

Leptin Sensitiv ELISA

REF E077

IVD

Gebrauchsanweisung Deutsch



E077_IFU_IVD_DE

Freigabe: 29.03.2023

Revision: 001/03.2023

Für In-vitro Diagnostik. IVD zur professionellen Anwendung.

Vor Gebrauch bitte die Gebrauchsanleitung durchlesen.

Leptin Sensitiv ELISA E077	96 Bestimmungen
CE	DE/CA40/00809/21/1
Testprinzip	Enzyme-linked Immunoassay
Dauer (Inkubationszeit)	1,75 h
Antikörper	Monoklonale Antikörper, gebrauchsfertig
Puffer	Gebrauchsfertig und 20fach Konzentrat
Kalibratoren	5 Einzelkalibratoren: 0,05 - 5 µg/L, rekombinantes humanes Leptin
Referenzmaterial	internationaler Standard WHO/NIBSC 97/594 rekombinantes Leptin (15, 16)
Assay-Bereich	0,01 – 50 µg/L
Kontrolle	2 Kontrollen, gefriergetrocknet
Proben	humanes Serum / Plasma Präzise Messungen auch bei schlanken Personen, z.B. anorektischen oder kachektischen Patienten, Heranwachsenden und Kleinkindern.
Erforderliches Probenvolumen	25 µL
Probenverdünnung	1:10
Analytische Sensitivität	ø 0,01 µg/L
Intra- / Interassay Varianz	ø < 10 %
Referenzwerte	Blum WF, Juul A; Reference ranges of serum leptin, In: Leptin- the voice of adipose tissue, Blum WF et al. eds. Johann Ambrosius Verlag, Heidelberg, 1997

Änderungen gegenüber der Vorgängerversion:

Revision	Beschreibung
001	Umstellung auf elektronische Gebrauchsanleitung, redaktionelle Änderungen



Mediagnost GmbH
 Aspenhaustrasse 25
 72770 Reutlingen
 Germany
 ☎ +49 7121 514840
 ✉ contact@mediagnost.de
 www.mediagnost.de

Inhaltsverzeichnis

1	Zweckbestimmung.....	5
2	Einführung	5
3	Testprinzip.....	5
4	Materialien	6
5	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	7
6	Proben.....	8
7	Technische Hinweise.....	9
8	Stabilität und Lagerung.....	10
9	Testdurchführung – Ablaufschema.....	11
10	Qualitätskontrolle.....	12
11	Auswertung	12
12	Referenzwerte	14
13	Assayeigenschaften und Validierung.....	21
14	Referenzen	22

Alle schwerwiegenden Vorkommnisse im Zusammenhang mit dem Mediagnost-Produkt Leptin Sensitiv ELISA E077 müssen dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Landes gemeldet werden, in dem der Benutzer und / oder Patient ansässig ist.

Symbole und Abkürzungen

Symbol	Beschreibung
	Verfallsdatum
 eIFU	Bitte elektronische Gebrauchsanweisung beachten
	In-vitro Diagnostikum
	Chargennummer
	Hergestellt von
	Bestellnummer
	Lagerungstemperatur
	Inhalt ausreichend für x Tests
	Eindeutige Produktkennung (Unique Device Identification)
	Nicht dem Sonnenlicht aussetzen

Abkürzung	Beschreibung
MTP	Mikrotiterplatte
CAL A – E	Kalibrator A – E
CTR1	Kontrolle 1
CTR2	Kontrolle 2
DET	Antikörper-POD-Konjugat
DIL	Verdünnungspuffer
WB	Wachpuffer
S	Substrat
STP	Stopplösung
CF	Abdeckklebefolie
CERT	Chargenzertifikat

1 Zweckbestimmung

Quantitative Messung von humanem Leptin in menschlichem Serum oder Plasma.

2 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. 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).

Neben seinem Einfluss auf den Stoffwechsel besitzt Leptin auch einen starken Einfluss auf eine Anzahl endokriner Achsen.

Für die klinische Verwendung ist es wichtig zu wissen, dass die Leptinwerte eine moderate zirkadiane Variation zeigen, mit einem Maximum gegen 2 Uhr nachts (10). 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 Leptinmessung für eine informative Aussage aus.

Für eine aussagekräftige Interpretation der gemessenen Leptinwerte 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 Impedanzschätzung, BIA). Es besteht eine Altersabhängigkeit (11) der Leptinwerte. Außerdem besitzen Frauen bei gleicher Fettmasse einen höheren Leptinspiegel als Männer (12,13). Daher sollten die Referenzbereiche zusätzlich noch das Geschlecht und die pubertäre Entwicklung berücksichtigen.

Mit diesem Immunoassay Kit kann humanes Leptin in Serum oder Plasma für diagnostische Zwecke bestimmt werden. Auch für die Messung von Leptin mit besonders geringen Konzentrationen wie z.B. in Proben von anorektischen oder kachektischen Patienten und Kindern ist der Testkit geeignet.

Für die Standardanwendung, Messung von Serum- oder Plasma aus Personen mit Normalgewicht (Erwartungswerte zw. 1 und 100 ng/mL Leptin) empfehlen wir unseren Leptin ELISA Produktnummer E07.

3 Testprinzip

Der Mediagnost-ELISA E077 zur sensitiven Messung von Leptin ist ein sogenannter Sandwich-Assay unter Verwendung zweier spezifischer Antikörper. Der an die Mikrotiterplatte gekoppelte erste Antikörper bindet das Leptin aus der Probe. Im nachfolgenden Schritt bindet am derart immobilisierten Leptin der zweite spezifische anti-Leptin-Antikörper. Die folgende enzymatische Reaktion resultiert in einer Blaufärbung des Substrats, deren Intensität ist abhängig vom Leptin-Gehalt der Probe. Nach dem Stoppen der Reaktion mit Säure wird die dann gelbe Farbintensität durch die Messung der Absorption quantifiziert und mittels einer Kalibrationskurve in die Leptin-Konzentration umgerechnet.

4 Materialien

4.1 Inhalt des Testkits

Die im Testkit mitgelieferten Reagenzien sind ausreichend für 96 Tests.

Abkürzung	Beschreibung	Menge
MTP	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, Beschichtet mit Maus-anti-hLeptin-Antikörper. Die Vertiefungen sind einzeln abbrechbar.	8 x 12 wells
CAL A – E	Kalibratoren A – E , lyophilisiert (rekombinantes hLeptin), die Konzentrationen sind auf den Etiketten und auf dem Chargenzertifikat in ng/mL angegeben.	5 x 1 mL
CTR1	Kontrolle 1 , lyophilisiert, (humanes Serum), Zielwert und Akzeptanzbereich sind auf dem Chargenzertifikat in ng/mL angegeben.	1 x 250 µL
CTR2	Kontrolle 2 , lyophilisiert, (humanes Serum), Zielwert und Akzeptanzbereich sind auf dem Chargenzertifikat in ng/mL angegeben.	1 x 250 µL
DET	Antikörper-POD-Konjugat , gebrauchsfertig, Maus-anti-hLeptin-Antikörper biotinyliert + Streptavidin Peroxidase-Konjugat.	1 x 12 mL
DIL	Verdünnungspuffer , gebrauchsfertig	1 x 60 mL
WB	Waschpuffer , 20fach konzentrierte Lösung	1 x 50 mL
S	Substrat , gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase (POD)-Substrat, stabilisiertes Tetramethylbenzidin.	1 x 12 mL
STP	Stopplösung , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure.	1 x 12 mL
CF	Abdeckklebefolie für die Mikrotiterplatte	2 x
CERT	Chargenzertifikat	1 x

4.2 Nicht mitgelieferte, benötigte Materialien

- Entmineralisiertes Wasser oder destilliertes Wasser (Aqua destillata, A. dest), 950 mL
- Einstellbare Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Spitzen
- Vortex-Mischer
- Mikrotiterplattenschüttler (350 rpm)
- Mikrotiterplattenwaschgerät (optional)
- Photometer für Mikrotiterplatten (ELISA-Reader), Filter bei 450 nm und ≥ 590 nm
- Polypropylen (PP)- / Polyethylen (PE)-Röhrchen zum Verdünnen der Proben

5 Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Der Mediagnost-Kit ist nur zur In-vitro-Diagnostik und nicht zur inneren Anwendung bei Menschen und Tier geeignet. Dieses Produkt ist nur zur Verwendung durch qualifiziertes Fachpersonal bestimmt und darf nur exakt, wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben, eingesetzt werden. Die 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. Ein Sicherheitsdatenblatt ist unter www.mediagnost.de abrufbar oder kann auf Anfrage zur Verfügung gestellt werden.

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

In den Kontrollen CTR1 und CTR2 ist Material menschlichen Ursprungs enthalten. Für die Präparation dieses Produktes verwendetes menschliches Material wurde mit negativem Ergebnis auf einige relevante Infektionserreger getestet wie z.B. Humanes-Immundefizienz-Virus (HIV) RNA und Hepatitis-C-Virus (HCV) RNA. Ebenso wurden negative Testergebnisse bei Testung auf Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsAg), bei Testung auf Antikörper gegen Humanes-Immundefizienz-Virus-I und -II (anti-HIV-I und -II), gegen Hepatitis-B-Core-Antigen (anti-HBc) sowie gegen Hepatitis-C-Virus (anti-HCV) erhalten. Da aber kein Test das Vorhandensein von Infektionserregern völlig ausschließen kann, sollten die Reagenzien wie potentiell infektiöses Material gehandhabt werden.

Bitte verwenden Sie keine abgelaufenen, offensichtlich beschädigten, mikrobiell kontaminierten oder ausgelaufenen Reagenzien. Wenden Sie sich bei einem solchen Fall an contact@mediagnost.de und bewahren Sie die Reagenzien im Zusammenhang mit der Reklamation auf. Komponenten dürfen nicht zwischen den Chargen getauscht werden.

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.

5.1 Reagenzien

CAL, CTR, DET, DIL enthalten:

Gefahrenpiktogramme (CLP):



GHS07

Signalwort (CLP):

Achtung

Gefährliche Inhaltsstoffe:

2-Methyl-2H-isothiazol-3-on; Reaktionsmasse aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1)

Gefahrenhinweise (CLP):

H317 - Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
H412 - Schädlich für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.

Sicherheitshinweise (CLP):

P261 - Einatmen von Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
P273 - Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P280 - Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz tragen.
P333+P313 - Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P362+P364 - Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
P501 Inhalt/Behälter gemäß nationalen Vorschriften der Entsorgung zuführen.

6 Proben

6.1 Probenmaterial

Als Probenmaterial eignet sich menschliches Serum oder Plasma.

In korrespondierenden Serum- und EDTA-Plasmaproben wurden keine signifikanten Abweichungen im Leptin-Gehalt gefunden.

6.2 Blutentnahme / Probenahme

Das Blut zur Probengewinnung soll mittels standardmäßiger Venenpunktion von qualifiziertem Personal entnommen werden. Hämolytische Reaktionen sind zu vermeiden.

Die humanen Serum- oder Plasmaproben sollten bei normalem Ernährungszustand am Morgen oder am frühen Nachmittag gewonnen werden.

Leptinkonzentrationen zeigen eine zirkadiane Variation, mit einem Maximum gegen 2 Uhr nachts (37). Zusammen mit der Nahrungsaufnahme sollten diese Schwankungen bei der Entnahme von Blutproben berücksichtigt werden.

6.3 Erforderliches Probenvolumen

Eine Einzelbestimmung benötigt minimal 10 µL Probe, eine Doppelbestimmung 20 µL. Zur korrekten sicheren Handhabung ist je nach individuellem Verfahren ein höheres Probenvolumen nötig.

6.4 Probenstabilität

Die Lagerung der Proben soll in fest verschließbaren, geeigneten Probengefäßen erfolgen.

Zur längerfristigen Lagerung der Proben wird eine Lagerungstemperatur von -20°C oder niedriger empfohlen. Die Lagerung von Proben über einen Zeitraum von 2 Jahren bei -20°C zeigte keinen Einfluss auf den Messwert. Einfrieren und Auftauen der Proben sollte minimiert werden. 5 Frier-Tauzyklen zeigten keinen Einfluss auf die Proben.

Lagerungstemperatur	Lagerungszeit
20 – 25 °C	max. 2 Tage
2 – 8°C	max. 3 Tage

6.5 Interferenz

Hämoglobin, Triglyceride und Bilirubin in der Probe zeigten bis zu einer Konzentration von **1 mg/mL**, **100 mg/mL** bzw. **200 µg/mL** keinen Einfluss auf die Messung. Der Einsatz hämolytischer, lipämischer oder ikterischer Proben sollte zuvor vom Anwender geprüft werden.

6.6 Probenverdünnung

Die Proben müssen in Verdünnungspuffer **DIL** 1:10 verdünnt werden. Falls Werte unter 0,5 ng/mL Leptin erwartet oder erreicht werden, sollte und kann die Probe weniger stark verdünnt werden, minimal 1:5. Bei erwarteten oder erreichten Werten von größer 50 ng/mL sollte und kann die Probe entsprechend höher verdünnt werden, siehe hierzu Tabelle 13.

6.6.1 Beispielhaftes Verdünnungsprotokoll

Für eine Doppelbestimmung werden z.B. 225 µL Verdünnungspuffer **DIL** in PE-/PP-Gefäße vorgelegt, dazu werden 25 µL Serum oder Plasma pipettiert (entspricht einer 1:10 Verdünnung). Nach dem Mischen werden von dieser Lösung 2 x 100 µL (pro Vertiefung 100 µL) im Assay eingesetzt.

7 Technische Hinweise

7.1 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Komponenten des Kits müssen **vor Gebrauch auf Raumtemperatur** (20-25°C) gebracht werden. Die evtl. in manchen Puffern vorhandenen Präzipitate müssen vor Gebrauch durch Mischen und Erwärmen wieder gelöst werden. Reagenzien aus Kits mit unterschiedlichen Chargen-Nummern dürfen nicht vermischt werden.

7.2 Rekonstitution

Die Kalibratoren **A – E**, sowie die Kontrollen **CTR1** und **CTR2** werden mit dem im Kit enthaltenen Verdünnungspuffer **DIL** rekonstituiert. Zum Rekonstituieren müssen die Reagenzien 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen und anschließend kräftig mit einem Vortex-Mixer gemischt werden. Schaumbildung sollte jedoch vermieden werden.

7.3 Verdünnung

Nach der Rekonstitution werden die Kontrollen **CTR1** und **CTR2** im gleichen Verhältnis wie die Proben mit dem Verdünnungspuffer **DIL** verdünnt. Die Kalibratoren sind nach Rekonstitution gebrauchsfertig und dürfen nicht verdünnt werden.

Das zur Assaydurchführung benötigte Volumen des Waschpuffers **WB** wird vorbereitet, indem das 20fach Konzentrat im Verhältnis 1:20 mit Aqua dest. verdünnt wird.

7.4 Inkubation

Eine Inkubation bei Raumtemperatur bedeutet: **Inkubation bei 20 - 25°C**.

Das Substrat **S**, stabilisiertes Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich. Aufbewahrung und Inkubation müssen daher vor Licht geschützt erfolgen.

7.5 Testdurchführung

Die Messungen (Leerwert, Kalibratoren **A-E**, Kontrollen **CTR1** und **CTR2** und Proben) sollten stets in Doppelbestimmung durchgeführt werden. Auf genaues Pipettieren und strikte Befolgung des Testprotokolls ist zu achten. Bei der Testdurchführung sollten Kalibratoren **A-E**, Kontrollen **CTR1**, **CTR2** und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden. Das Antikörper-POD-Konjugat **DET** sowie das Substrat **S** und die Stopplösung **STP** sollten nachfolgend in der gleichen Reihenfolge und in dem gleichen Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

7.6 Schütteln

Die Inkubationen sollen geschüttelt bei **350 rpm** Umdrehungsfrequenz eines für Mikrotiterplatten geeigneten Schüttlers erfolgen. Bauartbedingt können individuell Abweichungen von diesem Wert möglich sein, dann muss die Umdrehungsfrequenz angepasst werden. Zu geringes Schütteln kann durch ungenügende Vermischung der Lösungen zu verringerten optischen Dichten, hohen Streuungen und/oder falschen Werten führen, zu starkes Schütteln dagegen zu erhöhten optischen Dichten.

7.7 Waschen

Korrektes Waschen ist von grundlegender Bedeutung für den sicheren, richtigen und präzisen Ablauf des Testes. Ungenügendes Waschen ist eine häufige Ursache für nicht valide Testdurchführungen. Mögliche Folgen sind unkontrollierte unspezifische Variationen der gemessenen optischen Dichten, die zu falschen Ergebnisberechnungen der Proben führen können. Mögliche Hinweise darauf sind z.B. hohe Leerwerte und variabel streuende Messwerte. Zum Waschen muss der mitgelieferte und auf Gebrauchskonzentration verdünnte Waschpuffer verwendet werden. Das Waschvolumen pro Waschzyklus und Vertiefung muss mindestens 300 µL betragen.

Bei Gebrauch eines speziellen **automatischen Mikrotiterplattenwaschgerätes** ist unbedingt dessen Gebrauchsanweisung zu befolgen. Die Geräteeinstellungen müssen u.a. der Mikrotiterplattengeometrie und den Parametern der Waschspezifikation angepasst werden. Es ist zu beachten, dass die Dispensier- und Absaugkapillaren des Gerätes nicht die Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterplatte beschädigen. Die

verbleibende Restflüssigkeit nach jedem Absaugen muss minimiert werden. Nach Ende des gesamten Waschvorganges sollte die Menge der verbleibenden Restflüssigkeit überprüft und ggfs. verringert werden durch mehrmaliges Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fuselndem Zellstoff.

Manuelles Waschen ist eine gute Alternative. Die Waschflüssigkeit kann dabei per Multistepper, Mehrkanalpipette oder auch mit einer Spritzflasche dispensiert werden. Die Waschflüssigkeit kann durch schwingvolles Ausschwenken der Mikrotiterplatte über einem Becken entfernt werden. Falls Absaugvorrichtungen eingesetzt werden, ist darauf zu achten, dass die Oberflächen der Vertiefungen der Mikrotiterplatte nicht beschädigt werden. Nach jedem einzelnen Waschzyklus sollte die verbleibende Restflüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fuselndem Zellstoff gründlich entfernt werden.

8 Stabilität und Lagerung

8.1 Lagerbedingungen

Nach Erhalt soll der Testkit bei 2 - 8°C bis zum Verfallsdatum gelagert werden.

8.2 Haltbarkeit

Die Haltbarkeit der Reagenzien **nach erstmaligem Öffnen** beträgt 4 Wochen. Nicht verwendete Streifen **der Testplatte** sind zusammen mit dem Trockenkissen **luftdicht** in dem wiederverschließbaren Klippbeutel bei 2 - 8°C zu lagern. Die Streifen bitte nur im mitgelieferten Rahmen verwenden. **Rekonstituierte Komponenten** (Kalibratoren **A – E** und Kontrollen **CTR1** und **CTR2**) sind bei -20°C aufzubewahren. Zur weiteren Verwendung Auftauen bei maximal Raumtemperatur und kein übermäßiges Vortexen. Bis zu 3 dieser Einfrier-Auftauzyklen zeigten keinen Einfluss auf den Test. Der 1:20 gebrauchsfertig verdünnte Waschlösungspuffer **WB** ist 4 Wochen bei 2-8°C haltbar.

9 Testdurchführung – Ablaufschema

Vorbereitung der Reagenzien			
Reagenzpräparation		Rekonstitution	Verdünnung
CAL A-E	Kalibratoren	in je 1 mL Verdünnungspuffer DIL	-
CTR1 CTR2	Kontrollen	in je 250 µL Verdünnungspuffer DIL	1:10 in Verdünnungspuffer DIL
WB	Waschpuffer 20fach Konz.	-	1:20 mit Aqua dest.
Probenverdünnung: 1:10 z.B. 225 µL DIL + 25 µL Probe			
Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen.			
Testdurchführung in Doppelbestimmung			
Pipettieren	Reagenzien	Position	
100 µL	Verdünnungspuffer DIL (Leerwert)	A1/A2	
100 µL	Kalibrator CAL A (0,05 ng/mL)	B1/B2	
100 µL	Kalibrator CAL B (0,5 ng/mL)	C1/C2	
100 µL	Kalibrator CAL C (1,5 ng/mL)	D1/D2	
100 µL	Kalibrator CAL D (3,5 ng/mL)	E1/E2	
100 µL	Kalibrator CAL E (5 ng/mL)	F1/F2	
100 µL	CTR1 Kontrolle 1 (1:10 verdünnt)	G1/G2	
100 µL	CTR2 Kontrolle 2 (1:10 verdünnt)	H1/H2	
100 µL	Probe (1:10 verdünnt)	in die restlichen Vertiefungen nach Bedarf pipettieren	
Mit Abdeckklebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.			
Inkubation: 1 h bei (20-25°C), 350 rpm			
3x 300 µL	Absaugen und die Platte 3x mit je 300 µL Waschpuffer (1:20 verdünnt) pro Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung	
100 µL	Antikörper-POD-Konjugat DET	In jede Vertiefung	
Mit Abdeckklebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.			
Inkubation: 30 Minuten bei (20-25°C), 350 rpm			
3x 300 µL	Absaugen und die Platte 3x mit je 300 µL Waschpuffer (1:20 verdünnt) pro Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung	
100 µL	Substrat S	In jede Vertiefung	
Substrat S Inkubation: 15 Minuten im Dunklen bei (20-25°C)			
100 µL	Stopplösung STP	In jede Vertiefung	
Messung der Absorption innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm).			

10 Qualitätskontrolle

Zur Einschätzung und Bewertung eines validen Assay-Laufes gelten folgende Kriterien:

- Zur Auswertung des Testes sollte gewährleistet sein, dass die Extinktionen des Leerwertes 0,25 Einheiten nicht überschreiten, Kalibrator E sollte dagegen Extinktionen über 1,0 Einheiten erreichen.
- Die gemessenen Konzentrationen der Kitkontrollen müssen innerhalb des zulässigen Akzeptanzbereichs liegen, dieser ist auf dem im Testkit beiliegenden Chargenzertifikat angegeben.

Sollten diese Kriterien nicht erfüllt sein, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden.

Zudem sollte weiteres beachtet werden:

- Proben, deren Extinktionen außerhalb des Kalibrationsbereichs von **CAL A – CAL E** gefunden werden, liegen außerhalb der Kalibrationskurve und sollten zur sicheren Bestimmung in einer zweiten Testdurchführung mit angepasster Verdünnung neu bestimmt werden.
- Die ebenfalls auf dem Chargenzertifikat angegebenen Extinktionen der Kalibratoren entsprechen beispielhaften Angaben und dürfen nicht zur Kalkulation von gemessenen Proben herangezogen werden.

11 Auswertung

11.1 Erstellung der Kalibrationskurve

Die bereitgestellten Kalibratoren enthalten folgende Leptinkonzentrationen:

Kalibrator	A	B	C	D	E
ng/mL	0,05	0,5	1,5	3,5	5

- a) Ermittlung des **Mittelwertes** der optischen Dichte des Leerwertes aus den Doppelbestimmungen (Vertiefung A1/A2).
- b) Von den Mittelwerten der optischen Dichte der Kalibratoren, Kontrollen und der Proben wird der mittlere Leerwert abgezogen.
- c) Die Kalibratorkonzentrationen (x-Achse) werden gegen die gemessene optische Dichte (y-Achse) aufgetragen.
- d) Die Berechnung der Kalibrationskurve sollte durch ein statistisches Programm erfolgen, da die Kurve i. Allg. nicht ideal durch eine lineare Regression beschrieben wird. **Ein höhergradiges Polynom, 4-Parameter-Anpassungen** oder **nicht-lineare Regression** sind zur Auswertung geeignet, in manchen Fällen kann eine Spline- oder Punkt-zu-Punkt-Anpassung angebracht sein.
- e) Aus der Kalibrationskurve erhält man die Leptinkonzentration der verdünnten Kontrollen **CTR1** und **CTR2** bzw. der verdünnten Proben. Die **Multiplikation** des jeweiligen berechneten Leptin-Gehaltes **mit** dem entsprechenden **Verdünnungsfaktor** ergibt dann die Leptinkonzentration der unverdünnten Proben / Kontrollen.

11.2 Beispiel einer typischen Kalibrationskurve

Die exemplarischen Daten und die Kalibrationskurve aus Abbildung 1 können **nicht** für die Berechnung der Testergebnisse genutzt werden! Für jeden Test muss eine eigene Kalibrationskurve mitgeführt werden.

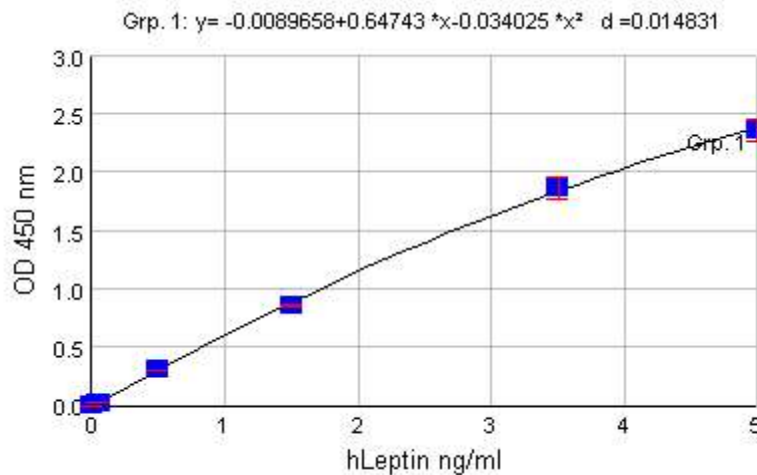


Abb. 1 Exemplarische Kalibrationskurve

11.3 Beispielhafte Berechnung der Leptin – Konzentration einer 1:10 verdünnten Probe

- Gemessene Extinktion der Probe: 0,293
- Gemessene Extinktion des Leerwertes: 0,015

Aus der Differenz der Probenextinktion und der Extinktion des Leerwertes (= 0,278) **berechnet Ihr Auswertungsprogramm** mit der entsprechenden Kurvenanpassung (hier: Polynom 2. Grades) die Leptinkonzentration der verdünnten Probe durch Auflösen der Gleichung aus Abb. 1 nach x. In diesem Fall ergibt sich eine Leptinkonzentration in der verdünnten Probe von

$$\begin{aligned} 0,278 &= -0.0089658 + 0,64743x - 0.034025x^2 \\ 0,4524 &= x \end{aligned}$$

Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors von 1:10 enthält die Probe somit 4,4524 ng/mL Leptin.

11.4 Interpretation der Ergebnisse

Das Testergebnis allein sollte nicht der einzige Grund für therapeutische Entscheidungen sein. Die Ergebnisse sollten in Bezug auf die Anamnese, weitere klinische Beobachtungen und den Resultaten anderer diagnostischer Untersuchungen interpretiert werden. Darüber hinaus empfehlen wir, dass jedes Labor seine eigenen Referenz-Bereiche ermittelt.

11.5 Einschränkungen

Der Mediagnost Leptin Sensitiv ELISA E077 basiert auf Antikörpern. Im Allgemeinen kann diese Technik durch heterophile Antikörper oder Rheumafaktoren in der Probe beeinflusst werden. Dieser Einfluss wird durch das Assay-Design reduziert, aber kann nicht vollständig ausgeschlossen werden.

12 Referenzwerte

Die Leptinkonzentrationen im Serum korrelieren üblicherweise stark mit der Körperfettmasse. Schlanke Personen besitzen generell niedrige, fettleibige Personen dagegen eher hohe Leptinwerte. Außerdem besteht ein eindeutiger Geschlechtsunterschied zwischen Mann (niedrigere Werte) und Frau (höhere Werte) bei gegebenem Körperfettanteil. Die Pubertätsphase besitzt ebenfalls einen Einfluss auf den Leptinwert. Diese Abhängigkeiten müssen für Leptinerwartungswerte mit in Betracht gezogen werden. Es gibt verschiedene Methoden, den Körperfettanteil 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 die Leptinkonzentrationen im Serum auf der Basis des BMI als die wichtigste einschränkende, unabhängige Variable, unter Einbeziehung des Geschlechts und der pubertären Entwicklung, erstellt (14; s. nachstehende Abbildungen 2 bis 9 und Tabellen 1 bis 9). 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 Leptinwerten von normalen Patienten genutzt werden, um pathologische Abweichungen festzustellen.

Die besten Regressionen für die verschiedenen Personengruppen (siehe Abbildungen 2 bis 9) 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 halblogarithmischer Auftragung (y-Achse = log Leptin) ergeben diese Funktionen Geraden. Die Werte für a, b und c sind in Tabelle 1 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: $\text{Leptin} = 0,0181 e^{(0,2067 \cdot \text{BMI} - 1,1919)}$

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

In einem halblogarithmischen Diagramm entsprechen diese Funktionen parallelen Geraden mit gleichen Abständen zur 50. Perzentile.

12.1 Berechnung der Standardabweichung (SA; Z-Werte)

Eine geeignete Methode, die Abweichung einer gemessenen Leptinkonzentration vom entsprechenden Referenzbereich festzustellen, ist die Berechnung der Standardabweichung. Hierbei wird der gemessene Leptinwert 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 Leptinwerte 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 Leptinwerte 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 1 getrennt für Geschlecht und Alter angegeben.

Beispiel:

Ein Junge im Tanner-Stadium 3, BMI = 25 kg/m², gemessene Leptinkonzentration = 5 ng/mL:

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

12.2 Abschätzung der optimalen Probenverdünnung

Da die Serum-Leptinwerte abhängig von der Körperfettmasse über mehrere Größenordnungen variieren, ist eine adäquate Probenverdünnung Voraussetzung für eine hohe Messgenauigkeit. Die Proben sollten so verdünnt werden, dass die End-Konzentrationen im Bereich der Kalibrationskurve liegen. Die Erwartungsbereiche stellen eine nützliche Hilfe dar, um die erwarteten Leptinwerte bezogen auf BMI, Geschlecht und Alter einzuschätzen.

Beispiel 1

Erwachsene Frau, BMI = 35 kg/m². Der durchschnittliche Leptinwert bei einem BMI von 35 kg/m² liegt nach den Referenzbereichen für erwachsene Frauen bei ca. 50 ng/mL. Die optimale Verdünnung wäre hier also 1:20.

Beispiel 2

Präpubertärer Junge, BMI = 24 kg/m². Der durchschnittliche Leptinwert für Jungen im Tanner-Stadium 1 und 2 mit einem BMI von 24 kg/m² liegt nach den Referenzbereichen bei ca. 10 ng/mL. Die optimale Verdünnung wäre hier also 1:10.

Tabelle 1 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

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

Tabelle 2 Mädchen im Tanner-Stadium 1 und 2

BMI (kg/m ²)	Perzentile (µg/L)				
	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	125,0		
33	53,2	73,4			
34	68,4	94,3			
35	87,8	121,0			
36	113,0				
37	145,0				

Tabelle 3 Jungen im Tanner-Stadium 1 und 2

BMI (kg/m ²)	Perzentile (µg/L)				
	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				

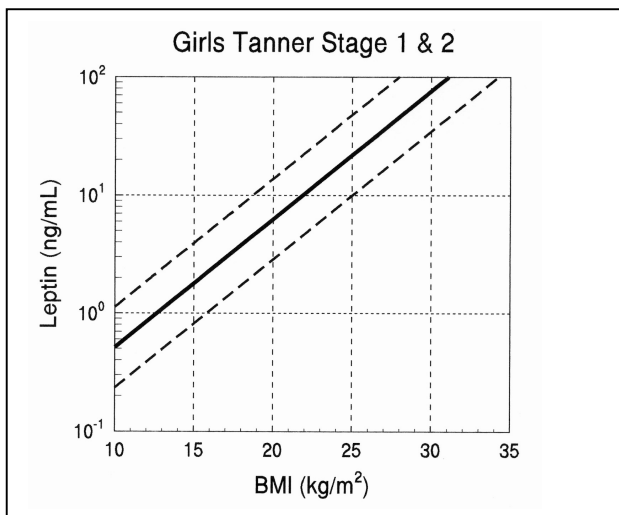


Abb. 2 Referenzbereiche für humane Serumkonzentrationen bezogen auf den BMI: Mädchen im Tanner-Stadium 1 + 2 (s. Text).

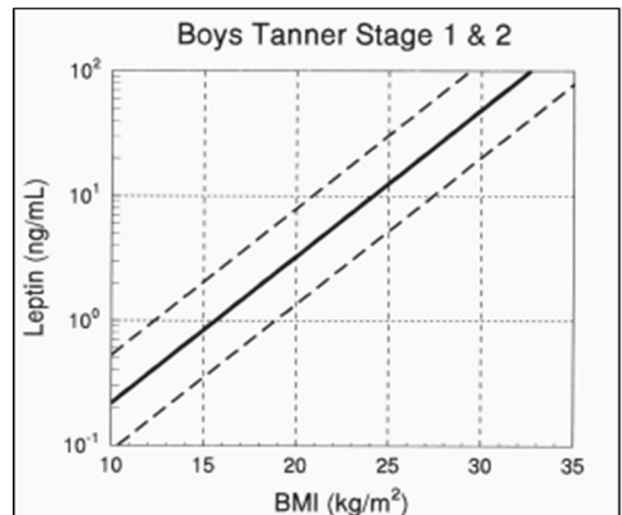


Abb. 3 Referenzbereiche für humane Serumkonzentrationen bezogen auf den BMI: Jungen im Tanner-Stadium 1 + 2 (s. Text).

Tabelle 4 Mädchen im Tanner-Stadium 3 und 4

Perzentile ($\mu\text{g/L}$)					
BMI (kg/m^2)	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				

Tabelle 5 Jungen im Tanner-Stadium 3 und 4

Perzentile ($\mu\text{g/L}$)					
BMI (kg/m^2)	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		

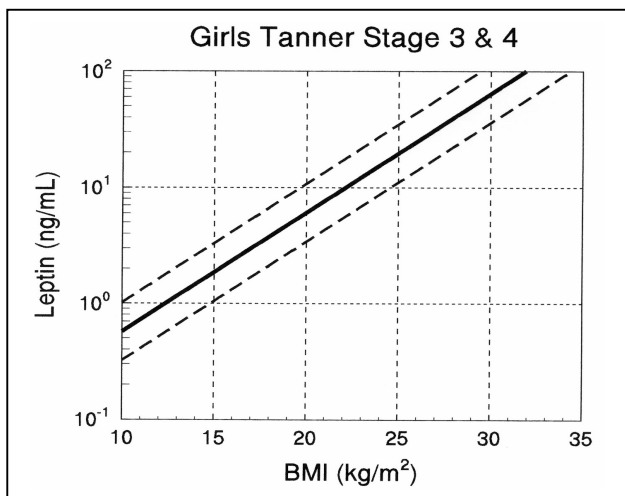


Abb. 4 Referenzbereiche für humane Serumkonzentrationen bezogen auf den BMI: Mädchen im Tanner-Stadium 3 + 4 (s. Text).

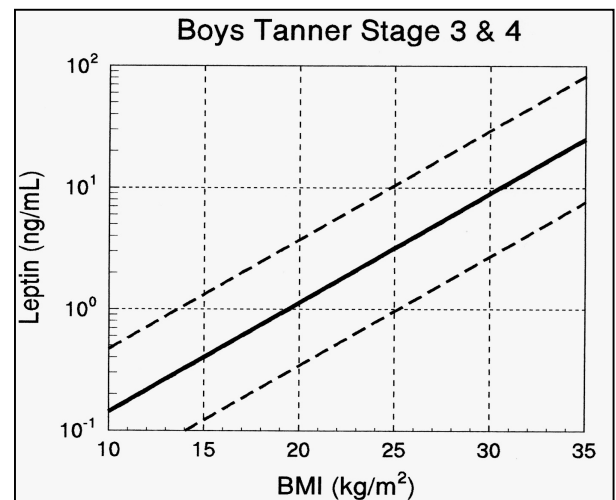


Abb. 5 Referenzbereiche für humane Serumkonzentrationen bezogen auf den BMI: Jungen im Tanner-Stadium 3 + 4 (s. Text).

Tabelle 6 Mädchen im Tanner-Stadium 5

BMI (kg/m ²)	Perzentile (µg/L)				
	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		

Tabelle 7 Jungen im Tanner-Stadium 5

BMI (kg/m ²)	Perzentile (µg/L)				
	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

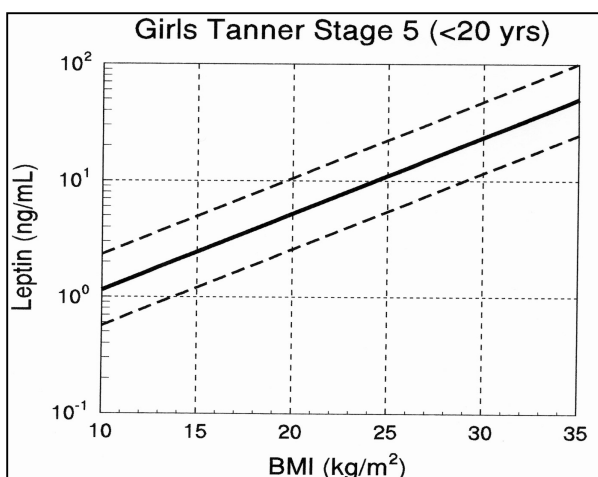


Abb. 6 Referenzbereiche für humane Serumkonzentrationen bezogen auf den BMI: Mädchen im Tanner-Stadium 5 (s. Text).

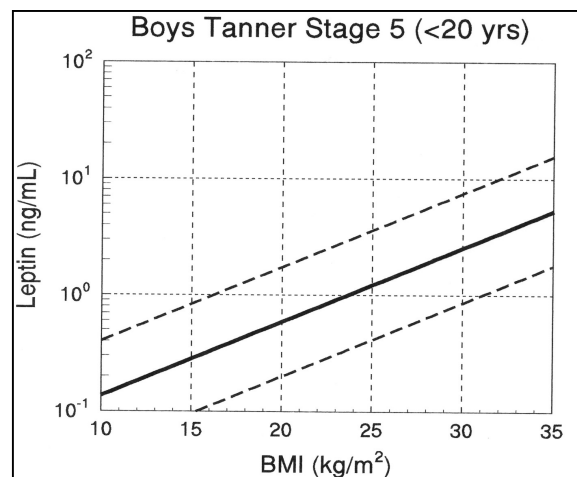


Abb. 7 Referenzbereiche für humane Serumkonzentrationen bezogen auf den BMI: Jungen im Tanner-Stadium 5 (s. Text).

Tabelle 8 Frauen

BMI (kg/m ²)	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		

Tabelle 9 Männer

BMI (kg/m ²)	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		

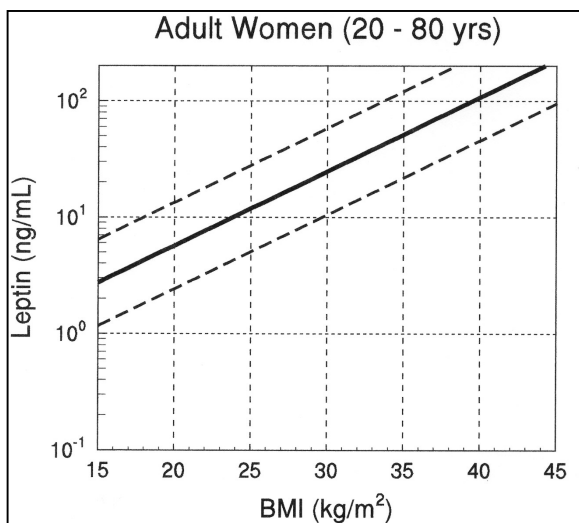


Abb. 8 Referenzbereiche für humane Serumkonzentrationen bezogen auf den BMI: Frauen (s. Text).

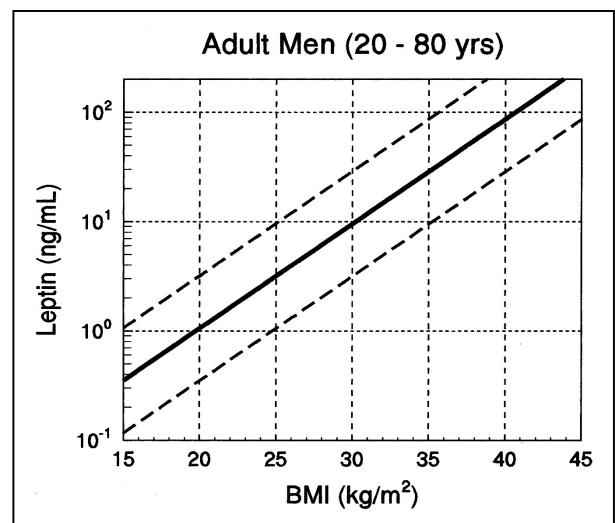


Abb. 9 Referenzbereiche für humane Serumkonzentrationen bezogen auf den BMI: Männer (s. Text).

13 Assayeigenschaften und Validierung

13.1 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität des Leptin Sensitiv ELISA E077 beträgt 0,01 ng/mL (Leerwert plus zweifache Standardabweichung des Leerwertes).

13.2 Wiederfindung und Richtigkeit

Rekombinantes Leptin (WHO/NIBSC IS 97/594; 15,16) wurde zu Verdünnungspuffer **DIL** und Serumproben gegeben. Der Leptin-Gehalt der so angereicherten Proben wurde gemessen und die relative Wiederfindung berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 gezeigt.

Tabelle 10 Relative Wiederfindung von WHO/NIBSC 97/594 Leptin in Serumproben [%]

Leptin zugesetzt [ng/mL]	5	10	15
Probe 1	109	108	108
Probe 2	108	104	109
Probe 3	105	102	85

13.3 Präzision

Die Inter- und Intra-Assay Variationskoeffizienten liegen beide deutlich unter 10 %. Beispielhafte Bestimmungen sind in Tabelle 11 und Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 11 Inter-Assay-Varianz

	Mittelwert [ng/mL]	Standardabweichung [ng/mL]	VK [%]
Probe 1	2,04	0,147	7,2
Probe 2	6,93	0,423	6,1
Probe 3	14,86	1,11	7,5

Tabelle 12 Intra-Assay-Varianz

	Mittelwert [ng/mL]	Standardabweichung [ng/mL]	VK [%]
Probe 1	22,44	1,28	4,35
Probe 2	4,1	0,108	2,63

13.4 Linearität

Verdünnungen von 1:5 bis 1:320 wurden mit vier Serumproben getestet, die gemessenen Werte an Leptin sind in der Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13 Verdünnungen von Serumproben von 1:5 bis 1:320

Verdünnung	Probe A [ng/mL]	Probe B [ng/mL]	Probe C [ng/mL]	Probe D [ng/mL]
1:5	10	26	-	23
1:8	10	25	39	25
1:10	11	26	36	26
1:20	11	28	37	28
1:40	11	29	39	29
1:80	12	29	41	30
1:160	10	30	40	31
1:320	11	27	37	30

13.5 Interferenz

Die Interferenz von Hämoglobin, Bilirubin und Triglyzeriden auf die Bestimmung von Leptin wurde durch Zugabe von verschiedenen Mengen dieser Substanzen zu humanen Serumproben getestet. Die Messwerte in Tabelle 14 zeigen, dass weder Bilirubin noch Triglyzeride oder Hämoglobin in den angegebenen Maximalkonzentrationen einen Einfluss auf die Messung von Leptin in humanem Serum gezeigt haben.

Tabelle 14 Interferenzen. Die relative Menge vom gemessenen Leptin im Vergleich von angereichertem zu nativem Serum wird hier [%] angezeigt

	Triglyzeride 100 mg/mL	Bilirubin 200 µg/mL	Hämoglobin 1 mg/mL
Probe 1	95	101	94
Probe 2	107	105	105
Probe 3	111	101	101

14 Referenzen

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. 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.
11. Havel PJ, Kasim-Karakas S, Dubuc GR, Mueller W, Phinney SD. 1996 Gender difference in plasma leptin concentrations. *Nature Med*. 2:949-950.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Adresse NIBSC: Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Great Britain; <https://www.nibsc.org>