 17.7  | 31.6  | 56.0  | 70.9  |
| 28                             | 17.8  | 22.5  | 39.9  | 70.9  | 89.7  |
| 29                             | 22.5  | 28.4  | 50.5  | 89.7  | 114.0 |
| 30                             | 28.4  | 36.0  | 63.9  | 114.0 | 144.0 |
| 31                             | 36.0  | 45.6  | 80.9  | 144.0 |       |
| 32                             | 45.6  | 57.7  | 80.2  | 144.0 |       |
| 33                             | 57.7  | 73.0  | 102.0 |       |       |
| 34                             | 73.0  | 92.4  | 130.0 |       |       |
| 35                             | 92.4  | 117.0 |       |       |       |
| 36                             | 117.0 | 148.0 |       |       |       |
| 37                             | 148.0 |       |       |       |       |

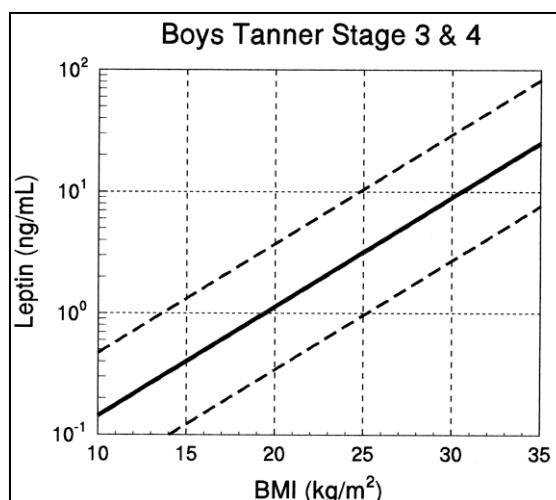
**Table 7:** Boys Tanner stage 3 & 4  
**Tabelle 7:** Jungen im Tanner-Stadium 3 und 4

| Percentile / Perzentile (µg/L) |      |      |      |       |       |
|--------------------------------|------|------|------|-------|-------|
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )       | 1    | 5    | 50   | 95    | 99    |
| 11                             | 0.03 | 0.05 | 0.18 | 0.58  | 0.94  |
| 12                             | 0.04 | 0.07 | 0.22 | 0.71  | 1.16  |
| 13                             | 0.49 | 0.08 | 0.27 | 0.88  | 1.43  |
| 14                             | 0.06 | 0.10 | 0.33 | 1.08  | 1.75  |
| 15                             | 0.07 | 0.12 | 0.40 | 1.32  | 2.16  |
| 16                             | 0.09 | 0.15 | 0.49 | 1.63  | 2.65  |
| 17                             | 0.11 | 0.18 | 0.61 | 2.00  | 3.26  |
| 18                             | 0.14 | 0.23 | 0.75 | 2.46  | 4.01  |
| 19                             | 0.17 | 0.28 | 0.92 | 3.03  | 4.93  |
| 20                             | 0.21 | 0.34 | 1.13 | 3.72  | 6.06  |
| 21                             | 0.26 | 0.42 | 1.39 | 4.58  | 7.46  |
| 22                             | 0.32 | 0.52 | 1.71 | 5.63  | 9.17  |
| 23                             | 0.39 | 0.64 | 2.10 | 6.92  | 11.3  |
| 24                             | 0.48 | 0.78 | 2.58 | 8.51  | 13.9  |
| 25                             | 0.59 | 0.96 | 3.18 | 10.5  | 17.0  |
| 26                             | 0.73 | 1.19 | 3.91 | 12.9  | 21.0  |
| 27                             | 0.89 | 1.46 | 4.80 | 15.8  | 25.8  |
| 28                             | 1.10 | 1.79 | 5.90 | 19.4  | 31.7  |
| 29                             | 1.35 | 2.20 | 7.26 | 23.9  | 39.0  |
| 30                             | 1.66 | 2.71 | 8.93 | 29.4  | 48.0  |
| 31                             | 2.05 | 3.33 | 11.0 | 36.2  | 58.9  |
| 32                             | 2.51 | 4.09 | 13.5 | 44.5  | 72.4  |
| 33                             | 3.09 | 5.04 | 16.6 | 54.7  | 89.1  |
| 34                             | 3.80 | 6.20 | 20.4 | 67.2  | 109.0 |
| 35                             | 4.68 | 7.62 | 25.1 | 82.6  | 134.0 |
| 36                             | 5.75 | 9.37 | 30.9 | 101.0 |       |
| 37                             | 7.07 | 11.5 | 37.9 | 124.0 |       |
| 38                             | 8.7  | 14.2 | 46.7 |       |       |
| 39                             | 10.7 | 17.4 | 57.4 |       |       |
| 40                             | 13.1 | 21.4 | 70.5 |       |       |



**Figure 3:** Reference ranges of human serum levels referring to BMI: Girls Tanner stage 3 & 4 (see text for details).

**Abb.3:** Referenzbereiche für humane Serumwerte bezogen auf den BMI: Mädchen im Tanner-Stadium 3 + 4 (s. Text).



**Figure 4:** Reference ranges of human serum levels referring to BMI: Boys Tanner stage 3 & 4 (see text for details).

**Abb.4:** Referenzbereiche für humane Serumwerte bezogen auf den BMI: Jungen im Tanner-Stadium 3 + 4 (s. Text).

**Table 8 :** Girls Tanner stage 5

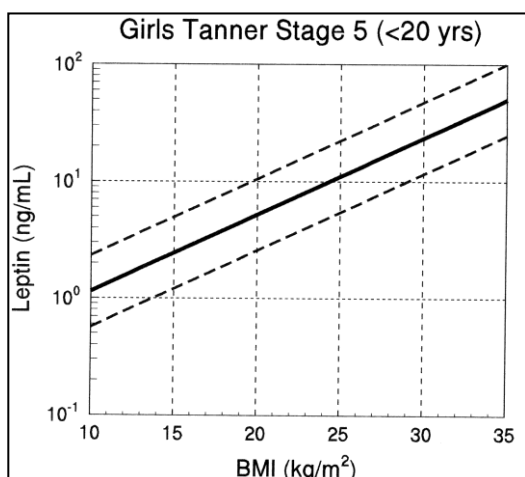
**Tabelle 8 :** Mädchen im Tanner-Stadium 5

| Percentile / Perzentile (µg/L) |      |      |       |       |       |
|--------------------------------|------|------|-------|-------|-------|
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )       | 1    | 5    | 50    | 95    | 99    |
| 11                             | 0.50 | 0.66 | 1.34  | 2.71  | 3.62  |
| 12                             | 0.58 | 0.77 | 1.56  | 3.15  | 4.21  |
| 13                             | 0.67 | 0.89 | 1.81  | 3.67  | 4.89  |
| 14                             | 0.78 | 1.04 | 2.11  | 4.26  | 5.69  |
| 15                             | 0.91 | 1.21 | 2.45  | 4.96  | 6.62  |
| 16                             | 1.05 | 1.41 | 2.85  | 5.76  | 7.70  |
| 17                             | 1.22 | 1.64 | 3.31  | 6.70  | 8.95  |
| 18                             | 1.42 | 1.90 | 3.85  | 7.79  | 10.4  |
| 19                             | 1.66 | 2.21 | 4.48  | 9.06  | 12.1  |
| 20                             | 1.93 | 2.57 | 5.20  | 10.5  | 14.1  |
| 21                             | 2.24 | 2.99 | 6.05  | 12.3  | 16.4  |
| 22                             | 2.60 | 3.48 | 7.03  | 14.2  | 19.0  |
| 23                             | 3.03 | 4.04 | 8.18  | 16.6  | 22.1  |
| 24                             | 3.52 | 4.70 | 9.51  | 19.3  | 25.7  |
| 25                             | 4.09 | 5.46 | 11.0  | 22.4  | 29.9  |
| 26                             | 4.76 | 6.35 | 12.9  | 26.0  | 34.8  |
| 27                             | 5.53 | 7.39 | 15.0  | 30.3  | 40.4  |
| 28                             | 6.43 | 8.59 | 17.39 | 35.2  | 47.0  |
| 29                             | 7.48 | 9.99 | 20.2  | 40.9  | 54.7  |
| 30                             | 8.70 | 11.6 | 23.5  | 47.6  | 63.5  |
| 31                             | 10.1 | 13.5 | 27.3  | 55.3  | 73.9  |
| 32                             | 11.8 | 15.7 | 31.8  | 64.4  | 85.9  |
| 33                             | 13.7 | 18.3 | 37.0  | 74.9  | 99.9  |
| 34                             | 15.9 | 21.2 | 43.0  | 87.0  | 116.0 |
| 35                             | 18.5 | 24.7 | 50.0  | 101.0 | 135.0 |
| 36                             | 21.5 | 28.7 | 58.1  | 118.0 |       |
| 37                             | 25.0 | 33.4 | 67.6  | 137.0 |       |
| 38                             | 29.1 | 38.8 | 78.6  |       |       |
| 39                             | 33.8 | 45.1 | 91.4  |       |       |
| 40                             | 39.4 | 52.5 | 106.0 |       |       |

**Table 9 :** Boys Tanner stage 5

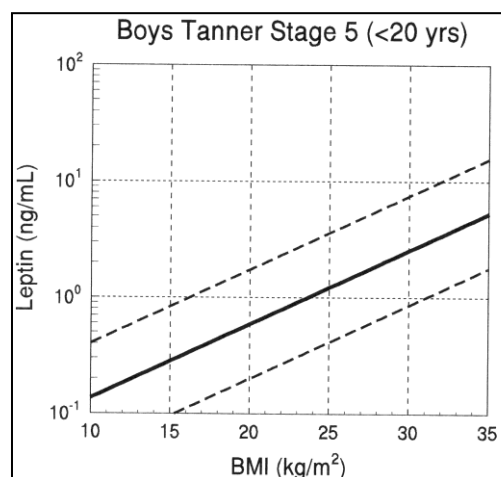
**Tabelle 9:** Jungen im Tanner-Stadium 5

| Percentile / Perzentile (µg/L) |      |      |      |      |      |
|--------------------------------|------|------|------|------|------|
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )       | 1    | 5    | 50   | 95   | 99   |
| 11                             | 0.03 | 0.05 | 0.16 | 0.47 | 0.73 |
| 12                             | 0.04 | 0.06 | 0.18 | 0.54 | 0.84 |
| 13                             | 0.05 | 0.07 | 0.21 | 0.62 | 0.97 |
| 14                             | 0.05 | 0.08 | 0.24 | 0.72 | 1.12 |
| 15                             | 0.06 | 0.10 | 0.28 | 0.84 | 1.30 |
| 16                             | 0.07 | 0.11 | 0.33 | 0.97 | 1.51 |
| 17                             | 0.08 | 0.13 | 0.38 | 1.12 | 1.74 |
| 18                             | 0.1  | 0.15 | 0.44 | 1.3  | 2.02 |
| 19                             | 0.11 | 0.17 | 0.51 | 1.50 | 2.34 |
| 20                             | 0.13 | 0.2  | 0.59 | 1.74 | 2.7  |
| 21                             | 0.15 | 0.23 | 0.68 | 2.01 | 3.13 |
| 22                             | 0.17 | 0.27 | 0.79 | 2.33 | 3.62 |
| 23                             | 0.20 | 0.31 | 0.91 | 2.69 | 4.19 |
| 24                             | 0.23 | 0.36 | 1.05 | 3.12 | 4.85 |
| 25                             | 0.27 | 0.41 | 1.22 | 3.61 | 5.62 |
| 26                             | 0.31 | 0.48 | 1.41 | 4.17 | 6.5  |
| 27                             | 0.36 | 0.55 | 1.63 | 4.83 | 7.52 |
| 28                             | 0.41 | 0.64 | 1.89 | 5.59 | 8.71 |
| 29                             | 0.48 | 0.74 | 2.19 | 6.47 | 10.1 |
| 30                             | 0.55 | 0.86 | 2.54 | 7.49 | 11.7 |
| 31                             | 0.64 | 1.00 | 2.94 | 8.67 | 13.5 |
| 32                             | 0.74 | 1.15 | 3.4  | 10.0 | 15.6 |
| 33                             | 0.86 | 1.33 | 3.94 | 11.6 | 18.1 |
| 34                             | 0.99 | 1.54 | 4.55 | 13.4 | 20.9 |
| 35                             | 1.15 | 1.79 | 5.27 | 15.6 | 24.2 |
| 36                             | 1.33 | 2.07 | 6.10 | 18.0 | 28.1 |
| 37                             | 1.54 | 2.39 | 7.06 | 20.8 | 32.5 |
| 38                             | 1.78 | 2.77 | 8.17 | 24.1 | 37.6 |
| 39                             | 2.06 | 3.21 | 9.46 | 27.9 | 43.5 |
| 40                             | 2.38 | 3.71 | 10.9 | 32.3 | 50.3 |



**Figure 5:** Reference ranges of human serum levels referring to BMI: Girls Tanner stage 5 (see text for details)

**Abb.5:** Referenzbereiche für humane Serumwerte bezogen auf den BMI: Mädchen im Tanner-Stadium 5 (s. Text).



**Figure 6:** Reference ranges of human serum levels referring to BMI: Boys Tanner stage 5 (see text for details).

**Abb.6:** Referenzbereiche für humane Serumwerte bezogen auf den BMI: Jungen im Tanner-Stadium 5 (s. Text)

**Table 10:** Adult women

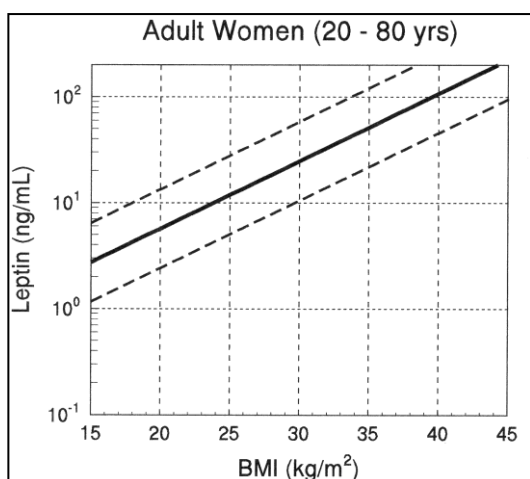
**Tabelle 10:** Erwachsene Frauen

| BMI (kg/m <sup>2</sup> ) | Percentile / Perzentile (µg/L) |      |       |       |       |
|--------------------------|--------------------------------|------|-------|-------|-------|
|                          | 1                              | 5    | 50    | 95    | 99    |
| 11                       | 0.46                           | 0.65 | 1.53  | 3.59  | 5.10  |
| 12                       | 0.53                           | 0.75 | 1.77  | 4.16  | 5.90  |
| 13                       | 0.61                           | 0.87 | 2.05  | 4.82  | 6.83  |
| 14                       | 0.71                           | 1.01 | 2.37  | 5.58  | 7.91  |
| 15                       | 7.82                           | 1.17 | 2.75  | 6.46  | 9.17  |
| 16                       | 0.95                           | 1.35 | 3.18  | 7.48  | 10.61 |
| 17                       | 1.10                           | 1.57 | 3.68  | 8.66  | 12.3  |
| 18                       | 1.28                           | 1.81 | 4.27  | 10.0  | 14.2  |
| 19                       | 1.48                           | 2.10 | 4.94  | 11.6  | 16.5  |
| 20                       | 1.71                           | 2.43 | 5.72  | 13.4  | 19.1  |
| 21                       | 1.99                           | 2.82 | 6.62  | 15.6  | 22.1  |
| 22                       | 2.30                           | 3.26 | 7.67  | 18.0  | 25.6  |
| 23                       | 2.66                           | 3.78 | 8.88  | 20.9  | 29.3  |
| 24                       | 3.08                           | 4.38 | 10.3  | 24.2  | 34.3  |
| 25                       | 3.57                           | 5.07 | 11.9  | 28.0  | 39.7  |
| 26                       | 4.13                           | 5.87 | 13.8  | 32.4  | 46.0  |
| 27                       | 4.79                           | 6.79 | 16.0  | 37.5  | 53.3  |
| 28                       | 5.54                           | 7.87 | 18.5  | 43.5  | 61.7  |
| 29                       | 6.42                           | 9.11 | 21.4  | 50.4  | 71.5  |
| 30                       | 7.43                           | 10.6 | 24.8  | 58.3  | 82.8  |
| 31                       | 8.61                           | 12.2 | 28.7  | 67.5  | 95.8  |
| 32                       | 9.97                           | 14.1 | 33.3  | 78.2  | 111.0 |
| 33                       | 11.5                           | 16.4 | 38.5  | 90.5  | 129.0 |
| 34                       | 13.4                           | 19.0 | 44.6  | 105.0 | 149.0 |
| 35                       | 15.5                           | 22.0 | 51.6  | 121.0 |       |
| 36                       | 17.9                           | 25.4 | 59.8  | 141.0 |       |
| 37                       | 20.8                           | 29.5 | 69.3  |       |       |
| 38                       | 24.0                           | 34.1 | 80.2  |       |       |
| 39                       | 27.8                           | 39.5 | 92.9  |       |       |
| 40                       | 32.2                           | 45.7 | 108.0 |       |       |

**Table 11:** Adult men

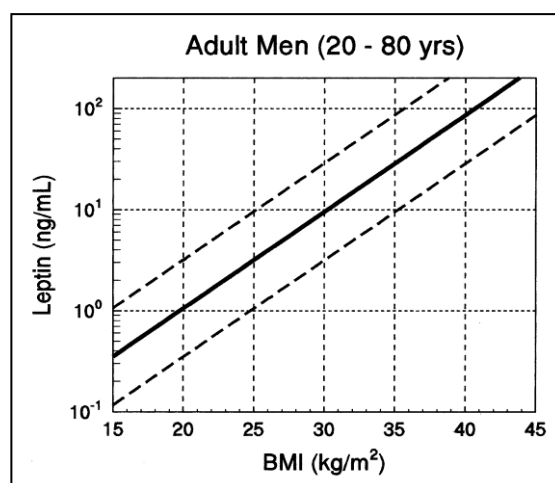
**Tabelle 11:** Männer

| BMI (kg/m <sup>2</sup> ) | Percentile / Perzentile (µg/L) |      |      |       |       |
|--------------------------|--------------------------------|------|------|-------|-------|
|                          | 1                              | 5    | 50   | 95    | 99    |
| 11                       | 0.03                           | 0.05 | 0.15 | 0.44  | 0.69  |
| 12                       | 0.04                           | 0.06 | 0.18 | 0.55  | 0.87  |
| 13                       | 0.05                           | 0.08 | 0.23 | 0.69  | 1.08  |
| 14                       | 0.06                           | 0.09 | 0.28 | 0.85  | 1.34  |
| 15                       | 0.07                           | 0.12 | 0.35 | 1.06  | 1.67  |
| 16                       | 0.09                           | 0.15 | 0.44 | 1.33  | 2.09  |
| 17                       | 0.12                           | 0.18 | 0.55 | 1.65  | 2.60  |
| 18                       | 0.14                           | 0.23 | 0.68 | 2.06  | 3.24  |
| 19                       | 0.18                           | 0.28 | 0.85 | 2.57  | 4.04  |
| 20                       | 0.22                           | 0.35 | 1.06 | 3.20  | 5.03  |
| 21                       | 0.23                           | 0.44 | 1.32 | 3.98  | 6.27  |
| 22                       | 0.35                           | 0.54 | 1.64 | 4.97  | 7.81  |
| 23                       | 0.43                           | 0.78 | 2.05 | 6.19  | 9.73  |
| 24                       | 0.54                           | 0.85 | 2.55 | 7.71  | 12.1  |
| 25                       | 0.67                           | 1.05 | 3.18 | 9.61  | 15.1  |
| 26                       | 0.83                           | 1.31 | 3.96 | 12.0  | 18.8  |
| 27                       | 1.04                           | 1.64 | 4.94 | 14.9  | 23.5  |
| 28                       | 1.30                           | 2.04 | 6.15 | 18.6  | 29.2  |
| 29                       | 1.61                           | 2.54 | 7.67 | 23.2  | 36.4  |
| 30                       | 2.01                           | 3.16 | 9.56 | 28.9  | 45.4  |
| 31                       | 2.51                           | 3.94 | 11.9 | 36.0  | 56.6  |
| 32                       | 3.12                           | 4.91 | 14.8 | 44.9  | 70.5  |
| 33                       | 3.89                           | 6.12 | 18.5 | 55.8  | 87.8  |
| 34                       | 4.85                           | 7.63 | 23.0 | 69.6  | 109.0 |
| 35                       | 6.04                           | 9.51 | 28.7 | 86.7  | 136.0 |
| 36                       | 7.53                           | 11.8 | 35.8 | 108.0 |       |
| 37                       | 9.38                           | 14.8 | 44.6 | 135.0 |       |
| 38                       | 11.7                           | 18.4 | 55.5 |       |       |
| 39                       | 14.6                           | 22.9 | 69.2 |       |       |
| 40                       | 18.2                           | 28.6 | 86.2 |       |       |



**Figure 7:** Reference ranges of human serum levels referring to BMI: Adult women (see text for details)

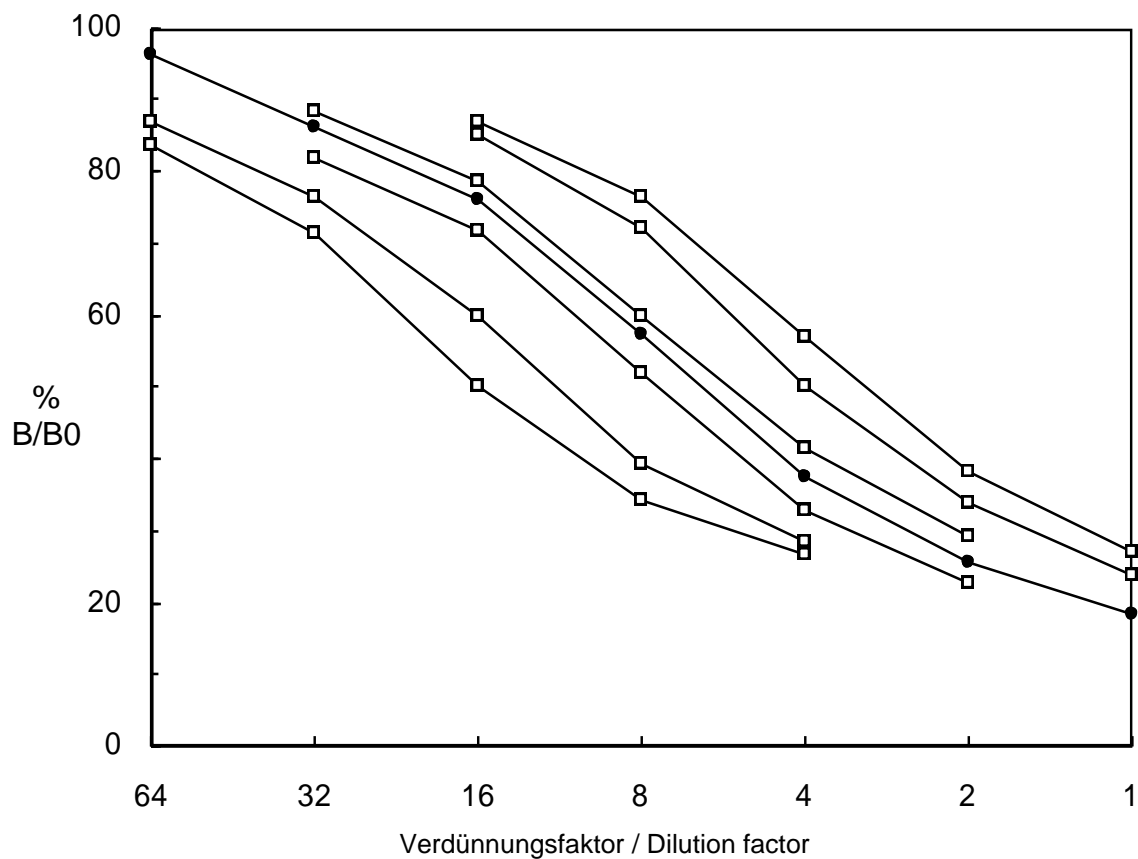
**Abb. 7:** Referenzbereiche für humane Serumwerte bezogen auf den BMI: adulte Frauen (s. Text).



**Figure 8:** Reference ranges of human serum levels referring to BMI: Adult men (see text for details).

**Abb.8:** Referenzbereiche für humane Serumwerte bezogen auf den BMI: Männer (s. Text).





**Abb. 9:** Verdünnungsreihe des Leptin-Kalibrators (schwarze Kreise) und verschiedene Serumproben mit unterschiedlichen Leptin-Konzentrationen. Der Leptin-Gehalt des unverdünnten Kalibrators beträgt 16 ng/mL. Es sind jeweils die Mittelwerte der Doppelmessungen aufgeführt.

**Figure 9:** Serial dilution of leptin calibrator (filled circle) and different sera with varying concentrations of leptin. The leptin level of the undiluted calibrator was 16 ng/mL. Means of duplicate measurements are shown.

## LITREATURE / LITERATUR

### Literature

1. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 372:425-432.
2. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, et al. 1995 Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 269:543-546.
3. MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. 1995 Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:9034-9037.
4. Rentsch J, Chiesi M. 1996 Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. *FEBS Lett*. 379:55-59.
5. Wabitsch M, Jensen PB, Blum WF, et al. 1996 Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes*. 45:1435-1438.
6. Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, et al. 1995 The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature*. 377:530-532.
7. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. 1995 Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 269:546-549.
8. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, et al. 1995 Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. 269:540-543.
9. Levin N, Nelson C, Gurney A, Vandlen R, de-Sauvage F. 1996 Decreased food intake does not completely account for adiposity reduction after ob protein infusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:1726-1730.
10. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, et al. 1995 Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 83:1263-1271.
11. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, et al. 1996 Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*. 84:491-495.
12. Lee GH, Proenca R, Montez JM, et al. 1996 Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*. 379:632-635.
13. Lynn RB, Cao GY, Considine RV, Hyde TM, Caro JF. 1996 Autoradiographic localization of leptin binding in the choroid plexus of ob/ob and db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 219:884-889.
14. Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Hyde TM, Caro JF. 1996 The hypothalamic leptin receptor in humans: identification of incidental sequence polymorphisms and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations. *Diabetes*. 45:992-994.
15. Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, et al. 1996 Evidence of free and bound leptin in human circulation. *J Clin Invest*. 98:1277-1282.
16. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, et al. 1996 Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*. 382:250-252.
17. Chehab FF, Lim ME, Lu R. 1996 Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet*. 12:318-320.
18. Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, et al. 1996 Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes*. 45:531-535.
19. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. 1996 Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest*. 98:1101-1106.
20. Campfield LA, Smith FJ, Burn P. 1996 The OB protein (leptin) pathway - a link between adipose tissue mass and central neural networks. *Horm Metab Res*. 28:619-632.
21. Rohner-Jeanrenaud F, Cusin I, Sainsbury A, Zakrzewska KE, Jeanrenaud B. 1996 The loop system between neuropeptide Y and leptin in normal and obese rodents. *Horm Metab Res*. 28:642-648.
22. Chan YY, Steiner RA, Clifton DK. 1996 Regulation of hypothalamic neuropeptide-Y neurons by growth hormone in the rat. *Endocrinol*. 137:1319-1325.
23. Pierroz DD, Catzeflis C, Aebi AC, Rivier JE, Aubert ML. 1996 Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle inhibits both the pituitary-testicular axis and growth hormone and insulin-like growth factor I secretion in intact adult male rats. *Endocrinol*. 137:3-12.
24. Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS. 1995 Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med*. 1:1311-1314.
25. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, et al. 1995 Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*. 1:1155-1161.
26. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, et al. 1996 Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 334:292-295.
27. Kolaczynski JW, Considine RV, Ohannesian J, et al. 1996 Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: A link with keto-genesis but not ketones themselves. *Diabetes*. 45:1511-1515.
28. Harris RB, Ramsay TG, Smith SR, Bruch RC. 1996 Early and late stimulation of ob mRNA expression in meal-fed and overfed rats. *J Clin Invest*. 97:2020-2026.
29. Kolaczynski JW, Ohannesian J, Considine RV, Marco C, Caro JF. 1996 Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 91:4162-4165.

Exemplary version, do not use to perform assays

30. Saladin R, De-Vos P, Guerre-Millo M, et al. 1995 Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature*. 377:527-529.
31. Cusin I, Sainsbury A, Doyle P, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. 1995 The ob gene and insulin. A relationship leading to clues to the understanding of obesity. *Diabetes*. 44:1467-1470.
32. Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV, et al. 1996 Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: studies in vivo and in vitro. *Diabetes*. 45:699-701.
33. Malström R, Taskinen M-R, Karonen S-L, Yki-Järvinen H. 1996 Insulin increases plasma leptin concentrations in normal subjects and patients with NIDDM. *Diabetologia*. 39:993-996.
34. De-Vos P, Saladin R, Auwerx J, Staels B. 1995 Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *J Biol Chem*. 270:15958-15961.
35. Slieker LJ, Sloop KW, Surface PL, et al. 1996 Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem*. 271:5301-5304.
36. Miell JP, Englaro P, Blum WF. 1996 Dexamethasone induces an acute and sustained rise in circulating leptin levels in normal human subjects. *Horm Metab Res*. 28:704-707.
37. Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, et al. 1996 Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest*. 97:1344-1347.
38. Havel PJ, Kasim-Karakas S, Dubuc GR, Mueller W, Phinney SD. 1996 Gender difference in plasma leptin concentrations. *Nature Med*. 2:949-950.
39. Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J, et al. 1996 Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab*. 81:3424-3427.
40. Hassink SG, Sheslow DV, de Lancey E, Opentanova I, Considine RV, Caro JF 1996 Serum leptin in children with obesity: relationship to gender and development. *Pediatrics*. 98:201-203.
41. Scholz GH, Englaro P, Thiele I, et al. 1996 Dissociation of serum leptin concentration and body fat content during long term dietary intervention in obese individuals. *Horm Metab Res*. 28:718-723.
42. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, et al. 1996 Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet*. 348:159-161.
43. Robinson CJ, Gaines-Das R, Woollacott D, et al. 2001 The first international standard for human leptin and the first international standard for mouse leptin: comparison of candidate preparations by in vitro bioassays and immunoassays. *J Molecular Endocrinol*. 27: 69-76.
44. Adresse NIBSC: Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Great Britain.
45. Blum WF, Juul A; Reference ranges of serum leptin, s.318-326. In: *Leptin -the voice of adipose tissue*, Blum WF et al, eds., Johann Ambrosius Verlag, Heidelberg, 1997.
46. Holtkamp K, Blum WF, et al., 2006, Elevated Physical Activity and Low Leptin Levels Co-Occur in Patients with Anorexia Nervosa, *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 88(11) 5169-5174
47. Guebre-Egziabher, Bernhard J., et al. 2005, Adiponectin in chronic kidney disease is related more to metabolic disturbances than to decline in renal function, *Nephrol Dial Transplant* 20: 129-134

## KURZANLEITUNG – Mediagnost LEPTIN RIA-CT R44

| Reagenzpräparation:                                      | Rekonstitution:          |
|--|--------------------------|
| Fang-Antikörper (R)                                      | in 7 mL Testpuffer (A)   |
| Spezifischer Antikörper (S)                              | in 7 mL Testpuffer (A)   |
| Tracer (C)   | in 13 mL Testpuffer (A)  |
| Kontrolle (N)  | in 750 µL Testpuffer (A) |
| Plasma/Serum Proben können unverdünnt eingesetzt werden. |                          |

### Vorschlag zur Testdurchführung in Doppelbestimmung:

| Zugabe von Reagenz [µL] |                      |   |                          |                                 |             |
|-------------------------|----------------------|---|--------------------------|---------------------------------|-------------|
| Nr. der Röhrrchen       | Inhalt der Röhrrchen | A Testpuffer<br>F-L Kalibratoren<br>N Kontrolle<br>Proben | R<br>Fang-<br>Antikörper | S<br>Spezifischer<br>Antikörper | C<br>Tracer |
| 1,2                     | TC                   | –   | –                        | –                               | 100         |
| 3,4                     | B <sub>0</sub>       | A: 25   | 50                       | 50                              | 100         |
| 5-18                    | Kalibratoren         | F-L: 25   | 50                       | 50                              | 100         |
| 19,20                   | Kontrolle            | N: 25   | 50                       | 50                              | 100         |
| 21,22                   | Probe 1              | 25  | 50                       | 50                              | 100         |
| 23,24 (etc)             | Probe 2 (etc)        | 25  | 50                       | 50                              | 100         |

**Nr.:1,2 bis zum Zählen der Aktivität beiseite stellen**

**Inkubation**, über Nacht mind. **15 Stunden**, bei **RT, 350 rpm**

|  |
|--|
| Flüssigkeit vollständig dekantieren oder absaugen, ohne die Beschichtung der Röhrrchen dabei zu beschädigen. |
| Waschen durch Zugabe von je <b>500 µL Testpuffer A</b>   |
| Flüssigkeit vollständig absaugen (s.o.)  |
| <b>Zählen der Aktivität</b> aller Röhrrchen mit einem Gammazähler  |

**SUMMARY – Mediagnost LEPTIN RIA-CT R44**

|  |                                   |
|--|-----------------------------------|
| <b>Reagent Preparation:</b>                        | <b>Reconstitution:</b>            |
| <b>Capture Antibody (R)</b>                        | in <b>7 mL Assay Buffer (A)</b>   |
| <b>Specific Antibody (S)</b>                       | in <b>7 mL Assay Buffer (A)</b>   |
| <b>Tracer (C)</b>                                  | in <b>13 mL Assay Buffer (A)</b>  |
| <b>Control (N)</b>                                 | in <b>750 µL Assay Buffer (A)</b> |
| <b>Plasma/Serum Samples</b> can be used undiluted. |                                   |

**Proposed Assay Procedure for Double Determination**

| <b>Addition of Reagent [µL]</b> |                          |   |                                   |                                    |                     |
|---------------------------------|--------------------------|---|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------|
| <b>Nr. of Tubes</b>             | <b>Contents of Tubes</b> | <b>A Assay Buffer<br/>F-L Calibrators<br/>N Control<br/>Samples</b> | <b>R<br/>Capture<br/>Antibody</b> | <b>S<br/>Specific<br/>Antibody</b> | <b>C<br/>Tracer</b> |
| <b>1,2</b>                      | TC                       | –   | –                                 | –                                  | 100                 |
| <b>3,4</b>                      | B <sub>0</sub>           | <b>A:</b> 25  | 50                                | 50                                 | 100                 |
| <b>5-18</b>                     | Calibrators              | <b>F-L:</b> 25  | 50                                | 50                                 | 100                 |
| <b>19,20</b>                    | Control                  | <b>N:</b> 25  | 50                                | 50                                 | 100                 |
| <b>21,22</b>                    | Sample 1                 | 25  | 50                                | 50                                 | 100                 |
| <b>23,24 (etc)</b>              | Sample 2 (etc)           | 25  | 50                                | 50                                 | 100                 |

**Tubes Nr.:1,2 remove until counting the activity**

**Incubation, overnight, at least. 15 hours at RT, 350 rpm**

Decant or aspirate the liquid completely. Take care that the coating of the tubes remains intact.

Add **500 µL** of reagent **A (Assay Buffer)** to the tubes.

Aspirate the liquid completely (see above).

Count the radioactivity of **all** tubes.

Exemplary version do not use to perform assays




**REF R44**  **International Test Description**

International Test Description

|              |                        |  |
|--------------|------------------------|--|
| <b>F - L</b> |                        |  |
| <b>N</b>     | <b>Rec in</b> 750 µL A |  |
| <b>R</b>     | <b>Rec in</b> 7 mL A   |  |
| <b>S</b>     | <b>Rec in</b> 7 mL A   |  |
| <b>C</b>     | <b>Rec in</b> 13 mL A  |  |

|                    |       |
|--------------------|-------|
| <b>SPE</b>         | 25 µL |
| <b>°C</b> 20-25 °C |       |

| T       |                      |       | A     | F-L   | R     | S     | C      |
|---------|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 1 / 2   | <b>C = TC</b>        | -     | -     | -     | -     | -     | 100 µL |
| 3 / 4   | <b>B<sub>0</sub></b> | -     | 25 µL | -     | 50 µL | 50 µL | 100 µL |
| 5 / 6   | <b>F (1 ng/mL)</b>   | -     | -     | 25 µL | 50 µL | 50 µL | 100 µL |
| 7 / 8   | <b>G (2 ng/mL)</b>   | -     | -     | 25 µL | 50 µL | 50 µL | 100 µL |
| 9 / 10  | <b>H (4 ng/mL)</b>   | -     | -     | 25 µL | 50 µL | 50 µL | 100 µL |
| 11 / 12 | <b>I (8 ng/mL)</b>   | -     | -     | 25 µL | 50 µL | 50 µL | 100 µL |
| 13 / 14 | <b>J (16 ng/mL)</b>  | -     | -     | 25 µL | 50 µL | 50 µL | 100 µL |
| 15 / 16 | <b>K (32 ng/mL)</b>  | -     | -     | 25 µL | 50 µL | 50 µL | 100 µL |
| 17 / 18 | <b>L (64 ng/mL)</b>  | -     | -     | 25 µL | 50 µL | 50 µL | 100 µL |
| 19 / 20 | <b>N</b>             | 25 µL | -     | -     | 50 µL | 50 µL | 100 µL |
| 21 ...  | <b>SPE</b>           | 25 µL | -     | -     | 50 µL | 50 µL | 100 µL |

 >15 h  20-25  350 rpm

|  |          |
|--|----------|
| <b>ASP</b> <b>ALL</b> <b>NOT</b> <b>TC</b> |          |
| 500 µL                                     | <b>A</b> |
| <b>ASP</b>                                 |          |
| <b>MEASURE</b>                             |          |