

Leptin Sensitiv ELISA

REF E077

IVD

Manual de instrucciones en español



E077_IFU_IVD_ES

Autorización: 29.03.2023

Revisión: 001/03.2023

Para diagnóstico *in vitro*. DIV de uso profesional.

Lea las instrucciones de uso antes de utilizar el producto.

Leptin Sensitiv ELISA E077	96 disposiciones
CE	DE/CA40/00809/21/1
Principio de la prueba	Inmunoensayo enzimático
Duración (tiempo de incubación)	1,75 h
Anticuerpos	Anticuerpos monoclonales, listos para usar
Tampón	Listo para usar y 20 veces más concentrado
Calibradores	5 calibradores individuales: 0,05 - 5 µg/L, Leptina humana recombinante
Material de referencia	Norma internacional de la OMS/NIBSC 97/594 sobre la leptina recombinante (15, 16)
Intervalo del ensayo	0,01 – 50 µg/L
Control	2 controles, liofilizados
Muestras	Suero humano/plasma Mediciones precisas incluso en personas delgadas, como pacientes anoréxicos o caquéticos, adolescentes y niños pequeños.
Volumen necesario de la muestra	25 µL
Dilución de la muestra	1:10
Sensibilidad analítica	∅ 0,01 µg/L
Variabilidad intraanalítica/interanalítica	∅ < 10 %
Obras de referencia	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

Cambios respecto a la versión anterior:

Revisión	Descripción
001	Conversión a instrucciones de uso electrónicas, modificaciones de redacción



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

Índice

Símbolos y abreviaturas	4
1 Finalidad prevista.....	5
2 Introducción	5
3 Principio de la prueba	5
4 Materiales	6
5 Advertencias y precauciones	7
6 Muestras	8
7 Indicaciones técnicas.....	9
8 Estabilidad y conservación	10
9 Procedimiento - Diagrama de flujo.....	11
10 Control de calidad	12
11 Evaluación	12
12 Valores de referencia.....	14
13 Propiedades del ensayo y validación.....	21
14 Bibliografía.....	22

Todos los incidentes graves relacionados con el producto Mediagnost Leptin Sensitive ELISA E077 deben comunicarse al fabricante y a la autoridad competente del país en el que resida el usuario o el paciente.

Símbolos y abreviaturas

Símbolo	Descripción
	Fecha de caducidad
	Observe las instrucciones de uso electrónicas
	Diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código de lote
	Fabricado por
	Número de pedido
	Temperatura de conservación
	Contenido suficiente para x pruebas
	Identificación única del producto (Unique Device Identification)
	No exponer a la luz del sol

Abreviatura	Descripción
MTP	Microplaca
CAL A - E	Calibrador A - E
CTR1	Control 1
CTR2	Control 2
DET	Conjugado POD de anticuerpos
DIL	Tampón de dilución
WB	Tampón de lavado
S	Sustrato
STP	Solución de parada
CF	Lámina protectora adhesiva
CERT	Certificado de lote

1 Finalidad prevista

Medición cuantitativa de leptina humana en suero o plasma humano.

2 Introducción

En 1994, se identificó la proteohormona leptina como producto del gen *ob* (1,2). Tiene un peso molecular de 16 kDa y se le considera un factor clave en la regulación del peso corporal. La leptina es producida casi exclusivamente por los adipocitos diferenciados (3-5). Actúa sobre el sistema nervioso central, en especial sobre el hipotálamo, inhibiendo la ingesta de alimentos y aumentando el consumo de energía (2,6-9).

Además de su influencia sobre el metabolismo, la leptina también ejerce una fuerte influencia sobre varios ejes endocrinos.

En el ámbito clínico, es importante señalar que los niveles de leptina muestran una variación circadiana moderada, registrando un máximo sobre las 2 de la madrugada (10). Los niveles de leptina a esta hora son aproximadamente entre un 30 % y un 100 % más altos que los niveles medidos por la mañana o a primera hora de la tarde. Así pues, estas fluctuaciones deben tenerse en cuenta junto con la ingesta de alimentos a la hora de tomar muestras de sangre. En condiciones estandarizadas, como es un ritmo alimentario normal y la toma de muestras de sangre por la mañana o a primera hora de la tarde, una medición de leptina es suficiente para una declaración informativa.

Los intervalos de referencia son necesarios para una interpretación concluyente de los niveles de leptina medidos. Como la masa grasa corporal es la que más influye en los valores, los intervalos de referencia deben relacionarse con la masa grasa corporal (índice de masa corporal o IMC, o porcentaje de grasa corporal determinado mediante el análisis de la impedancia bioeléctrica, BIA). Los niveles de leptina dependen de la edad (11). Además, las mujeres tienen niveles de leptina más elevados que los hombres para la misma masa grasa (12, 13). Por lo tanto, los intervalos de referencia deben tener en cuenta además el sexo y el desarrollo puberal.

Este kit de inmunoensayo puede utilizarse para determinar la concentración de leptina humana en suero o plasma con fines diagnósticos. El kit de prueba también es adecuado para medir concentraciones particularmente bajas de leptina, por ejemplo, en muestras de pacientes anoréxicos o caquéticos y niños.

Para la aplicación estándar, que es la medición de suero o plasma de personas con peso normal (valores previstos entre 1 y 100 ng/mL de leptina), recomendamos nuestro kit Leptin ELISA número de referencia E07.

3 Principio de la prueba

El Mediagnost ELISA E077 permite la medición sensible de la leptina y es un ensayo denominado sándwich que utiliza dos anticuerpos específicos. El primer anticuerpo acoplado a la microplaca se une a la leptina de la muestra. En la siguiente fase, el segundo anticuerpo específico antileptina se une a la leptina inmovilizada de este modo. La siguiente reacción enzimática provoca una coloración azul del sustrato, cuya intensidad depende del contenido de leptina presente en la muestra. Una vez interrumpida la reacción con el ácido, la intensidad del color amarillo se cuantifica midiendo la absorción y se convierte en la concentración de leptina mediante una curva de calibración.

4 Materiales

4.1 Contenido del kit de pruebas

Los reactivos suministrados en el kit de pruebas son suficientes para 96 pruebas.

Abreviatura	Descripción	Cantidad
MTP	Microplaca , lista para su uso, recubierta con anticuerpo anti-hLeptina de ratón. Los pocillos pueden desprenderse individualmente.	8×12 pocillos
CAL A - E	Calibradores A - E , liofilizados (hLeptina recombinante). Las concentraciones se indican en las etiquetas y en el certificado de lote en ng/mL.	5 × 1 mL
CTR1	Control 1 , liofilizado (suero humano). El valor objetivo y el intervalo de aceptación se indican en el certificado de lote en ng/mL.	1 x 250 µL
CTR2	Control 2 , liofilizado (suero humano). El valor objetivo y el intervalo de aceptación se indican en el certificado de lote en ng/mL.	1 x 250 µL
DET	Conjugado POD de anticuerpos , listo para su uso, Anticuerpo anti-h leptina de ratón biotinilado + conjugado estreptavidina peroxidasa.	1 × 12 mL
DIL	Tampón de dilución , listo para su uso	1 × 60 mL
WB	Tampón de lavado , solución 20 veces concentrada	1 x 50 mL
S	Sustrato , listo para su uso, de peroxidasa de rábano picante (POD), tetrametilbencidina estabilizada.	1 × 12 mL
STP	Solución de parada , lista para su uso, 0,2 M de ácido sulfúrico.	1 × 12 mL
CF	Lámina protectora adhesiva para la microplaca	× 2
CERT	Certificado de lote	× 1

4.2 Materiales necesarios, pero no suministrados

- Agua desmineralizada o agua destilada (Aqua destillata, A. dest): 950 mL
- Micropipetas ajustables y pipetas multicanal con puntas intercambiables
- Agitador vórtex
- Agitador de microplacas (350 rpm)
- Arandela para microplacas (opcional)
- Fotómetro para microplacas (lector ELISA), filtros a 450 nm y ≥ 590 nm
- Tubos de polipropileno (PP)/polietileno (PE) para diluir las muestras

5 Advertencias y precauciones

El kit Mediagnost es adecuado exclusivamente para diagnóstico *in vitro* y no para su uso interno en seres humanos ni en animales. Este producto está destinado para el uso exclusivo por parte de personal cualificado y debe emplearse exactamente tal como se describe en las instrucciones incluidas. Mediagnost GmbH no se hace responsable de las pérdidas ni de los daños que tengan su causa en el incumplimiento de las instrucciones, a menos que la ley estipule lo contrario. La ficha de datos de seguridad está disponible en www.mediagnost.de o puede solicitarse si así se desea.

PRECAUCIÓN: Este kit contiene material de origen humano o animal. Los componentes del kit deben manipularse como si fueran infecciosos.

Los controles CTR1 y CTR2 contienen material de origen humano. El material humano utilizado para la preparación de este producto se analizó y se obtuvieron resultados negativos para algunos agentes infecciosos pertinentes, como el ARN de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el ARN de virus de la hepatitis C (VHC). También se obtuvieron resultados negativos en las pruebas del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), en las pruebas de anticuerpos frente a los virus de la inmunodeficiencia humana I y II (anti-VIH-I y II), frente al antígeno central de la hepatitis B (anti-HBc) y frente al virus de la hepatitis C (anti-VHC). Como ninguna prueba puede descartar por completo la presencia de agentes infecciosos, los reactivos deben manipularse como material potencialmente infeccioso.

No utilice reactivos caducados, visiblemente dañados, contaminados microbiológicamente o con fugas. Si se diera el caso, póngase en contacto con contact@mediagnost.de y conserve los reactivos correspondientes a la reclamación. Los componentes no deben intercambiarse entre los lotes.

Adopte las precauciones adecuadas y respete las normas de prácticas correctas de laboratorio durante la conservación, la utilización y la eliminación de los componentes del kit. Asimismo, elimine los componentes del kit conforme a la normativa local.

5.1 Reactivos

CAL, CTR, DET, DIL contienen:

Pictogramas de peligro (CLP):



GHS07

Palabra de advertencia (CLP):

Atención

Componentes peligrosos:

2-Metilisotiazol-3(2H)-ona, Masa de reacción de 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-ona y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona (3:1)

Indicaciones de peligro (CLP):

H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

H412 - Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

Consejos de prudencia (CLP):

P261 - Evitar respirar la niebla/los vapores/el aerosol.

P273 - Evitar su liberación al medio ambiente.

P280 - Llevar guantes/ropa de protección/equipo de protección para los ojos.

P333 + P313 - En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

P362 + P364 - Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

P501 - Eliminar el contenido/el recipiente de acuerdo con la normativa nacional.

6 Muestras

6.1 Material de muestra

El suero o plasma humano es adecuado como material de muestra.

No se encontraron desviaciones reseñables en el contenido de leptina en las muestras correspondientes de suero y plasma recogido en EDTA.

6.2 Extracción de sangre/Toma de muestras

La sangre para la recogida de muestras debe extraerse mediante venopunción estándar y esta labor debe correr a cargo de personal cualificado. Deben evitarse las reacciones hemolíticas.

Las muestras de suero o plasma humano deben recogerse por la mañana o a primera hora de la tarde, en un estado nutricional normal.

Las concentraciones de leptina muestran una variación circadiana, registrando un pico máximo en torno a las 2 de la madrugada (37). Así pues, estas fluctuaciones deben tenerse en cuenta junto con la ingesta de alimentos a la hora de tomar muestras de sangre.

6.3 Volumen necesario de la muestra

Una determinación simple requiere un mínimo de 10 µL de muestra, mientras que una determinación doble requiere 20 µL. Para una manipulación segura y apropiada, es necesario un mayor volumen de muestra dependiendo del procedimiento individual.

6.4 Estabilidad de las muestras

Las muestras deben conservarse en recipientes adecuados que tengan un cierre hermético.

Si las muestras van a conservarse durante periodos prolongados, se recomienda una temperatura de conservación de -20 °C o inferior. La conservación de las muestras durante un período de 2 años a -20 °C no reveló ninguna influencia en el valor medido. Conviene reducir al mínimo la congelación y descongelación de las muestras. Los 5 ciclos de congelación-descongelación no afectaron a las muestras.

Temperatura de conservación	Tiempo de conservación
20 – 25 °C	máx. 2 días
2 – 8 °C	máx. 3 días

6.5 Interferencia

La hemoglobina, los triglicéridos y la bilirrubina presentes en la muestra no influyeron en la medición hasta una concentración de **1 mg/mL**, **100 mg/mL** y **200 µg/mL**, respectivamente. El usuario debe comprobar previamente la utilización de muestras hemolíticas, lipémicas o ictéricas.

6.6 Dilución de la muestra

Las muestras deben diluirse en una proporción de 1:10 en el tampón de dilución **DIL**. Si se esperan o alcanzan valores inferiores a 0,5 ng/mL de leptina, la muestra debe y puede ser menos diluida, al menos en una proporción de 1:5. Si se esperan o se alcanzan más de 50 ng/mL, la muestra debe y puede diluirse como corresponda; consulte la tabla 13.

6.6.1 Ejemplo de protocolo de dilución

Para una determinación doble, por ejemplo, se colocan 225 µL de tampón de dilución **DIL** en recipientes de PE/PP, en los que se pipetea 25 µL de suero o plasma (lo que corresponde a una dilución de 1:10). Una vez mezclada, se utilizan en el ensayo 2 x 100 µL de esta solución (100 µL por pocillo).

7 Indicaciones técnicas

7.1 Preparación de los reactivos

Todos los componentes del kit deben estar **a temperatura ambiente** (20 °C–25 °C) **antes de su uso**. Los precipitados que puedan estar presentes en algunos tampones deben disolverse nuevamente mezclándolos y calentándolos antes de utilizarlos. No mezcle reactivos de kits con números de lote diferentes.

7.2 Reconstitución

Los calibradores **A - E**, así como los controles **CTR1** y **CTR2**, se reconstituyen con el tampón de dilución **DIL** incluido en el kit. Los reactivos deben reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos y, después, mezclarse enérgicamente con un agitador vortex, evitando, no obstante, la formación de espuma.

7.3 Dilución

Después de la reconstitución, los controles **CTR1** y **CTR2** se diluyen con el tampón de dilución **DIL** en la misma proporción que las muestras. Los calibradores están listos para su uso tras la reconstitución y no deben diluirse.

El volumen del tampón de lavado **WB** necesario para el ensayo se prepara diluyendo el concentrado 20 veces en una proporción de 1:20 con agua destilada.

7.4 Incubación

Por incubación a temperatura ambiente se entiende: **Incubación a una temperatura de 20 °C a 25 °C**. El sustrato **S**, tetrametilbencidina estabilizada, es sensible a la luz. Por eso, hay que protegerlo de la luz durante el almacenamiento y la incubación.

7.5 Procedimiento

Las mediciones (blanco, calibradores A-E, controles **CTR1** y **CTR2** y muestras) deben realizarse siempre por duplicado. Asegúrese de que el pipeteado sea preciso y de que se respete estrictamente el protocolo de la prueba. Al realizar la prueba, los calibradores **A-E**, los controles **CTR1**, **CTR2** y sus muestras correspondientes deben pipetarse lo más rápidamente posible. El conjugado POD de anticuerpos **DET**, así como el sustrato **S** y la solución de parada STP, deben añadirse posteriormente a la placa en el mismo orden y con el mismo intervalo de tiempo. De esta forma, se evitan variaciones en la determinación de la concentración debidas a diferentes tiempos de incubación.

7.6 Agitación

Las sustancias incubadas deben agitarse a una frecuencia de rotación de **350 rpm** en un agitador adecuado para microplacas. Por su diseño, pueden producirse desviaciones individuales de este valor y, si esto ocurre, es preciso ajustar la frecuencia de rotación. Una agitación insuficiente puede dar lugar a una reducción de las densidades ópticas, a una dispersión elevada y a valores incorrectos debido a una mezcla insuficiente de las soluciones, mientras que una agitación excesiva puede dar lugar a un aumento de las densidades ópticas.

7.7 Lavado

Es fundamental realizar un lavado correcto para que la prueba se desarrolle de forma segura, correcta y precisa. De hecho, un lavado insuficiente suele ser la causa de que los resultados de las pruebas no sean válidos. Las posibles consecuencias son variaciones no específicas no controladas de las densidades ópticas medidas, lo que puede producir cálculos incorrectos de los resultados de las muestras. Los posibles indicios de ello son, por ejemplo, valores en blanco elevados y valores medidos con dispersión variable. En los lavados, debe utilizarse el tampón de lavado suministrado diluido hasta alcanzar la concentración de uso. El volumen de lavado por ciclo de lavado y pocillo debe ser de al menos 300 µL.

Siga siempre las instrucciones de uso correspondientes cuando utilice un **lavador automático de microplacas** especial. Los ajustes del dispositivo deben adaptarse, entre otras cosas, a la geometría

de la microplaca y a los parámetros de la especificación de lavado. Asegúrese de que los capilares de dispensación y aspiración del dispositivo no dañen la superficie de los pocillos de la microplaca. Asimismo, reduzca al mínimo el líquido restante después de cada aspiración. Al final de todo el proceso de lavado, compruebe la cantidad de líquido restante y, si es necesario, redúzcala sacudiendo la microplaca varias veces sobre celulosa no esponjosa.

El **lavado manual** es una buena alternativa. El líquido de lavado se puede dispensar mediante un multipaso, una pipeta multicanal o con un pulverizador. El líquido de lavado puede extraerse girando la microplaca sobre una cubeta. Si utiliza dispositivos de aspiración, tenga cuidado de no dañar las superficies de los pocillos de la microplaca. Después de cada ciclo de lavado individual, elimine el líquido residual por completo sacudiendo la microplaca sobre celulosa no esponjosa.

8 Estabilidad y conservación

8.1 Condiciones de conservación

Una vez recibido, el kit de prueba debe conservarse a una temperatura comprendida entre 2 °C y 8 °C hasta la fecha de caducidad.

8.2 Conservación

Después de la primera apertura, los reactivos se mantienen estables durante 4 semanas. Las tiras no utilizadas de la **placa de prueba** deben conservarse junto con la almohadilla de secado en un recipiente **hermético** dentro de la bolsa con clip resellable a una temperatura comprendida entre 2 °C y 8 °C. Utilice las tiras únicamente en el soporte suministrado. Los **componentes reconstituidos** (calibradores **A - E** y controles **CTR1** y **CTR2**) deben conservarse a -20 °C. Para un uso posterior, descongele a temperatura ambiente máxima y no agite en exceso. Hasta 3 de estos ciclos de congelación-descongelación no mostraron ningún efecto en la prueba. El tampón de lavado **WB** de 1:20 diluido y listo para su uso tiene una caducidad de 4 semanas cuando se conserva a una temperatura comprendida entre 2 °C y 8 °C.

9 Procedimiento - Diagrama de flujo

Preparación de los reactivos			
Preparación del reactivo		Reconstitución	Dilución
CAL A-E	Calibradores	1 mL en cada uno Tampón de dilución DIL	-
CTR1 CTR2	Controles	250 µL en cada uno Tampón de dilución DIL	1:10 en el tampón de dilución DIL
WB	Tampón de lavado Concentrado 20 veces	-	1:20 con agua destilada .
Dilución de la muestra: 1:10 p. ej. 225 µL DIL + 25 µL de muestra			
Atemperere todos los reactivos a temperatura ambiente (20 °C–25 °C) antes de la prueba.			
Procedimiento por duplicado			
Pipeteo	Reactivos	Posición	
100 µL	Tampón de dilución DIL (blanco)	A1/A2	
100 µL	Calibrador CAL A (0,05 ng/mL)	B1/B2	
100 µL	Calibrador CAL B (0,5 ng/mL)	C1/C2	
100 µL	Calibrador CAL C (1,5 ng/mL)	D1/D2	
100 µL	Calibrador CAL D (3,5 ng/mL)	E1/E2	
100 µL	Calibrador CAL E (5 ng/mL)	F1/F2	
100 µL	CTR1 Control 1 (diluido a 1:10)	G1/G2	
100 µL	CTR2 Control 2 (diluido a 1:10)	H1/H2	
100 µL	Muestra (diluida a 1:10)	Pipetee en los pocillos restantes según sea necesario	
Cubra bien los pocillos con una lámina protectora adhesiva.			
Incubación: 1 h a (20 °C–25 °C), 350 rpm			
3x 300 µL	Aspire y lave la placa 3 veces con 300 µL de tampón de lavado (diluido a 1:20) por pocillo.	A cada pocillo	
100 µL	Conjugado POD de anticuerpos DET	A cada pocillo	
Cubra bien los pocillos con una lámina protectora adhesiva.			
Incubación: 30 minutos a (20 °C–25 °C), 350 rpm			
3x 300 µL	Aspire y lave la placa 3 veces con 300 µL de tampón de lavado (diluido a 1:20) por pocillo.	A cada pocillo	
100 µL	Sustrato S	A cada pocillo	
Incubación del sustrato S: 15 minutos en la oscuridad a (20 °C–25 °C)			
100 µL	Solución de parada STP	A cada pocillo	
Medición de la absorción en 30 min a 450 nm (filtro de referencia ≥590 nm).			

10 Control de calidad

A la hora de valorar y evaluar la validez de un ensayo, se aplican los siguientes criterios:

- Para la evaluación del ensayo debe garantizarse que las absorbencias del blanco no superen las 0,25 unidades. En cambio, el calibrador E debe alcanzar absorbencias superiores a 1,0 unidades.
- Las concentraciones medidas de los controles del kit deben estar dentro del intervalo aceptable de aceptación, que se indica en el certificado de lote adjunto al kit de prueba.

De no cumplirse estos criterios, la prueba se considera no válida y debe repetirse.

También deben tenerse en cuenta otros factores:

- Las muestras cuyas absorbencias se encuentren fuera del intervalo de calibración de **CAL A - CAL E** están fuera de la curva de calibración y deben volver a determinarse en una segunda prueba con una dilución ajustada para una determinación fiable.
- Las absorbencias de los calibradores, que también se indican en el certificado de lote, corresponden a datos ejemplares y no deben utilizarse para el cálculo de muestras medidas.

11 Evaluación

11.1 Elaboración de la curva de calibración

Los calibradores suministrados incluyen las siguientes concentraciones de leptina:

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

- a) Determine el **promedio** de la densidad óptica del blanco a partir de las determinaciones duplicadas (pocillo A1/A2).
- b) Reste el valor medio del blanco de los valores medios de la densidad óptica de los calibradores, controles y muestras.
- c) Las concentraciones del calibrador (eje x) se comparan con la densidad óptica medida (eje y).
- d) Calcule la curva de calibración mediante un programa estadístico, pues la curva no suele describirse idealmente mediante una regresión lineal. **Un polinomio de grado superior, ajustes de 4 parámetros o regresión no lineal** son adecuados para la evaluación; en algunos casos, pueden ser apropiados un spline o un ajuste punto a punto.
- e) A partir de la curva de calibración, se obtiene la concentración de leptina de los controles diluidos **CTR1** y **CTR2** o de las muestras diluidas. La **multiplicación** del contenido pertinente de leptina calculado por el **factor de dilución** correspondiente da lugar a la concentración de leptina de las muestras/los controles sin diluir.

11.2 Ejemplo de una curva de calibración típica

Los datos de ejemplo y la curva de calibración de la figura 1 **no** pueden utilizarse para calcular los resultados de la prueba. Debe realizarse una curva de calibración distinta para cada prueba.

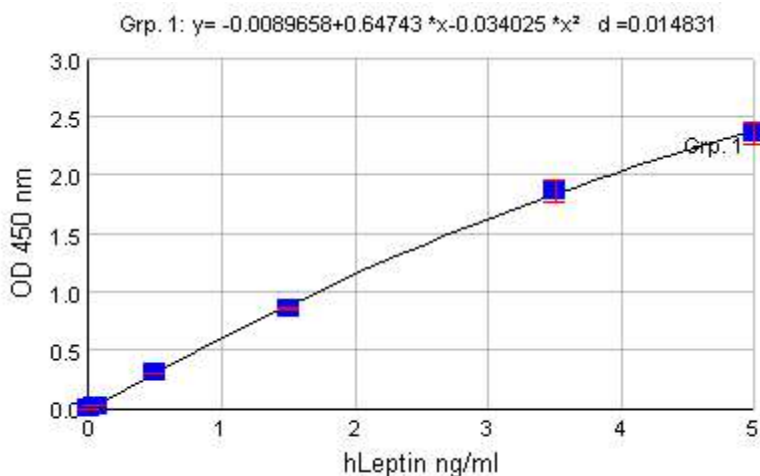


Fig. 1 Curva de calibración ejemplar

11.3 Cálculo ejemplar de la concentración de leptina de una muestra diluida al 1:10

- Absorbencia medida de la muestra: 0,293
- Absorbencia medida del blanco: 0,015

A partir de la diferencia de la absorbencia de la muestra y la absorbencia del valor en blanco (= 0,278), **su programa de evaluación** utiliza el ajuste de curva correspondiente (aquí: polinomio de 2º grado) para calcular la concentración de leptina de la muestra diluida resolviendo la ecuación de la figura 1 para x. En este caso, una concentración de leptina en la muestra diluida de

$$0,278 = -0.0089658 + 0.64743x - 0.034025x^2$$
$$0,4524 = x$$

Teniendo en cuenta el factor de dilución de 1:10, la muestra contiene por tanto 4,4524 ng/mL de leptina.

11.4 Interpretación de los resultados

El resultado de la prueba por sí solo no debe ser la única razón para tomar decisiones terapéuticas. Los resultados deben interpretarse en relación con los antecedentes, otras observaciones clínicas y los resultados de otras pruebas diagnósticas. Además, recomendamos que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia.

11.5 Limitaciones

El Mediagnost Leptin Sensitive ELISA E077 se basa en anticuerpos. En general, esta técnica puede verse influida por la presencia de anticuerpos heterófilos o factores reumatoides en la muestra. Esta influencia se ve reducida por el diseño del ensayo, pero no puede descartarse por completo.

12 Valores de referencia

Las concentraciones séricas de leptina suelen estar estrechamente relacionadas con la masa grasa corporal. Las personas delgadas suelen tener niveles bajos de leptina, mientras que las obesas tienden a tenerlos altos. También existe una clara diferencia de género entre hombres (valores más bajos) y mujeres (valores más altos) para un determinado porcentaje de grasa corporal. La fase puberal también influye en los niveles de leptina. Así pues, es necesario tener en cuenta estos factores para los valores esperados de leptina.

Existen diferentes métodos para determinar el porcentaje de grasa corporal, como el cálculo del índice de masa corporal (IMC, peso (en kg) dividido por el cuadrado de la estatura (en m)), el análisis de la impedancia bioeléctrica (BIA) o la radioabsorciometría de doble energía en todo el cuerpo (DXA). Aunque el IMC es menos preciso que otros métodos más sofisticados, como la BIA o la DXA, a la hora de determinar la masa grasa corporal real, presenta varias ventajas:

- 1) El IMC es independiente de los modelos de regresión utilizados.
- 2) El IMC es fácil de determinar, pues solo hay que indicar la estatura y el peso.
- 3) El IMC suele poder determinarse a posteriori.
- 4) El IMC es la medida más precisa para los cambios a corto plazo en la masa grasa, por ejemplo, durante el ayuno.

Por lo tanto, se establecieron los siguientes intervalos de expectativas para las concentraciones séricas de leptina partiendo del IMC como principal variable independiente limitante, incluyendo el sexo y el desarrollo puberal (14; consulte las figuras 2 a 9 y las tablas 1 a 9 a continuación). En pacientes mayores de 20 años, no se encontró ninguna dependencia reseñable entre los valores y la edad. Los valores previstos indicados, desglosados por sexo y edad, pueden utilizarse para compararlos con los valores de leptina medidos en pacientes normales, para un IMC dado del paciente, con el fin de identificar desviaciones patológicas.

Las mejores regresiones para los distintos grupos de personas (consulte las figuras 2 a 9) se obtienen con la siguiente función exponencial:

$$\text{Leptina} = a \cdot e(b \cdot \text{IMC})$$

Los percentiles 5 y 95 están representados por las siguientes ecuaciones:

$$\text{Leptina} = a \cdot e(b \cdot \text{IMC} - c)$$

o

$$\text{Leptina} = a \cdot e(b \cdot \text{IMC} - c)$$

Con una aplicación semilogarítmica (eje $y = \log$ leptina), estas funciones dan como resultado líneas rectas. Los valores de a , b y c figuran en el cuadro 1 separados por sexo, desarrollo puberal y adultos. Con estos valores, los intervalos esperados para la leptina pueden ampliarse fácilmente a intervalos de IMC superiores o inferiores en caso necesario.

Ejemplo:

El percentil 50 para los chicos en los estadios 3 y 4 de Tanner se refleja en la siguiente curva:

$$\text{Leptina} = 0,0181 \cdot e(0,2067 \cdot \text{IMC})$$

El percentil 5 corresponde a: $\text{Leptina} = 0,0181 \cdot e(0,2067 \cdot \text{IMC} - 1,1919)$

y el percentil 95 corresponde a: $\text{Leptina} = 0,0181 \cdot e(0,2067 \cdot \text{IMC} + 1,1919)$

En un diagrama semilogarítmico, estas funciones corresponden a líneas rectas paralelas con distancias iguales al percentil 50.

12.1 Cálculo de la desviación típica (SA; valores Z)

Un método adecuado para determinar la desviación de una concentración de leptina medida con respecto al intervalo de referencia correspondiente es el cálculo de la desviación estándar. Aquí, el valor de leptina medido se relaciona con el valor de leptina del sexo y del grupo de edad correspondientes para un IMC dado del paciente. La desviación calculada corresponde a x veces la desviación típica. De este modo, los niveles de leptina pueden clasificarse por IMC, sexo y desarrollo puberal/edad y agruparse para su posterior análisis, lo que permite, por ejemplo, eliminar la influencia del IMC, del sexo y de la edad en los análisis posteriores.

Debido a la dependencia logarítmica de los niveles de leptina, la SA de leptina se calcula de la siguiente manera:

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

En esta ecuación, «ln» significa logaritmo natural (referido a la base e). Las constantes a, b y d se indican por separado para el sexo y la edad en la tabla 1.

Ejemplo:

Chico en estadio Tanner 3, IMC = 25 kg/m², concentración de leptina medida = 5 ng/mL:

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

12.2 Estimación de la dilución óptima de la muestra

Como los niveles séricos de leptina varían en diferentes órdenes de magnitud en función de la masa grasa corporal, una dilución adecuada de la muestra es un requisito previo para una medición de gran exactitud. Las muestras deben diluirse de modo que las concentraciones finales se encuentren dentro del intervalo de la curva de calibración. Los intervalos previstos son una ayuda útil para estimar los niveles esperados de leptina en relación con el IMC, el sexo y la edad.

Ejemplo 1

Mujer adulta, IMC = 35 kg/m². El promedio de leptina con un IMC de 35 kg/m² es de unos 50 ng/mL según los intervalos de referencia para mujeres adultas. Por lo tanto, la dilución óptima en este caso sería de 1:20.

Ejemplo 2

Chico prepuberal, IMC = 24 kg/m². El promedio de leptina para los chicos en estadio Tanner 1 y 2 con un IMC de 24 kg/m² es de aproximadamente 10 ng/mL según los intervalos de referencia. Por lo tanto, la dilución óptima en este caso sería de 1:10.

Tabla 1 Constantes a, b, c y d para el cálculo de los rangos de referencia y las desviaciones estándar de la leptina en función del IMC. Se separaron grupos de individuos normales y sanos por sexo y estadio de desarrollo puberal/edad. TS: estadio de Tanner, n: número de personas, a, b, c y d: constantes.

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

Tabla 2 Chicas en estadio Tanner 1 y 2

IMC	Percentil (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,		
33	53,2	73,4			
34	68,4	94,3			
35	87,8	121,0			
36	113,0				
37	145,0				

Tabla 3 Chicos en estadio Tanner 1 y 2

IMC	Percentil (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				

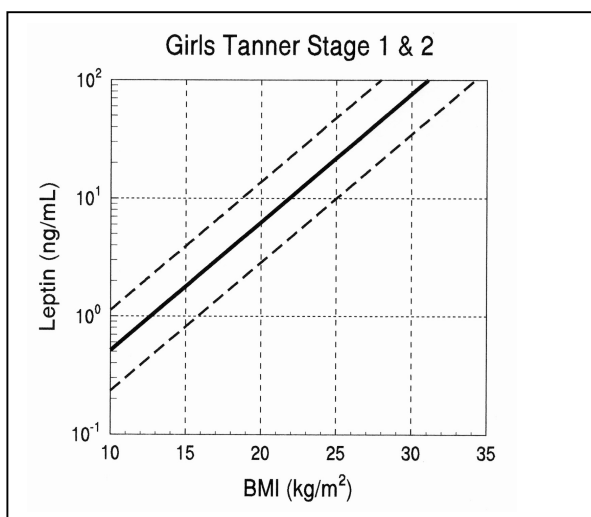


Fig. 2 Intervalos de referencia para las concentraciones séricas humanas relacionadas con el IMC: Chicas en estadio Tanner 1 + 2 (ver texto).

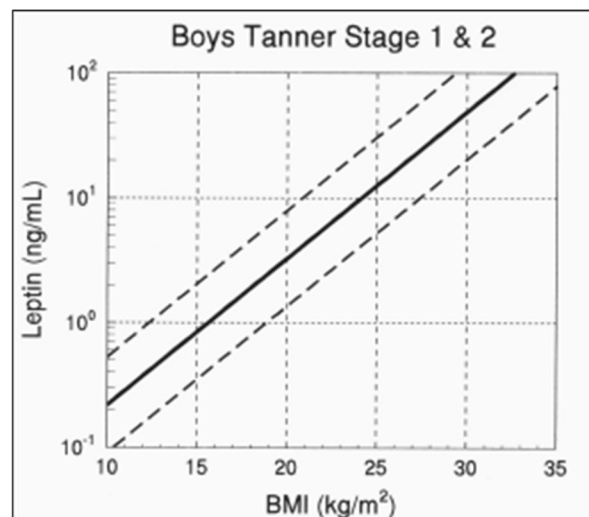


Fig. 3 Intervalos de referencia para las concentraciones séricas humanas relacionadas con el IMC: Chicos en estadio Tanner 1 + 2 (ver texto).

Tabla 4 Chicas en estadio Tanner 3 y 4

IMC (kg/m ²)	Percentil (µg/L)				
	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				

Tabla 5 Chicos en estadio Tanner 3 y 4

IMC (kg/m ²)	Percentil (µg/L)				
	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		

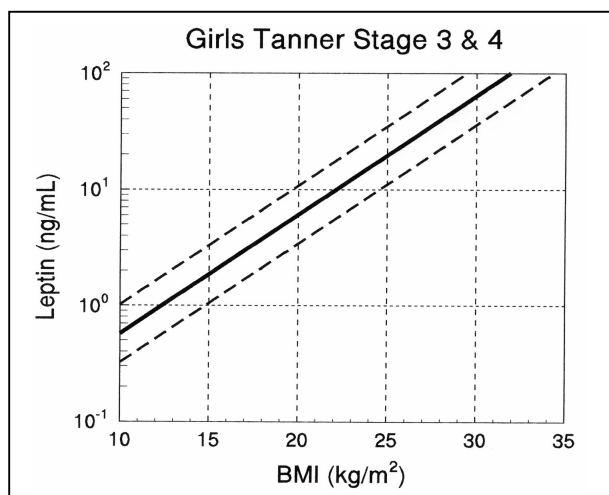


Fig. 4 Intervalos de referencia para las concentraciones séricas humanas relacionadas con el IMC: Chicas en estadio Tanner 3 + 4 (ver texto).

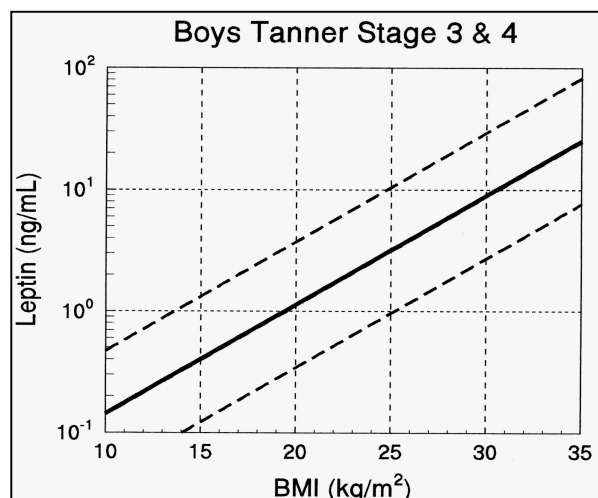


Fig. 5 Intervalos de referencia para las concentraciones séricas humanas relacionadas con el IMC: Chicos en estadio Tanner 3 + 4 (ver texto).

Tabla 6 Chicas en estadio Tanner 5

IMC (kg/m ²)	Percentil (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		

Tabla 7 Chicos en estadio Tanner 5

IMC (kg/m ²)	Percentil (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

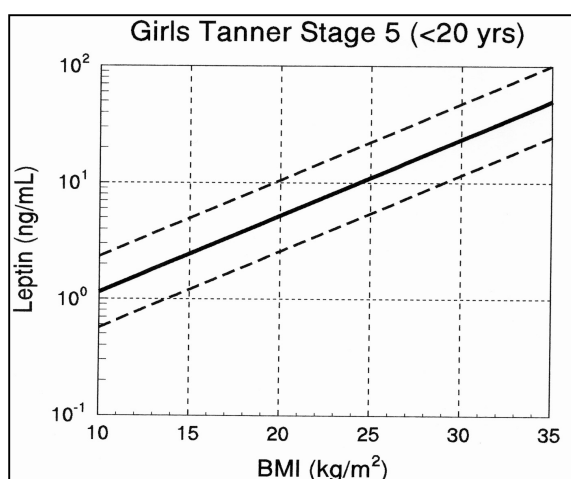


Fig. 6 Intervalos de referencia para las concentraciones séricas humanas relacionadas con el IMC: Chicas en estadio Tanner 5 (ver texto).

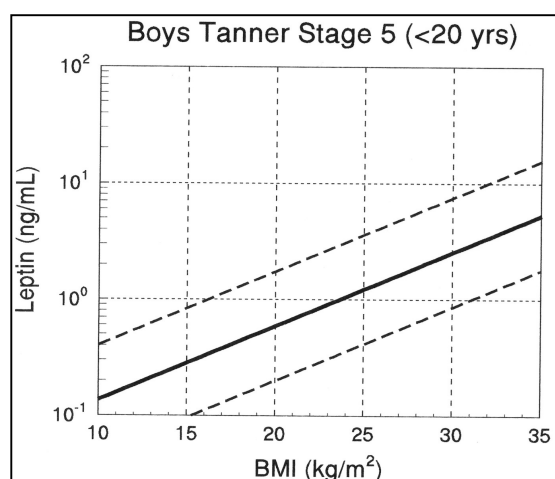


Fig. 7 Intervalos de referencia para las concentraciones séricas humanas relacionadas con el IMC: Chicos en estadio Tanner 5 (ver texto).

Tabla 8 Mujeres

IMC (kg/m ²)	Percentil (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		

Tabla 9 Hombres

IMC (kg/m ²)	Percentil (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		

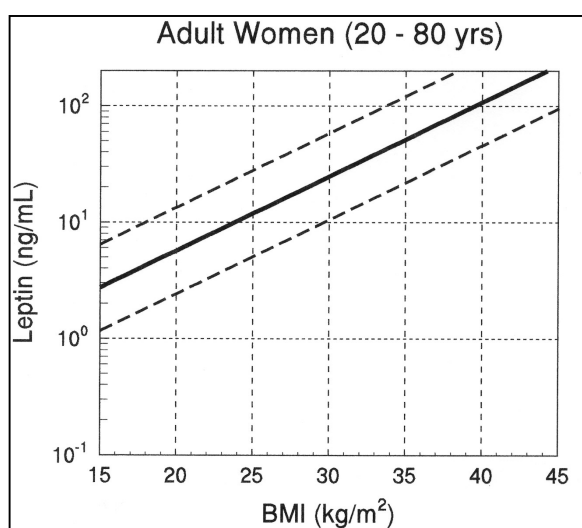


Fig. 8 Intervalos de referencia para las concentraciones séricas humanas relacionadas con el IMC: Mujeres (véase el texto).

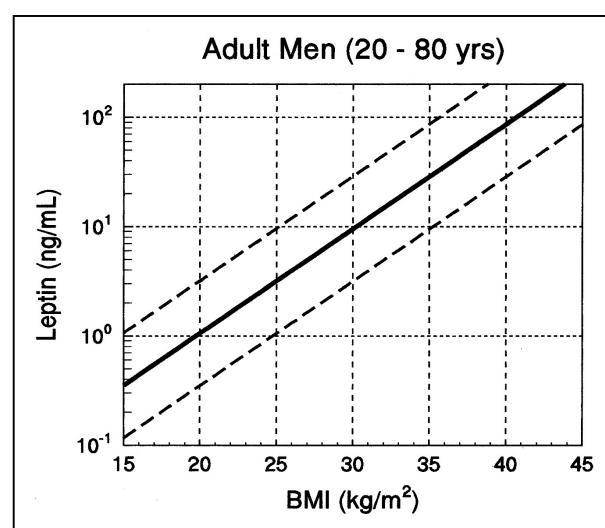


Fig. 9 Intervalos de referencia para las concentraciones séricas humanas relacionadas con el IMC: Hombres (ver texto).

13 Propiedades del ensayo y validación

13.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del ELISA Leptina Sensible E077 es de 0,01 ng/mL (blanco más dos desviaciones estándar del blanco).

13.2 Recuperación y precisión

Se añadió leptina recombinante (OMS/NIBSC IS 97/594; 15, 16) al tampón de dilución **DIL** y a las muestras de suero. Se midió el contenido en leptina de las muestras enriquecidas de este modo y se calculó la recuperación relativa. Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10 Recuperación relativa de la leptina OMS/NIBSC 97/594 en muestras de suero [%]

Leptina añadida [ng/mL]	5	10	15
Muestra 1	109	108	108
Muestra 2	108	104	109
Muestra 3	105	102	85

13.3 Precisión

Los coeficientes de variabilidad intraanalítica e interanalítica son muy inferiores al 10 %. En las tablas 11 y 12 figuran ejemplos de disposiciones.

Tabla 11 Variabilidad interanalítica

	Promedio [ng/mL]	Desviación estándar [ng/mL]	CV [%]
Muestra 1	2,04	0,147	7,2
Muestra 2	6,93	0,423	6,1
Muestra 3	14,86	1,11	7,5

Tabla 12 Variabilidad intraanalítica

	Promedio [ng/mL]	Desviación estándar [ng/mL]	CV [%]
Muestra 1	22,44	1,28	4,35
Muestra 2	4,1	0,108	2,63

13.4 Linealidad

Se analizaron diluciones de 1:5 a 1:320 con cuatro muestras de suero, y los niveles medidos de leptina se muestran en la tabla 13.

Tabla 13 Diluciones de muestras de suero de 1:5 a 1:320

Dilución	Muestra A [ng/mL]	Muestra B [ng/mL]	Muestra C [ng/mL]	Muestra 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 Interferencia

La interferencia de la hemoglobina, la bilirrubina y los triglicéridos en la determinación de la leptina se analizó añadiendo diferentes cantidades de estas sustancias a muestras de suero humano. Las lecturas de la tabla 14 muestran que ni la bilirrubina ni los triglicéridos ni la hemoglobina a las concentraciones máximas indicadas tuvieron efecto alguno sobre la medición de la leptina en el suero humano.

Tabla 14 Interferencias. La cantidad relativa de leptina medida en comparación del suero enriquecido con el suero nativo se muestra aquí [%]

	Triglicéridos 100 mg/mL	Bilirrubina 200 µg/mL	Hemoglobina 1 mg/mL
Muestra 1	95	101	94
Muestra 2	107	105	105
Muestra 3	111	101	101

14 Bibliografía

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>