Leptin ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von

humanem Leptin

Deutsch

Enzyme Immunoassay for Quantitative Determination of

human Leptin

English

Europäische Union / European Union:
für In-vitro-Diagnostik / For In Vitro Diagnostic Use
IVD zum Gebrauch durch Fachpersonal! / IVD for professional use!

Alle anderen Länder / All other countries:
Nur für Forschungszwecke. Nicht für diagnostische Anwendungen geeignet.
For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

CE IVD +2 +8 °C Σ 96 wells

REF **E07**

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version-nicht für Assaydurchführung verwenden

mediagnost®
Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH

: Aspenhaustr. 25 • D-72770 Reutlingen / Germany
Telefon: + 49 - (0) 7121 51484-0 • Fax: + 49 - (0) 7121 51484-10
E-Mail: contact@mediagnost.de • http://www.mediagnost.de

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

Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ Symbolen/ Symboler/ Symboler/ Symbole/ Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ Символи/ Sümbolid/ 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 exspirácie/ Doba exspirace/ Срок на годност/ Aegumiskuupäev/ 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/ Vă rugăm să respectaţi instrucţiunile de utilizare/ Upoštevajte 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 használathoz)/ In vitro diagnostický zdravotnícky materiál (určené na diagnostiku „in vitro“)/ 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-Partijnumme/ Lot-Batchkode/ 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/ Tootja/ 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/ Armazenar entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilitada 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/ Indeholder 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/ Conţinut suficient pentru x teste/ Vsebina zadostuje za x preizkusov/ Sisältö riittää x testille
	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 vórtex/ 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/ Premiešať pomocou prístroja Vortex/ Promíchat pomocí přístroje Vortex/ Разбъркване на епруветките с миксер Vortex/ Segada torukesi Vortexi mikseriga/ Αναμίξτε τους σωληνίσκους με αναδευτήρα Vortex/ Amestecaţi eprubetele cu ajutorul unui agitator vortex/ Mešanje cevčic z mešalnikom Vortex/ Sekoita putket Vortex sekoittajalla
MTP	Miktrotiterplate/ Mikrotiterplatte/ plaque de microtitrage/ Piastra di microtitolazione/ Placa de microtitulación/ Placa de Microtitulação/ Microtiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ microtiterplaat/ Płytka microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiiterplaat/ Τρυβλίο μικροτιτλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrska plošča/ Mikrotitrauslevy
Rec in	Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituir en/ Reconstituir em/ Reconstitueren in/ Rekonstituér i/ Rekonstituera/ Rekonstytuować w/ Helyreállítás/ Znovu pripraviť za/ Znovu připravit za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti/ Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ Rekonstituoi

Exemplary Version of Instructions for Use / Exemplarische Version der Gebrauchsanweisung

SPE	Sample/ Probe/ Echantillon/ Campione/ Muestra/ Amostra/ Monster/ Prøve/ prov/ Próbka/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probă/ Vzorec/ Näyte
DET	Antibody and Enzyme Conjugate/ Antikörper- und Enzymkonjugat/ anticorps conjuguée et conjugué enzymatique/ Coniugato di anticorpo ed enzima/ Conjugado de anticuerpos y enzimas/ Conjugado Anticorpo-Enzima/ antilichaam- en enzymconjugaat/ Antistoffer og enzym-konjugat/ antikropps- och enzymkonjugat (antikropp och enzym, konjugat)/ Koniugat antyciał i enzymów/ Antitest és enzim páros/ Protilátkový a enzymatický konjugát/ Protilátkový a enzymatický konjugát/ Антитяло и ензим конюгат/ Antikehad ja ensüümi konjugaat/ Σύμπλοκο αντισώματος-ενζύμου/ Compuşi din anticorpi şi enzime/ Antitelesa in konjugat encima/ Vasta-aine ja entsymi konjugaatti
DIL	Dilution Buffer/ Verdünnungspuffer/ Tampon de dilution/ Tampone di diluizione/ Tampón de dilución/ / Tampão de diluição / Verdunningsbuffer/ / Fortyndingsbuffer/ Utspädningsbuffert / Bufor rozcieńczający/ / Hígító puffer/ Riediaci pufor/ Ředicí pufr / Буфер за разреждане/ Lahjenduspuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης / Tampon de diluare/ Pufer za redčenje/ Laimennuspuskuri
X:X	Dilute / Verdünnen / Diluer / Diluire / Diluir / Diluir / Verdunnen / Fortyndes / Späd / Rozcieńczanie / Hígítás / Riedit / Ředit / Разреждане / Lahjendada / Αραιώστε / Diluaţi / Razredčiti / Laimennetaan
CAL A-E	Calibrator X/ Kalibrator X/ calibrateur X/ calibratore X/ calibrador X/ calibrador X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrátor X/ kalibrátor X/ kalibrátor X/ калибратор X/ kalibraator X/ Βαθμονομητής X/ calibrator X/ kalibrator X/ kalibraattori X
CTR1 / CTR2	Control X/ Kontrolle X/ Contôle X/ controllo X/ control X/ Controle X/ controle X/ Kontrol X/ Kontroll X/ kontrolne X/ Ellenőrző X/ Kontrolné X/ Kontrolní X/ Контролен X/ Kontroll X/ ελέγχου X/ control X/ Kontrolni X/ Kontrolli X
WB	Washing Buffer Concentrate/ Waschpufferkonzentrat/ Tampon de lavage conc./ Tampone di lavaggio concentrato/ Tampón de lavado concentrado/ Tampão de Lavagem Concentrado/ wasbuffer, geconcentreerd/ Vaskebufferkoncentrat/ Vaskebufferkoncentrat/ tvättbuffertkoncentrat/ Bufor płukania koncentrat/ Mosópuffer koncentrátum/ Koncentrát vymývacieho pufra/ Концентрат на промивен буфер/ Pesupuhvri kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralnega pufra/ Pesuliuositiiviste
WB 1:20	Washing Buffer/ Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor płukania/ Mosópuffer/ Vymývací pufer/ Vymývací pufr/ Промивен буфер/ Pesupuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare /Izpiralni pufer/ Pesuliuos
S	Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Szubsztrátum/ Substrát/ Substrát/ Субстрат Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraattiliuos
STP	Stop Solution/ Stopplösung/ Stop Solution/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ stopoplossing/ Stopopløsning/ Stopplösning/ Stop roztwór/ Megállító oldat/ Roztok na ukončenie/ Roztok pro ukončení/ Стопиращ разтвор/ Stopp-lahus/ Διάλυμα διακοπής/ Soluţie de oprire/ Stop raztopina/ Pysäytysliuos
TAPE	Cover Plate with sealing tape/ Platte abkleben/ Recouvrir la microplaque avec bande adhésive/ Coprire la piastra con nastro adesivo/ Cubrir la placa con una cinta adhesiva/ Cobrir a Placa com fita adesiva/ plaatje met tape afdekken/ Afdækningsplade med tape/ maskera platta/ Odkleić płytkę/ Tányér leragasztása/ Oblepiť podložku lepiacou páskou/ Olepit podložku lepicí páskou/ Плака с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerkleeplindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperiţi placa cu o bandă adezivă/ Prelepiti ploščo/ Peitä mikrotitrauslevy oheisella teipillä
MEASURE	Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590 nm)/ Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)/ Mesure lábsorbance en léspace de 30 min à 450 nm avec ≥590 nm longueur dónde pour référence/ Misurazione entro 30 min. a 450 nm (filtro di riferimento ≥ 590 nm)/ Medición de la placa dentro de los siguientes 30 min a 450 nm (filtro de referencia ≥ 590nm)/ Medir a placa dentro de 30 min a 450 nm (Filtro de referência ≥ 590 nm)/ Binnen 30 minuten bij 450 nm meten (referentiefilter ≥ 590 nm)./ Mål plade i løbet af 30 min ved nm (referencefilter ≥590 nm)/ Mät inom 30 min vid 450 nm (referensfilter ≥ 590 nm)./ Pomiar w ciągu 30 min przy 450 nm (filtr odniesienia ≥ 590 nm)/ Ki mérés 30 percen belül 450 nm-nél (referenciaszűrő ≥ 590 nm)/ Merať 30 minút pri 450 nm (Referenčných filtrov ≥590 nm)/ Měřit 30 minut při 450 nm (Referenční filtr ≥ 590 nm)/ Отчитане в рамките на 30 min при 450 nm (референтен филтър ≥ 590 nm)/ Mõõtmine 30 min jooksul 450 nm korral (võrdlusfilter ≥ 590 nm)/ Μέτρηση εντός 30 min στα 450 nm (φίλτρο αναφοράς ≥ 590 nm)/ Măsurare în decurs de 30 min la 450 nm (filtru de referinţă ≥ 590 nm)/ Izmerite ploščico v 30 min pri 450 nm (referenčni filter ≥590nm)/ Mittaa 30 minuutin aikana 450 nm:ssä (referenssi suodatin ≥ 590 nm)
Literature	Literature/ Literatur/ Bibliographie/ Letterario/ Bibliografía/ Literatura documentação/ literatuur/ Litteratur/ litteratur/ Literatura/ Irodalom/ Literatúra/ Literatura/ Литература// Kirjandus/ Βιβλιογραφία/ Bibliografie/ literatura/ Lähdeluettelo
International Test Description	International test description/ internationale Testanleitung/ description internationale de test/ Istruzioni per il test internazionali/ Descripción de ensayo internacional/ Descrição internacional do teste/ internationale testbeschrijving/ internationell testbeskrivning/ Opis testu międzynarodowego/ nemzetközi teszt-útmutató/ Medzinárodný návod k testu/ Mezinárodní návod k testu/ rahvusvaheline katse kirjeldus/ Διεθνείς οδηγίες για εργαστηριακές δοκιμές/ instrucţiuni internaţionale pentru testare/ mednarodna navodila za preizkus/ Kansainvälinen käyttöohje
End	in all required wells/ in allen benötigten Vertiefungen/ dans tous les godets requis/ in tutti i pozzetti richiesti/ en todos los pozos requeridos/ em todos os tubos necessários/ in alle nodige putjes/ i alle nødvendige brønde/ i alla nödvändiga brunnar/ we wszystkich potrzebnych wgłębieniach/ minden szükséges forrásban/ vo všetkých potrebných miestach/ ve všech potřebných místech/ във всички необходими ямки/ kõigis vajalikes süvendites/ σε όλες τις απαραίτητες κοιλότητες/ în toate cavităţile necesare/ v vseh zahtevanih vdolbinah/ kaikkiin tarvittaviin mikrotitrauslevyn syvennyyksiin

Exemplary version do not use for analysis / Exemplarische Version nicht für Analysenzwecke verwendet

INHALTSVERZEICHNIS / TABLE OF CONTENTS

DEUTSCH - GEBRAUCHSANWEISUNG 5
1 ZWECKBESTIMMUNG 5
2 EINFÜHRUNG 5
3 TESTPRINZIP 7
4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN 8
5 PROBEN 9
6 MATERIALIEN 10
7 TECHNISCHE HINWEISE 11
8 TESTDURCHFÜHRUNG 12
9 QUALITÄTSKONTROLLE 13
10 AUSWERTUNG 13
11 REFERENZWERTE 15
12 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG 22
13 VERGLEICHSSTUDIEN 24
14 WISSENSCHAFTLICHE ANWENDUNGEN 25

ENGLISH - INSTRUCTIONS FOR USE 27
1 INTENDED USE 27
2 INTRODUCTION 27
3 ASSAY PRINCIPLE 29
4 WARNINGS AND PRECAUTIONS 30
5 SAMPLES 31
6 MATERIALS 32
7 TECHNICAL NOTES 33
8 ASSAY PROCEDURE 34
9 QUALITY CONTROL 35
10 EVALUATION OF RESULTS 35
11 REFERENCE VALUES 37
12 PERFORMANCE CHARACTERISTICS 43
13 COMPARISON STUDIES 45
14 SCIENTIFIC APPLICATION 46
15 LITERATUR / REFERENCES 47
16 FRENCH: RÉSUMÉ DU DOSAGE LEPTIN ELISA E07 49
17 ITALIAN: RIASSUNTO DELLA PROCEDURA LEPTIN ELISA E07 50
18 INTERNATIONALE ASSAY DESCRIPTION 51
19 ASSAY PROCEDURE 52

Exemplarische Version - nicht für Assaydurchführung verwenden / Exemplary Version - do not use for assay accomplishment

DEUTSCH - Gebrauchsanweisung

Leptin ELISA E07	96 Bestimmungen
CE	DE/CA40/00809/17
Testprinzip	Enzyme-linked Immunoassay
Dauer (Inkubationszeit)	1,75 h
Antikörper	Monoklonale Antikörper
Puffer	Gebrauchsfertig und 20fach Konzentrat
Kalibratoren	5 Einzelkalibratoren: 1 - 100 µg/L, rekombinantes humanes Leptin
Referenzmaterial	internationaler Standard WHO/NIBSC 97/594 rekombinantes Leptin
Assay-Bereich	0,25 – 100 µg/L
Kontrolle	2 Kontrollen, gefriergetrocknet
Proben	humanes Serum / Plasma
Erforderliches Probenvolumen	20 µL Einfachbestimmung / 40 µL Doppelbestimmung
Probenverdünnung	unverdünnt
Analytische Sensitivität	ø ≤ 0,25 µg/L
Intra- / Interassay Varianz	ø < 15%
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

Interpretive version and use for assay accomplishment/ Exemplarische Version -nicht für Assaydurchführung verwenden

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. Seine Aminosäurensequenz 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.

Eines der vielen Leptin Bindungsproteine stellt eine zirkulierende Form des Leptin-Rezeptors dar (15). Neben seinem Einfluss auf den Energiestoffwechsel besitzt Leptin auch einen starken Einfluss auf eine Anzahl anderer 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 Leptinmangel 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 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 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 an der Gesamtmasse (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 ß3-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 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 Impedanz-Schätzung, BIA). Es besteht auch eine Altersabhängigkeit (38) und Geschlechts-abhängigkeit (39,40) der Leptinwerte. 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 Leptinproduktion verknüpfen.

Mit diesem Immunoassay Kit kann humanes Leptin in Serum oder Plasma sowie in Kultur-Medien von Fettzellen für wissenschaftliche und diagnostische Zwecke bestimmt werden.

Auch für die Messung von Leptin in anorektischen oder kachektischen Patienten, Kindern oder in anderen Körperflüssigkeiten als Serum (z.B. Urin, Liquor) bzw. bestimmten Zellkultur-Medien ist der Testkit geeignet. Sofern ein normaler Essrhythmus vorliegt, reicht die Einzel-Messung einer Blutprobe, die morgens oder am frühen Nachmittag gewonnen wurde, 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 Leptinresistenz geben.

Exemplary version - do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version - nicht für Assayausführung verwenden

3 TESTPRINZIP

Der Mediagnost ELISA für Leptin E07 ist ein sogenannter Sandwich-Assay unter Verwendung zweier spezifischer und hochaffiner 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. Dieser ist biotinyliert und liegt als Mischung mit einem Streptavidin-Peroxidase-Enzymkonjugat vor. In der anschließenden Substratreaktion führt eine spezifische enzymatische Reaktion zu einem Farbumschlag. Die Intensität der daraus resultierenden Färbung ist proportional zum Leptin-Gehalt der Proben.

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version -nicht für Assaydurchführung verwenden

4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Mediagnost Kit ist nur zur In-vitro-Diagnostik und nicht zur inneren Anwendung bei Menschen 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. Ein Sicherheitsdatenblatt ist auf Anforderung verfügbar.

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

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: **Kontrollen CTR1 und CTR2**
Das humane Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, wurde mit negativem Ergebnis auf Humanen Immundefiziens-Virus (HIV I und II), Hepatitis B-Oberflächenantigen und Hepatitis C Virus getestet. Da kein Test das Vorhandensein von infektiösen Erregern völlig ausschließen kann, sollten die Reagenzien wie potentiell infektiöses Material gehandhabt werden.

Reagenzien CAL A-E, DET, DIL, WB
enthalten als Konservierungsmittel eine Mischung aus **5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one und 2-methyl-4-isothiazolin-3-one** (<0,015%)

H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
P272	Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
P261	Einatmen von Dampf vermeiden.
P333+P313	Bei Hautreizung oder –ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P302+P352	BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.
P501	Entsorgung des Inhalts /des Behälters gemäß den örtlichen / regionalen / nationalen / internationalen Vorschriften.

Substrat S
Das TMB-Substrat (S) enthält 3,3´,5,5´ Tetramethylbenzidin (≤0.05%)

H315	Verursacht Hautreizungen.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H335	Kann Atemwege reizen.
P261	Einatmen von Staub/ Rauch/ Gas/ Nebel/ Dampf/ Aerosol vermeiden.
P305+P351+ P338	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

Stopplösung STP
Die Stopplösung enthält 0,2 M Schwefelsäure (H_2SO_4)

H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
H314	Verursacht schwere Verätzung der Haut und schwere Augenschäden.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
P301+P330+	BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen.
P331	KEIN Erbrechen herbeiführen.
P305+P351+ P338	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
P309+P310	BEI Exposition oder Unwohlsein: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

4.1 Erste-Hilfe Maßnahmen:

Nach Hautkontakt: Nach Berührung mit der Haut mindestens 15 Minuten lang mit genügend Wasser abwaschen. Kontaminierte Kleidung und Schuhe wechseln.
Nach Augenkontakt: Nach Berührung mit den Augen mindestens 15 Minuten lang 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.

Exemplary Version only for assay accompaniment / Exemplarische Version nicht für Assaydurchführung verwenden

5 PROBEN

5.1 Probenmaterial

Serum und Plasma

Neben Serum kann auch EDTA- oder Heparinplasma als Probe eingesetzt werden, da in fünf korrespondierenden Serum- und Plasmaproben keine Abweichung von >30 % gefunden wurde. Auch Citratplasma kann als Probe eingesetzt werden, hier wurden in zwei Proben im Vergleich zum Serum Abweichungen von 19 bzw. 7 % detektiert.

5.2 Probenentnahme

Das Blut zur Probengewinnung mittels standardmäßiger Venenpunktion entnehmen.
Hämolytische Reaktionen sind zu vermeiden.

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

5.3 Erforderliches Probenvolumen: 20 bzw. 40 µL Einfach-/ Doppelbestimmung

5.4 Probenstabilität

In fest verschließbaren, geeigneten Probengefäßen

- Lagerung bei 20-25°C 2 Tage
- Lagerung bei -20°C mind. 2 Jahre
- Gefrier-Auftau-Zyklen max. 5

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.

5.5 Interferenz

Hämoglobin, Triglyceride und Bilirubin in der Probe stören nicht bis zu einer Konzentration von **1 mg/mL, 100 mg/mL** bzw. **100 µg/mL**. Der Einsatz hämolytischer, lipämischer oder ikterischer Proben sollte trotzdem zuvor vom Anwender validiert werden.

5.6 Probenverdünnung

Die Proben müssen nicht vorbehandelt werden, sondern können unverdünnt (20 µL) im Test eingesetzt werden.

Exemplary Version - do not use for assay establishment / Exemplarische Version - nicht für Assaydurchführung verwenden

6 MATERIALIEN

6.1 Inhalt der Testpackung

Die im Kit gelieferten Reagenzien sind ausreichend für 96 Tests einschließlich der Kalibrationskurve.

MTP	**Mikrotiterplatte,** gebrauchsfertig, beschichtet mit Maus-anti-humanLeptin-Antikörper. Die Vertiefungen sind einzeln abbrechbar.	**(8x12) Vertiefungen**
CAL A-E	**Kalibratoren,** lyophilisiert (rekombinantes hLeptin), die Konzentrationen sind auf den Etiketten und auf dem Qualitätszertifikat in ng/mL angegeben.	**5 x 750 µL**
CTR1	**Kontrolle 1**, lyophilisiert, (humanes Serum), die Konzentration ist auf dem Qualitätszertifikat in ng/mL angegeben.	**1 x 500 µL**
CTR2	**Kontrolle 2**, lyophilisiert, (humanes Serum), die Konzentration ist auf dem Qualitätszertifikat in ng/mL angegeben.	**1 x 500 µL**
DET	**Antikörper-POD-Konjugat**, gebrauchsfertig, Maus-anti-hLeptin-Antikörper biotinyliert + Streptavidin Peroxidase-Konjugat.	**1 x 12 mL**
DIL	**Verdünnungspuffer**, gebrauchsfertig	**1 x 25 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**
-	**Abdeckfolie** für die **Mikrotiterplatte**	**2 x**
	Packungsbeilage	**1 x**
-	**Qualitätszertifikat**	**1 x**

6.2 Nicht mitgelieferte, benötigte Materialien

- Entmineralisiertes Wasser oder destilliertes Wasser (Aqua destillata) **(A. dest.),** 950 mL.
- Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen
- Vortex-Mixer
- Mikrotiterplattenschüttler (350 rpm)
- Mikrotiterplattenwasher (empfohlen)
- Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und ≥ 590 nm.

Exemplary Version - do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version - nicht für Assaydurchführung verwenden

7 TECHNISCHE HINWEISE

Lagerbedingungen
Nach Erhalt sollte der Test-Kit bei 2 - 8°C (rekonstituierte Reagenzien bei -20°C) bis zum Verfallsdatum gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Haltbarkeit
Die Haltbarkeit der Reagenzien **nach Öffnung** 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**) sollten bei -20°C aufbewahrt werden. Zur weiteren Verwendung schnell aber schonend Auftauen (keine Temperaturerhöhung über Raumtemperatur und kein übermäßiges Vortexen), bis zu 3 dieser Einfrier-Auftauzyklen zeigten keinen Einfluss auf den Test. Der 1:20 gebrauchsfertig verdünnte Waschpuffer **WB** ist nur 4 Wochen haltbar.

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 sollten nicht vermischt werden.

Rekonstitution
Die Kalibratoren **A – E** und Kontrollseren **CTR1 und CTR2** werden mit dem im Kit enthaltenen Verdünnungspuffer **DIL** rekonstituiert. Es empfiehlt sich zum Rekonstituieren die Reagenzien 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen zu lassen und sie anschließend kräftig mit einem Vortex-Mixer zu mischen. Schaumbildung sollte jedoch vermieden werden.

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

Inkubation
Inkubation bei Raumtemperatur bedeutet: **Inkubation bei 20 - 25°C**. Das Substrat **S**, stabilisiertes Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich–Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

Testdurchführung
Die Messungen (Leerwert, Kalibratoren **A-E**, Kontrollen **CTR1 und CTR2** und Proben) sollten stets in Doppelbestimmung durchgeführt werden. Um optimale Ergebnisse zu erhalten, ist auf genaues Pipettieren und strikte Befolgung des Testprotokolls zu achten. Bei der Testdurchführung sollten Kalibratoren **A-E**, Kontrollen **CTR1, CTR2** und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden (z.B. in 15 Minuten). Das Antikörper-POD-Konjugat **DET** sowie nachfolgend das Substrat **S** und die Stopplösung **STP** sollten in der gleichen Reihenfolge und in dem gleichen Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

Schütteln
Die Inkubationen sollen geschüttelt bei mittlerer Umdrehungsfrequenz eines für Mikrotiterplatten geeigneten Schüttlers erfolgen. Wir empfehlen **200 bis max. 350 rpm.** 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 und/oder falschen Werten.

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 Mikrotiterplattenwashers** 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 fusselndem 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 schwungvolles 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 fusselndem Zellstoff gründlich entfernt werden.

Exemplary Version not for use for assay accomplishment - Exemplarische Version -nicht für Assaydurchführung verwenden

8 TESTDURCHFÜHRUNG

Vorbereitung der Reagenzien

Reagenzpräparation:		**Rekonstitution:**	**Verdünnung:**
CAL A-E	**Kalibratoren**	in je **750 µL** Verdünnungspuffer **DIL**	-
CTR1 / CTR2	**Kontrollen**	in je **500 µL** Verdünnungspuffer **DIL**	-
WB	**Waschpuffer** 20fach konz.	-	**1:20** mit **Aqua dest.** ➔ **WB 1:20**
Probenverdünnung ist i.Allg. nicht notwendig, einfach **20 µl pro Bestimmung** einsetzen			
Vor der Testdurchführung alle **Reagenzien** auf **Raumtemperatur (20-25°C)** bringen.			

Testdurchführung in Doppelbestimmung:		
Pipettieren	**Reagenzien**	**Position**
100 µL	Verdünnungspuffer **DIL**	in alle **benötigten Vertiefungen** pipettieren
20 µL	Verdünnungspuffer **DIL** (Leerwert)	A1/A2
20 µL	Kalibrator **A** (**1 ng/mL**)	B1/B2
20 µL	Kalibrator **B** (**10 ng/mL**)	C1/C2
20 µL	Kalibrator **C** (**25 ng/mL**)	D1/D2
20 µL	Kalibrator **D** (**50 ng/mL**)	E1/E2
20 µL	Kalibrator **E** (**100 ng/mL**)	F1/F2
20 µL	Kontrolle **CTR1** (unverdünnt)	G1/G2
20 µL	Kontrolle **CTR2** (unverdünnt)	H1/H2
20 µL	Probe (unverdünnt)	in die restlichen Vertiefungen nach Bedarf pipettieren
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		
Proben-Inkubation: 1 h bei (20-25°C), 200 - 350 rpm		
5x 300 µL	Absaugen und die Platte **5x** mit je **300 µL** Waschpuffer **WB 1:20**/ Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µL	Antikörper-POD-Konjugat **DET**	In jede Vertiefung
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		
Inkubation: 30 Minuten bei (20-25°C), 200 - 350 rpm		
5x 300 µL	Absaugen und die Platte **5x** mit je **300 µL** Waschpuffer **WB 1:20**/ 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).		

Exemplarische Version - nicht für Assay accomplishment / Exemplarische Version - nicht für Assay

9 QUALITÄTSKONTROLLE

GLP erfordert, dass mit jeder Kalibrationskurve Kontrollen mitgeführt werden. Um eine ordnungsgemäße Durchführung zu gewährleisten, sollte eine statistisch signifikante Anzahl der Kontrollen untersucht werden, um Mittelwerte und Akzeptanzbereiche zu ermitteln. Die Analytkonzentration der Kit-Kontrolle muss innerhalb des zulässigen Bereichs, der auf dem QC-Zertifikat angegeben ist, liegen. Wenn die Kriterien nicht erfüllt sind, ist der Test ungültig und sollte wiederholt werden.

9.1 Qualitätskriterien

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. Proben, die höhere Extinktionen als der Kalibrator E erzielen, liegen außerhalb der Kalibrationskurve, zur sicheren Bestimmung sollten diese Proben in einer zweiten Testdurchführung verdünnt nochmals bestimmt werden.

10 AUSWERTUNG

10.1 Erstellung der Kalibrationskurve

Die bereitgestellten Kalibratoren enthalten folgende Leptinkonzentrationen:

Kalibrator	A	B	C	D	E
ng/mL	1	10	25	50	100

1) Ermittlung des **Mittelwertes** der optischen Dichte des Leerwertes aus den Doppelbestimmungen (Vertiefung A1/A2).

2) Von den Mittelwerten der optischen Dichte der Kalibratoren, Kontrollen und der Proben wird der mittlere Leerwert abgezogen.

3) Die Kalibratorkonzentrationen (x-Achse) werden gegen die gemessene optische Dichte (y-Achse) aufgetragen.

4) 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.

5) Aus der Kalibrationskurve erhält man die Leptinkonzentration der Kontrollen CTR1 und CTR2 bzw. der Proben. Die Konzentration wird von Ihrem Auswerteprogramm automatisch berechnet.

Exemplary Version - do not use for assay accomplishment / Exemplarische Vers -nicht für Assaydurchführung verwenden

10.2 Beispiel einer typischen Kalibrationskurve

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

	Leerwert	A	B	C	D	E
ng/mL	0,0	1	10	25	50	100
OD (450-620 nm)	0,04	0,083	0,680	1,449	2,165	2,764

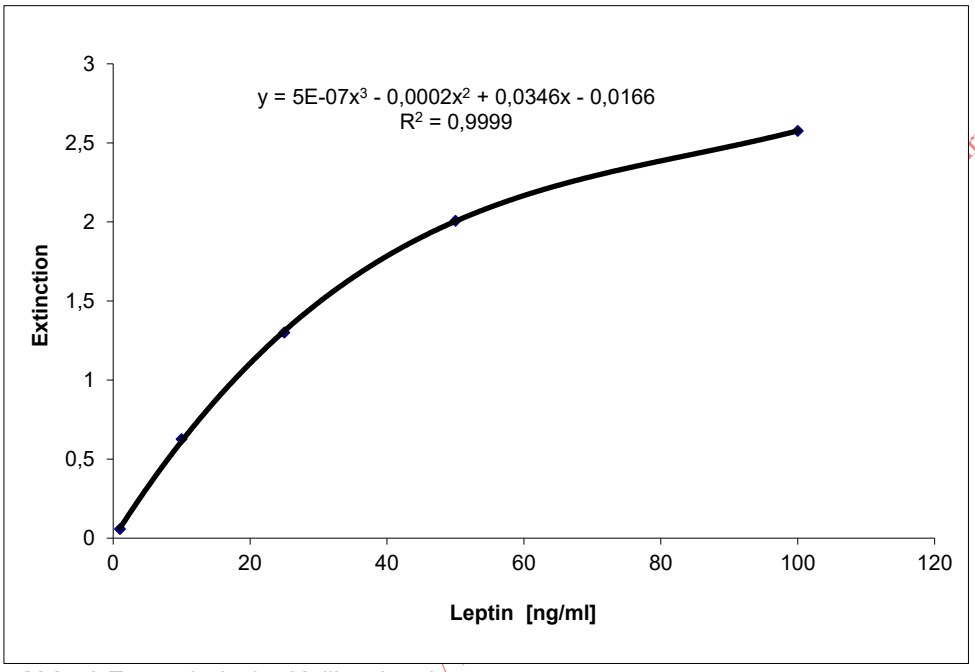

Abb. 1 Exemplarische Kalibrationskurve

10.3 Beispielhafte Berechnung der Leptinkonzentration

Gemessene Extinktion der Probe: 0,39

Gemessene Extinktion des Leerwertes: 0,04

Aus der Differenz der Absorption von Probe und Leerwert **berechnet Ihr Auswertungsprogramm** mit der entsprechenden Kurvenanpassung (hier: Polynom 3. Grades) die Leptinkonzentration der Probe durch Auflösen der Gleichung aus Abb. 1 nach x. In diesem Fall ergibt sich eine Leptinkonzentration in der Probe von

$$0{,}35 = 5 \times 10^{-7}x^3 - 0{,}0002x^2 + 0{,}0346x - 0{,}0166$$
$$7{,}012 = x$$

Da die Probe unverdünnt eingesetzt wurde, ist die Leptinkonzentration der Probe 7,012 ng/mL.

Exemplary Version of use for assay accomplishment /
rung verwenden

10.4 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.

10.5 Einschränkungen

Der Mediagnost Leptin ELISA E07 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.

11 REFERENZWERTE

Die Leptinkonzentrationen im Serum spiegeln hauptsächlich die Körperfettmasse wider. Schlanke Personen besitzen niedrige, fettleibige Personen hohe Leptinwerte. 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 Leptinwert. Diese Abhängigkeiten müssen mit in Betracht gezogen werden, bevor Erwartungsbereiche für Leptinwerte aufgestellt werden können.
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 (45; 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:

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

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

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

bzw.

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

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

Exemplary version do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version - nicht für Assay durchführung verwenden

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

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

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

In einem halblogarithmischen 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 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:

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

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/m^2, gemessene Leptinkonzentration = 5 ng/ml:

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

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment - Exemplarische Version - nicht für Assay-durchführung verwenden

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 (vgl. Kapitel Referenzwerte).

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

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version -nicht für Assaydurchführung verwenden

Tabelle 2 Mädchen im Tanner-Stadium 1 und 2

Perzentile (µg/l)					
BMI (kg/m²)	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				

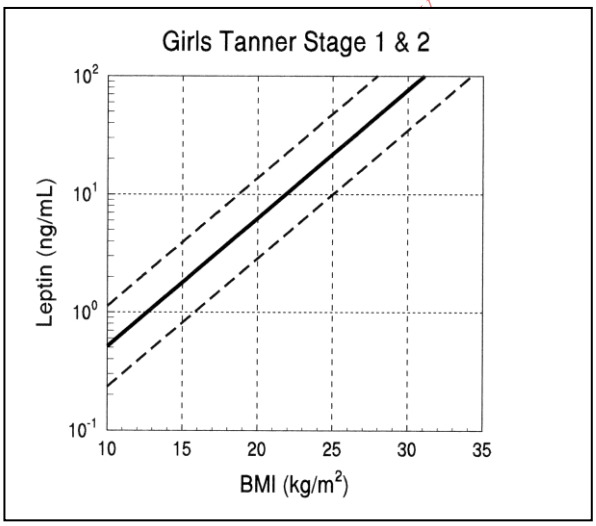

Abb. 2 Referenzbereiche für humane Serumkonzentrationen bezogen auf den BMI: Mädchen im Tanner-Stadium 1 + 2 (s. Text).

Tabelle 3 Jungen im Tanner-Stadium 1 und 2

Perzentile (µg/l)					
BMI (kg/m²)	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				

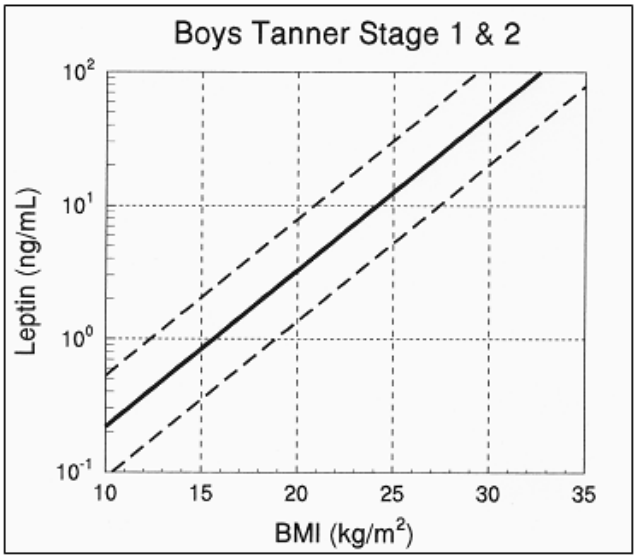

Abb. 3 Referenzbereiche für humane Serumkonzentrationen bezogen auf den BMI: Jungen im Tanner-Stadium 1 + 2 (s. Text).

accomplishment / Exemplarische Version, nicht für Assaydurchführung verwenden

Tabelle 4 Mädchen im Tanner-Stadium 3 und 4

Perzentile (µg/l)					
BMI (kg/m²)	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 (µg/l)					
BMI (kg/m²)	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		

Exemplarische Version zur Information / Example for assay accomplishment / Exemplarische Version zur Information / Zur Assaydurchführung verwenden

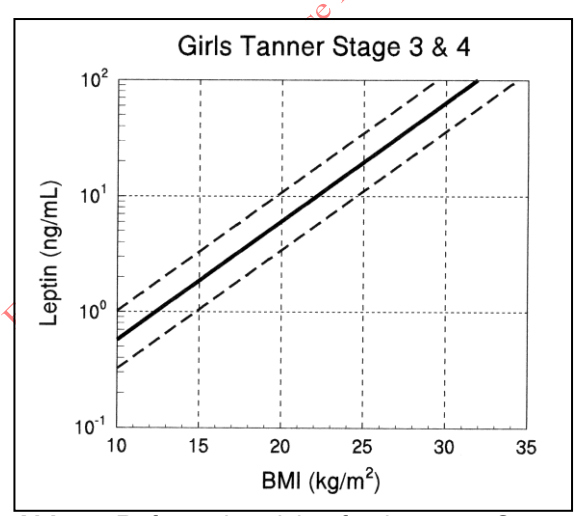

Abb. 4 Referenzbereiche für humane Serumwerte bezogen auf den BMI: Mädchen im Tanner-Stadium 3 + 4 (s. Text).

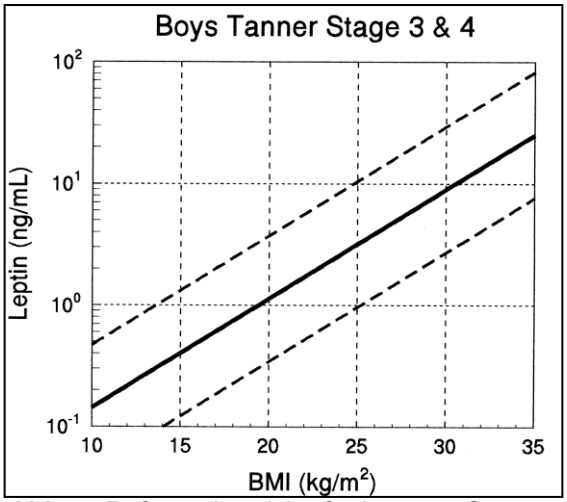

Abb. 5 Referenzbereiche für humane Serumwerte bezogen auf den BMI: Jungen im Tanner-Stadium 3 + 4 (s. Text).

Tabelle 6 Mädchen im Tanner-Stadium 5

Perzentile (µg/l)					
BMI (kg/m²)	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

Perzentile (µg/l)					
BMI (kg/m²)	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

Für Assay accomplishment / Exemplarischer Version und für Assay-Durchführung verwenden

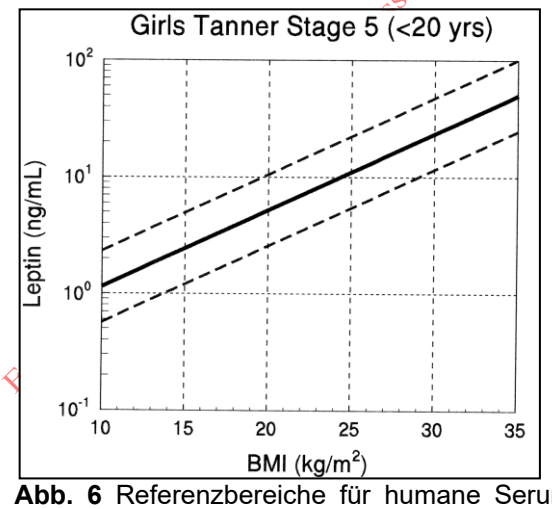

Abb. 6 Referenzbereiche für humane Serumwerte bezogen auf den BMI: Mädchen im Tanner-Stadium 5 (s. Text).

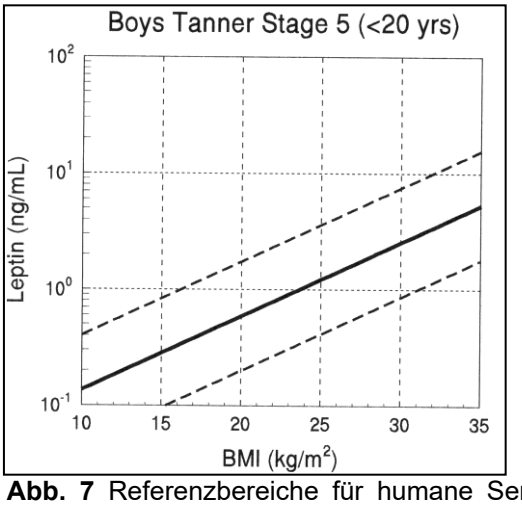

Abb. 7 Referenzbereiche für humane Serumwerte bezogen auf den BMI: Jungen im Tanner-Stadium 5 (s. Text)

Tabelle 8 Erwachsene Frauen

Perzentile (µg/l)					
BMI (kg/m²)	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

Perzentile (µg/l)					
BMI (kg/m²)	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		

assay accomplishment / Exemplarische Version - nicht für Assaydurchführung verwenden

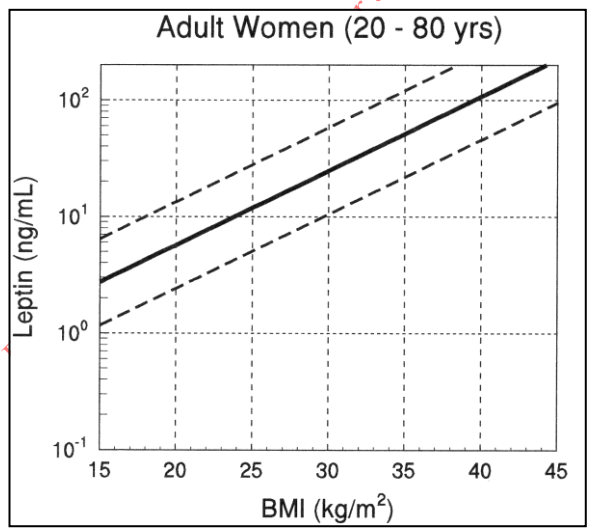

Abb. 8 Referenzbereiche für humane Serumwerte bezogen auf den BMI: adulte Frauen (s. Text).

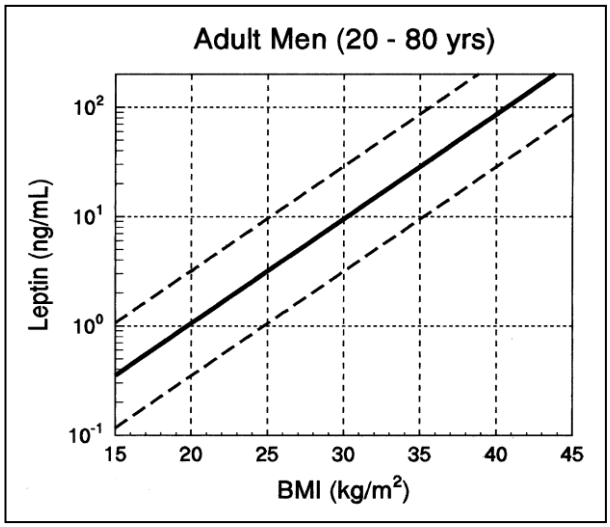

Abb. 9 Referenzbereiche für humane Serumwerte bezogen auf den BMI: Männer (s. Text).

12 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG

12.1 Sensitivität

Die analytische Sensitivität, gemessen als zweifache Standardabweichung des Leerwertes, beträgt im Mittel 0,095 ng/mL mit Messungen von 0,012 bis 0,24 ng/mL, sie ist somit < 0,25 ng/mL.
Basierend auf der unverdünnt eingesetzten Probe und der Konzentration des niedrigsten Kalibrators liegt die Quantifizierungsgrenze bei 1 ng/mL.

12.2 Präzision

Intra-Assay Varianz

Intra-Assay Varianz und Genauigkeit werden beispielhaft mit zwei Proben dargestellt. Die Leptinkonzentration dieser Proben wurden 8 Mal in 3 verschiedenen Assays gemessen. Bespielhafte Ergebnisse werden in der Tabelle 10 dargestellt. Der Variationskoeffizient (VK) betrug im Mittel 4,26 % (n=6).

Tabelle 10 Intra-Assay Variation

	Zielwert [ng/mL]	[n]	Mittel [ng/mL]	Standard-abweichung [ng/mL]	VK [%]
Probe 1	85	8	90,36	4,68	5,18
Probe 2	6	8	6,42	0,3	4,71

In beiden Proben ist die Variabilität geringer als 6 % und die Abweichung vom Zielwert ≤ 7 %.

Inter-Assay Varianz

Die Präzision des Testsystems wurde durch die Messung von Leptin in der gleichen Probe in mehreren unabhängigen Tests geprüft. Im Durchschnitt betrug der Variationskoeffizient 12 % (SD 3,5). Die Ergebnisse von 13 verschiedenen Proben sind in der Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11 Inter-Assay Variation und Genauigkeit. Die Ergebnisse beruhen auf 835 Messungen, die Innerhalb von 10 Jahren mit 15 verschiedenen Lots durchgeführt wurden.

Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Mittel [ng/mL]	11,11	5,64	37,06	2,38	6,18	7,21	4,65	4,35	2,45	36,08	5,93	25,12	17,54
SD [ng/mL]	0,92	0,57	3,26	0,43	0,64	0,57	0,49	0,61	0,47	3,68	0,75	2,63	1,66
Number [n]	121	99	28	182	86	86	79	23	27	25	22	26	31
VK [%]	8,33	10,10	8,81	17,97	10,35	7,88	10,57	14,04	19,21	10,19	12,57	10,45	9,46

Im Durchschnitt betrug der Variationskoeffizient 12 % (SD 3,5) und die Abweichung der gemessenen Leptinkonzentration vom Zielwert lag in 90 % der Proben unter 20 %.

12.3 Linearität

Die Proben werden routinemäßig unverdünnt verwendet. Verdünnung von **1:2** bis **1:20** wurden mit zwei Serumproben getestet. Die unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors bestimmte Leptinkonzentration unterschied sich nicht signifikant von der Konzentration in der unverdünnten Proben (vgl. Tabelle 12 Probe 1/2). Jedoch scheint dies probenabhängig zu sein. Zwei weitere Proben (verdünnt bis zu 1:80) zeigen eine nicht ausreichende Linearität (Tabelle 12 Probe 3/4). Daher kann eine stärkere Verdünnung als 1:10 nicht empfohlen werden.

Exemplary Version-do not use for assay a[illegible]mplishment / Exemplarische Version -nicht [illegible] durchführung verwenden

Tabelle 12 Linearität der Probenverdünnung. Die rekalkulierten Leptinkonzentrationen unterschiedlich verdünnter, humane Serumproben werden hier dargestellt.

Verdünnung	Probe 1 [µg/L]	Probe 2 [µg/L]	Verdünnung	Probe 3 [µg/L]	Probe 4 [µg/L]
unverdünnt	35,2	17,8	unverdünnt	36,8	10,5
1:2	35,0	17,3	1:2	41,3	12,7
1:5	38,6	18,0	1:4	41,4	14,1
1:10	35,5	17,7	1:10	39,9	15,7
1:20	40,6	15,9	1:30	54,5	18,6
-	-	-	1:60	57,1	26,1
-	-	-	1:80	55,6	28,5
Mittelwert [µg/L]	36,96	17,4	-	46,67	18,01
Standard-abweichung [µg/L]	2,5	0,86	-	8,65	6,86
Variations-koeffizient [%]	6,8	4,97	-	18,54	38,06

12.4 Wiederfindung und Richtigkeit

Die Richtigkeit und Rückführbarkeit des Mediagnost Leptin ELISA E07 wurde mittels Untersuchungen zur Wiederfindung von rekombinantem Leptin in Serum gezeigt. Die Wiederfindung des rekombinanten Leptins betrug in Serummatrix durchschnittlich 108%.

Tabelle 13 Wiederfindung vom rekombinanten humanen Leptin in Puffer & Serumproben. Puffer und humane Serumproben wurden mit rekombinantem Leptin versetzt und die Konzentration im E07 bestimmt und die relative Wiederfindung in Bezug auf die im Puffer gemessene Konzentration berechnet.

		Rekombinantes Leptin		Wiederfindung [%]	
	w/o Leptin	**5 µg/L**	**10 µg/L**	**5 µg/L**	**10 µg/L**
Puffer	-	5,79	11,78	116	118
Probe 1	5,74	10,72	15,36	100	98
Probe 2	4,38	9,67	14,63	103	102

Die Ergebnisse in Tabelle 13 zeigen, dass sich in den zwei beispielhaften Proben keine störenden Substanzen befanden. Des Weiteren wurde die Rückführbarkeit des E07 auf den Internationalen Standard WHO/NIBSC 97/594 geprüft. Dazu wurde das NIBSC Standardmaterial auf 10, 20 und 40 ng/mL verdünnt und als Probe im Test eingesetzt. Die Wiederfindung bezogen auf den nominalen Gehalt des NIBSC Standards betrug 106, 113 und 102%.

12.5 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. Zum Vergleich wurde die gleiche Menge des jeweiligen Lösungsmittles ohne jede Substanz auch zu Serum zugegeben. Die Messwerte in Tabelle 14 zeigen, dass weder Bilirubin noch Triglyzeride oder Hämoglobin einen Einfluss auf die Messung von Leptin in humanem Serum haben.

Tabelle 14 Interferenzen. Serumproben wurden mit unterschiedlichen Mengen an Triglyzeriden, Bilirubin oder Hämoglobin angereichert. Die relative Menge vom gemessenen Leptin im Vergleich zu nativen Serum wird hier [%] angezeigt.

	Triglyceride 100 mg/mL	**Bilirubin 100 µg/mL**	**Hämoglobin 1 mg/mL**
Serum 1	95	101	94
Serum 2	107	105	105
Serum 3	111	101	101

Exemplary Version - not for use for assay accomplishment / Exemplarische Version - nicht für Assaydurchführung verwenden

13 VERGLEICHSSTUDIEN

Der Mediagnost Assay wurde mit drei verschiedenen kommerziell erhältlichen Testsystemen verglichen und es zeigt sich eine gute Korrelation zwischen den drei untersuchten Tests (Abbildung 10).

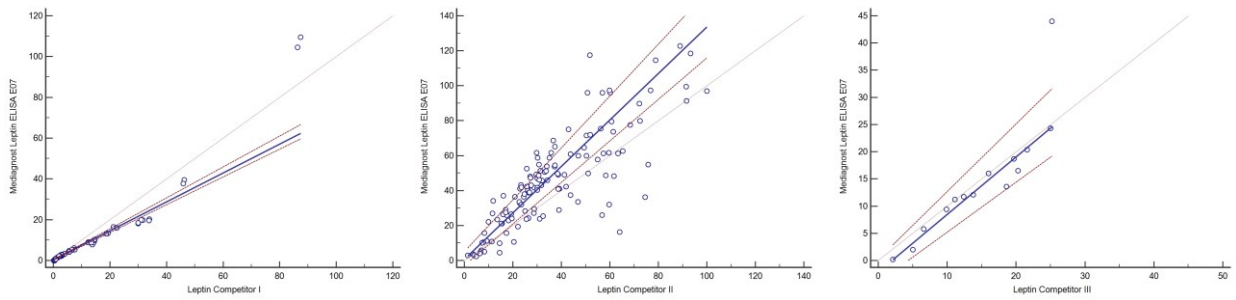

Abb. 10 Testvergleich. Leptin [ng/ml] wurden in verschiedenen Proben (n = 80/127/14) mit drei verschiedenen im Handel erhältlichen Immunoassays und mit dem Mediagnost E07 gemessen. Die Ergebnisse wurden mittels Passing-Bablok Regression analysiert. Eine signifikante Abweichung bezüglich der Linearität (Cusum Test) wurde beim Vergleich mit Competitor I festgestellt. Die Analyse ergab folgende Geradengleichungen und Residual Standardabweichung:

Competitor I y = 0,359 + 0,709x (6,013)
Competitor II y = 0,713 + 1,329x (10,372)
Competitor III y = -2,067 + 1,057x (4,0173)

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version -nicht für Assayentwicklung-

Gebrauchsinformation für wissenschaftliche Anwendungen

14 WISSENSCHAFTLICHE ANWENDUNGEN

Neben Serum- und Plasmaproben kann Leptin in anderen humanen Körperflüssigkeiten und in **Zellkulturüberständen** verschiedener humaner Zelllinien für wissenschaftliche Zwecke bestimmt werden.

14.1 Geeignete Proben für Forschungszwecke

Serum, Plasma, Urin, Speichel, Zellkulturüberstand humaner **Zelllinien.**

Empfohlene Probenverdünnung:
Serum und Plasma unverdünnt. In den anderen Proben können die Leptinwerte stark variieren, die optimale Verdünnung muss vom Kunden herausgefunden werden.

Tabelle 15 Die Ergebnisse der Probenmatrix Tests. Leptin wurde auf die jeweils verdünnten Proben zugesetzt. Die angereicherten Proben wurden ohne weitere Verdünnung gemessen. Dargestellt ist die relative Wiederfindung [%] vom zugesetzten Leptin in Proben im Vergleich von Leptin angereicherten Verdünnungspuffer.

Verdünnung	Proben	[ng/mL]	Wiederfindung [%]
-	Verdünnungspuffer (DIL) + rekombinantes Leptin	4,342	--
-	Speichel	0,247	--
1:2	Speichel + rek. Leptin	4,738	103
1:5	Speichel + rek. Leptin	4,354	95
1:10	Speichel + rek. Leptin	4,408	96
1:20	Speichel + rek. Leptin	4,343	95
-	Urin	0,203	--
1:2	Urin + rek. Leptin	4,486	99
1:5	Urin + rek. Leptin	5,101	112
1:10	Urin + rek. Leptin	5,316	117
1:20	Urin + rek. Leptin	4,492	99
-	Zellkultur medium	0,003	--
1:2	Zellkulturmedium + rek. Leptin	3,922	90
1:5	Zellkulturmedium + rek. Leptin	5,571	128
1:10	Zellkulturmedium + rek. Leptin	5,112	118
1:20	Zellkulturmedium + rek. Leptin	3,63	84
ohne zugesetztes Leptin			
Verdünnung	**Proben**	**[ng/mL]**	**Wiederfindung [%]**
1:1	Amnionflüssigkeit	21,981	100
1:2	Amnionflüssigkeit	21,812	99
1:4	Amnionflüssigkeit	19,236	88
1:8	Amnionflüssigkeit	18,537	84
1:16	Amnionflüssigkeit	17,876	81

14.2 Kreuzreaktivität

Die Kreuzreaktivitäten von mehreren handelsüblichen tierischen Seren wurden in diesem Assay getestet. Dazu wurden die Seren in verschiedenen Verdünnungen als Probe in den Mediagnost Leptin ELISA E07 eingesetzt.

In den Seren der folgenden Arten wurde **KEIN SIGNAL** detektiert:

Pferd, Rind, Huhn, Kaninchen, Hund, Meerschweinchen, Schaf, Maus, Ziege, Esel, Ratte, Katze, Schwein.

Exemplarische Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version-nicht für Ausgabenführung verwenden

ENGLISH - Instructions for use

TABLE OF CONTENTS

ENGLISH - INSTRUCTIONS FOR USE 27
1 INTENDED USE 27
2 INTRODUCTION 27
3 ASSAY PRINCIPLE 29
4 WARNINGS AND PRECAUTIONS 30
5 SAMPLES 31
6 MATERIALS 32
7 TECHNICAL NOTES 33
8 ASSAY PROCEDURE 34
9 QUALITY CONTROL 35
10 EVALUATION OF RESULTS 35
11 REFERENCE VALUES 37
12 PERFORMANCE CHARACTERISTICS 43
13 COMPARISON STUDIES 45
14 SCIENTIFIC APPLICATION 46
15 LITERATUR / REFERENCES 47
16 FRENCH: RÉSUMÉ DU DOSAGE LEPTIN ELISA E07 49
17 ITALIAN: RIASSUNTO DELLA PROCEDURA LEPTIN ELISA E07 50
18 INTERNATIONALE ASSAY DESCRIPTION 51
19 ASSAY PROCEDURE 52

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version -nicht für Assaydurchführung verwenden

ENGLISH - Instructions for use

Leptin ELISA E07	96 Determinations
CE	DE/CA40/00809/17
Principle of the test	Enzyme-linked Immunoassay
Duration (incubation period)	1.75 h
Antibodies	monoclonal antibodies
Buffer	Ready for use and 20fold concentrate
Calibrators	5 single Calibrators: 1 – 100 µg/L, recombinant human Leptin
Reference material	International Standard WHO/ NIBSC 97/594, recombinant Leptin
Assay Range	0.25 – 100 µg/L
Control	2 Controls, freeze-dried
Sample	human serum / plasma
Required sample volume	20 µL or 40 µL for single or duplicate measurement
Sample dilution	undiluted
Analytical sensitivity	ø ≤ 0.25 µg/L
Intra- / Interassay Variance	ø < 15%
Reference values	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

Exemplary Version for assay accomplishment / Beispielhafte Version - nicht für Assaydurchführung verwenden

1 INTENDED USE

The ELISA E07 is intended to be used for quantitative measurement of human Leptin in human serum and plasma samples.

2 INTRODUCTION

Leptin, the product of the ob gene (1,2), is a single-chain proteohormone 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. 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 by 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 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.
This enzyme immunoassay kit is suited for measuring human leptin in serum or plasma, and conditioned adipocyte culture media for scientific and diagnostic purposes.
Measuring leptin in anorectic or cachectic patients, young children or in specimen other than serum, such as urine, cerebrospinal fluid, and certain cell culture media, is also possible with this kit.
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.

Preliminary Version - do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version - nicht für Assaydurchführung verwenden

3 ASSAY PRINCIPLE

The Mediagnost ELISA for Leptin E07 is a so-called Sandwich-Assay using two specific and highly affine antibodies. The Leptin in the samples binds to the first antibody coated on the microtiter plate. In the following step the second specific anti-Leptin-Antibody binds in turn to the immobilised Leptin. The second antibody is biotinylated and will be applied in a mixture with a Streptavidin-Peroxidase-Enzyme Conjugate. In the subsequent substrate reaction, the turn of the colour will be catalysed quantitatively depending on the Leptin level of the samples.

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version -nicht für Assaydurchführung verwenden

4 WARNINGS AND PRECAUTIONS

For In Vitro Diagnostic Use only. For Professional use only.

The Mediagnost kit is suitable only for in vitro diagnostics and not for internal use in humans and animals. Follow strictly the test protocol. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything has been understood. Mediagnost will not be held responsible for any loss or damage (except as required by statute) howsoever caused, arising out of noncompliance with the instructions provided. A Material Safety Data sheet is available on request.

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

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

Appropriate precautions and good laboratory practices must be used in the storage, handling and disposal of the kit reagents. The disposal of the kit components must be made according to the local regulations.

Human Serum
Following components contain human serum: **Controls CTR1 and CTR2**
Source human serum for the Controls provided in this kit was tested and found non-reactive for Hepatitis-B surface antigen (HBsAg), Hepatitis C virus (HCV), and Human Immunodeficiency Virus 1 and 2 (HIV). No known methods can offer total security of the absence of infectious agents; therefore, all components and patient´s specimens should be treated as potentially infectious.

Reagents CAL A-E, DET, DIL, WB
Contain as preservative a mixture of **5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one** (<0.015%)

H317	May cause an allergic skin reaction.
P280	Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.
P272	Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace.
P261	Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapours/ spray.
P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention.
P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P501	Dispose of contents/ container in accordance with local/ regional/ national/ international regulations.

Substrate S
The TMB-Substrate S contains 3,3´,5,5´ Tetramethylbencidine (<0.05%)

H315	Causes skin irritation.
H319	Causes serious eye irritation.
H335	May cause respiratory irritation.
P261	Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapours/ spray.
P305+P351+	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes.
P338	Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

Stop Solution STP
The Stop solution contains 0.2 M acid sulphur acid (H_2SO_4)

H290	May be corrosive to metals.
H314	Causes severe skin burns and eye damage.
P280	Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.
P301+P330+	IF SWALLOWED: rinse mouth.
P331	Do NOT induce vomiting.
P305+P351+	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes.
P338	Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P309+P310	IF exposed or if you feel unwell: Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician.

4.1 General first aid procedures:

Skin contact: Wash affected area rinse immediately with plenty of water at least 15 minutes. Remove 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: After swallowing the product, if the affected person is conscious, rinse out the mouth with plenty of water: seek medical advice immediately.

Exemplar/ Version-do not use covassay accomplishment / Exemplarische Version-nicht für Assaydurchführung verwenden

5 SAMPLES

5.1 Sample type

Serum and Plasma

Beside serum also EDTA- and Heparin- plasma samples can be used because in five corresponding serum/plasma samples no difference between leptin concentrations of >30% was detected. Citrate plasma was also tested in two samples. The measured leptin concentration was 93 and 81% of the serum concentration. Thus, none of the tested anticoagulants interfered with the Leptin measurement.

5.2 Specimen collection

The blood sample for serum preparation should be gained according to standardized venipucture procedure. Hemolytic reactions have to be avoided.

Leptin levels show a circadian variation with a peak during the night at about 2 a.m. (37). This variation together with the influence of food intake needs to be taken into account, when blood samples are collected.

Required sample volume: 20 µL for single / 40 µL for duplicate measurement

5.3 Sample stability

In firmly closable sample vials

- Storage at 20-25°C: 2 days
- Storage at -20° C: min. 2 years
- Freeze-thaw cycles max. 5

The storage of samples over a period of 2 years at -20°C, showed no influence on the reading. Freezing and thawing of samples should be minimized, 5 Freezing-Thawing showed no effect on samples.

5.4 Interference

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

5.5 Sample dilution

There is no special sample treatment necessary. The samples can be used undiluted (20 µL).

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment/ Exemplarische Version -nicht für Assaydurchführung verwenden

6 MATERIALS

6.1 Materials provided

The reagents listed below are sufficient for 96 wells including the calibration curve.

MTP	**Microtiter plate,** ready for use, coated with mouse-anti-Leptin-antibody. Wells are separately	**(8x12) wells**
CAL A-E	**Calibrators**, lyophilized, (recombinant human Leptin), concentrations are given on vial labels and on quality certificate in	**5 x 750 µL**
CTR1	**Control 1,** lyophilised, (human serum), concentration is given on quality certificate in ng/mL.	**1 x 500 µL**
CTR2	**Control 2,** lyophilised, (human serum), concentration is given on quality certificate in ng/mL.	**1 x 500 µL**
DET	**Antibody-HRP-Conjugate,** ready for use, mouse-anti-hLeptin-antibody biotinylated + streptavidin horseradish peroxidase conjugate	**1 x 12 mL**
DIL	**Dilution Buffer,** ready for use	**1 x 25 mL**
WB	**Washing Buffer,** 20-fold concentrated solution	**1 x 50 mL**
S	**Substrate,** ready for use, horseradish-peroxidase (HRP) substrate, stabilised tetramethylbencidine.	**1 x 12 mL**
STP	**Stop Solution,** ready for use, 0.2 M sulphuric acid.	**1 x 12 mL**
-	**Sealing Tape,** for covering the **microtiter plate.**	**2 x**
	Instructions for use	**1 x**
--	**Quality Certificate**	**1 x**

6.2 Materials required, but not provided

- Distilled (Aqua destillata) or deionized water for dilution of the Washing Buffer **WB (A. dest.),** 950 mL.
- Precision pipettes and multichannel pipettes with disposable plastic tips
- Vortex-mixer
- Microtiter plate shaker (350 rpm)
- Microtiter plate washer (recommended)
- Micro plate reader ("ELISA-Reader") with filter for 450 and ≥590 nm

Exemplary Version - do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version - nicht für Assaydurchführung verwenden

7 TECHNICAL NOTES

Storage Conditions

Store the kit at 2-8°C after receipt until its expiry date. The lyophilized reagents should be stored at –20 °C after reconstitution. Avoid repeated thawing and freezing.

Storage Life

The shelf life of the components **after initial opening** is warranted for **4 weeks**. Store the unused strips and microtiter wells **airtight** together with the desiccant at 2-8°C in the clip-lock bag, use in the frame provided. The **reconstituted components:** Calibrators **A-E** and Controls **CTR1 and CTR2** must be stored at –20°C (max. 4 weeks). For further use, thaw quickly but gently (avoid temperature increase above room temperature and avoid excessive vortexing). Up to 3 of the freeze-thaw cycles did not influence the assay. The 1:20 diluted Washing Buffer **WB** is 4 weeks stable at 2-8°C.

Preparation of reagents

Bring all reagents to room temperature (20 - 25°C) before use. Possible precipitations in the buffers have to be resolved before usage by mixing and / or warming. Reagents with different lot numbers cannot be mixed.

Reconstitution

The Calibrators **A – E** and Controls **CTR1** and **CTR2** are reconstituted with the Dilution Buffer **DIL**. It is recommended to keep reconstituted reagents at room temperature for 15 minutes and then to mix them thoroughly but gently (no foam should result) with a Vortex mixer.

Dilution

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

Assay Procedure

When performing the assay, Blank, Calibrators **A-E**, Controls **CTR1, CTR2** and the samples should be pipette as fast as possible (e.g. <15 minutes). To avoid distortions due to differences in incubation times, Antibody-HRP-Conjugate **DET** as well as the succeeding Substrate **S** should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples. Stop Solution **STP** should be added to the plate in the same order as Substrate **S**.
All determinations (Blank, Calibrators **A-E**, Controls **CTR1**, **CTR2** and samples) should be assayed in duplicate. For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

Incubation

Incubation at room temperature means: Incubation at 20 - 25°C. The Substrate **S**, stabilised Tetramethylbencidine, is photosensitive–storage and incubation in the dark.

Shaking

The incubation steps should be performed at mean rotation frequency of a particularly suitable microtiter plate shaker. We are recommending **200 to max.350 rpm**. Due to certain technical differences deviations may occur, in case the rotation frequency must be adjusted. Insufficient shaking may lead to inadequate mixing of the solutions and thereby to low optical densities, high variations and/ or false values, excessive shaking may result in high optical densities and/ or false values.

Washing

Proper washing is of basic **importance** for a secure, reliable and precise performance of the test. Incomplete washing is common and will adversely affect the test outcome. Possible consequences may be uncontrolled unspecific variations of measured optical densities, potentially leading to false results calculations of the examined samples. Effects like high background values or high variations may indicate washing problems.

All washing must be performed with the provided Washing Buffer **WB** diluted to usage concentration. Washing volume per washing cycle and well must be 300 µL at least.

The danger of handling with potentially infectious material must be taken into account.

When using an **automatic microtiter** plate washer, the respective instructions fur use must be carefully followed. Device adjustments, e.g. for plate geometry and the provided washing parameters, must be performed. Dispensing and aspirating manifold must not scratch the inside well surface. Provisions must be made that the remaining fluid volume of every aspiration step is minimized. Following the last aspiration step of each washing cycle, this could be controlled, and possible remaining fluid could then be removed, by inverting the plate and repeatedly tapping it dry on non-fuzzy absorbent tissue.

Manual washing is an adequate alternative option. Washing Buffer may be dispensed via a multistepper device, a multichannel pipette, or a squirt bottle. The fluid may be removed by dynamical swinging out the microtiter plate over a basin. If aspirating devices are used, care has to be taken that the inside well surface is not scratched. Subsequent to every single washing step, the remaining fluid should be removed by inverting the plate and repeatedly tapping it dry on non-fuzzy absorbent tissue.

Exemplar Version -do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version - nicht für Assaydurchführung verwenden

8 ASSAY PROCEDURE

Preparation of reagents		Reconstitution	Dilution
CAL A-E	**Calibrators**	in **750 µL** Dilution Buffer **DIL**	-
CTR1 / CTR2	**Controls**	in **500 µL** Dilution Buffer **DIL**	-
WB	**Washing Buffer** 20-fold conc.	-	**1:20** with **Aqua dest.** ➔ **WB 1:20**
Sample dilution is in general not necessary, use **20 µl undiluted** per determination.			
Before assay procedure bring all reagents to room temperature **20-25°C**.			

Assay Procedure in Double Determination:

Pipette	Reagents	Position	
100 µL	Dilution Buffer **DIL**	**Pipette in all required wells**	
20 µL	Dilution Buffer **DIL** (**Blank**)	A1/A2	
20 µL	Calibrator **A** (**1 ng/mL**)	B1/B2	
20 µL	Calibrator **B** (**10 ng/mL**)	C1/C2	
20 µL	Calibrator **C** (**25 ng/mL**)	D1/D2	
20 µL	Calibrator **D** (**50 ng/mL**)	E1/E2	
20 µL	Calibrator **E** (**100 ng/mL**)	F1/F2	
20 µL	Control **CTR1** (undiluted)	G1/G2	
20 µL	Control **CTR2** (undiluted)	H1/H2	
20 µL	Sample (undiluted)	in the rest of the wells according the requirements	
Cover the wells with the sealing tape.			
Sample Incubation: 1 h at 20-25°C, 200 - 350 rpm			
5 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and **wash** 5 x with 300 µL each Washing Buffer **WB 1:20/ well**		In each well
100 µL	Antibody-POD-Conjugate **DET**		In each well
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 30 Minutes at 20-25°C, 200 - 350 rpm			
5 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and **wash** 5 x with 300 µL each Washing Buffer **WB 1:20/ well**		In each well
100 µL	Substrate **S**		In each well
Incubation: 15 Minutes in the Dark at 20-25°C			
100 µL	Stop Solution **STP**		In each well
Measure the absorbance within 30 min at **450 nm** with ≥ 590 nm as reference wavelength.			

Exemplarische Version -nicht für Anwendung verwenden

9 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls are included in each assay. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance. The test results are only valid if the test has been performed following the instructions. Moreover, the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state or local standards/laws. All calibrators and kit controls must be found within the acceptable ranges as stated on the QC Certificate. If the criteria are not met, the run is not valid and should be repeated. Each laboratory should use known samples as further controls.

9.1 Quality Criteria

For the evaluation of the assay it is required that the absorbance values of the blank should be below 0.25, and the absorbance of Calibrator E should be above 1.00.
Samples, which yield higher absorbance values than Calibrator E, should be re-tested with a dilution.

10 EVALUATION OF RESULTS

10.1 Establishing of the calibration curve

Calibrator	A	B	C	D	E
ng/mL	1	10	25	50	100

1) Calculate the **mean absorbance** value for the blank from the duplicated determination (well A1/A2).

2) Subtract the mean absorbance of the blank from the mean absorbances of all other samples, controls and calibrators.

3) Plot the calibrator concentrations on the x-axis versus the mean value of the absorbance of the calibrators on the y-axis.

4) Recommendation: Calculation of the calibration curve should be done by using a computer program, because the curve is in general (without respective transformation) not ideally described by linear regression. **A higher-grade polynomial, or four parametric logistic (4-PL) curve fit** or **non-linear regression** are usually suitable for the evaluation (as might be spline or point-to-point alignment in individual cases).

5) The Leptin concentration in ng/mL of the samples and controls **CTR1** and **CTR2** is calculated automatically by your program.

10.2 Example of a typical Calibration Curve

The following data is for demonstration only and cannot be used in place of data generation at the time of assay.

	Blank	A	B	C	D	E
ng/mL	0.0	1	10	25	50	100
$OD_{(450\text{-}620\ nm)}$	0.04	0.083	0.680	1.449	2.165	2.764

Demo version - do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version - nicht für Assaydurchführung verwenden

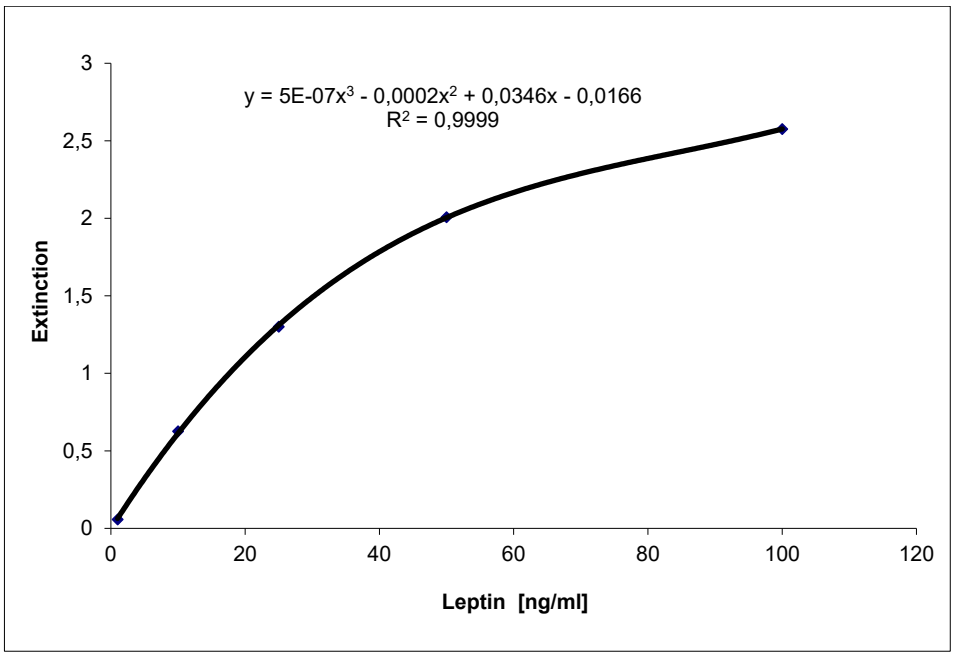

Figure 1 Examplary calibration curve

The exemplary shown calibration curve in Figure 1 **cannot** be used for calculation of your test results. You have to establish a calibration curve for each test you conduct!

10.3 Exemplary calculation of leptin concentrations

Measured extinction of your sample	0.39
Measured extinction of the blank	0.04

Your measurement programm will calculate the Leptin concentration of the diluted sample automatically by using the difference of sample and blank for the calculation. You only have to determine the most suitable curve fit (here: polynomial 3rd degree).

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

$$0.35 = 5 \times 10^{-7} x^3 - 0.0002x^2 + 0.0346x - 0.0166$$
$$7.012 = x$$

as the sample is undiluted the Leptin concentration of the sample is

7.012 ng/mL

Exemplary Version do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version nicht für Assaydurchführung verwenden

10.4 Interpretation of results

The test results should not be the only base for therapeutic decisions. The results should be interpreted in regard to anamnesis, further clinical observations and results of other diagnostic investigations. Further, it is recommended to establish reference and cut-off values corresponding to the relevant group of patients for each laboratory.

10.5 Limitation of procedure

The Mediagnost human Leptin ELISA, E07 is based on monoclonal antibodies. Generally, this technique could be sensible to heterophilic antibodies or rheumatic factors in the sample. Their influence is reduced by assay design, but cannot be excluded completely.

11 REFERENCE VALUES

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 2-9 and tables 1 - 9). 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:

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

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

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

and

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

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 1 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:

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

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version nicht zur Assaydurchführung verwenden

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

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

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:

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

In this equation, ln represents the natural logarithm (referring to the basis e). The constants a, b and d are given in table 1 according to gender and pubertal stage/age.

Example:
A boy at Tanner stage 3, BMI = 25 kg/m^2, measured leptin concentration = 5 ng/ml.

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

Table 1 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 (see Chapter reference Values).

Cohort	n	a	b	c	d
Males:					
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
Adults	380	0.0130	0.2200	1.1053	0.6740
Females:					
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
Adults	587	0.3042	0.1467	0.8548	0.5212

Exemplary Version - do not use for assay
Exemplarische Version / Exemplaric the Version Nicht für Assaydurchführung verwenden

Table 2 Girls Tanner stages 1 and 2

Percentile (µg/l)					
BMI (kg/m²)	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				

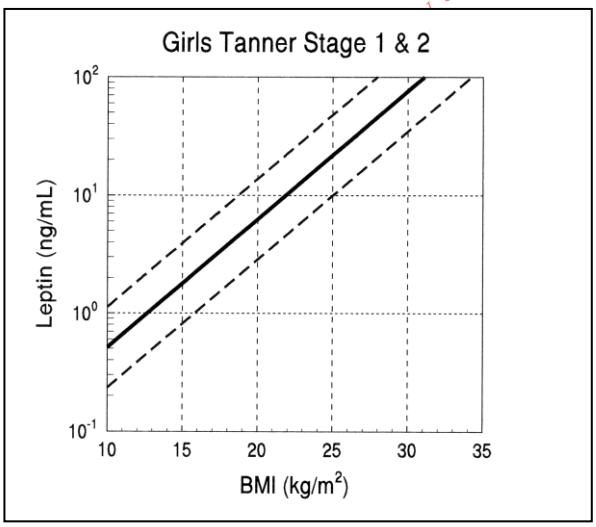

Figure 2 Reference ranges of human serum levels referring to BMI: Girls Tanner stage 1 & 2 (see text for details).

Table 3 Boys Tanner stages 1 and 2

Percentile (µg/l)					
BMI (kg/m²)	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				

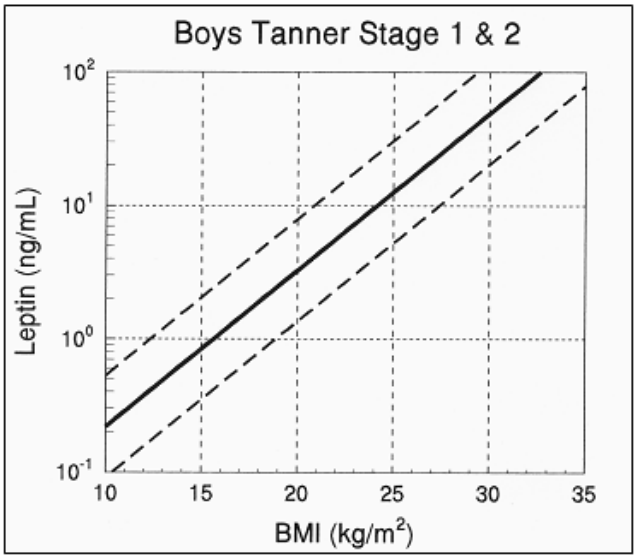

Figure 3 Reference ranges of human serum levels referring to BMI: Boys Tanner stage 1 & 2 (see text for details).

accomplishment / Exemplarische Version, nicht für Assayentwicklung verwenden

Table 4 Girls Tanner stages 3 and 4

Percentile (µg/l)					
BMI (kg/m²)	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 5 Boys Tanner stages 3 & 4

Percentile (µg/l)					
BMI (kg/m²)	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		

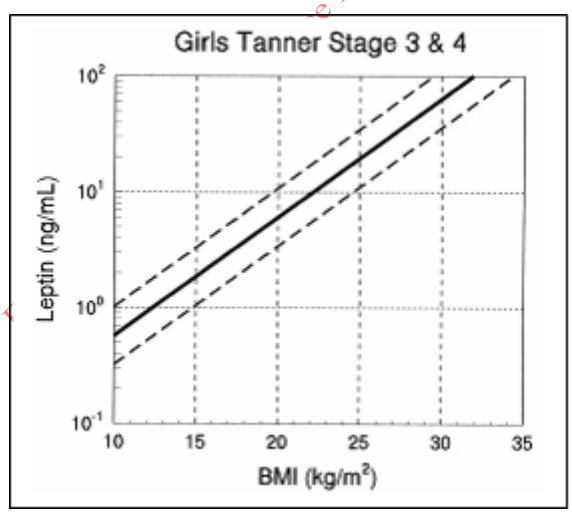

Figure 4 Reference ranges of human serum levels referring to BMI: Girls Tanner stage 3 & 4 (see text for details).

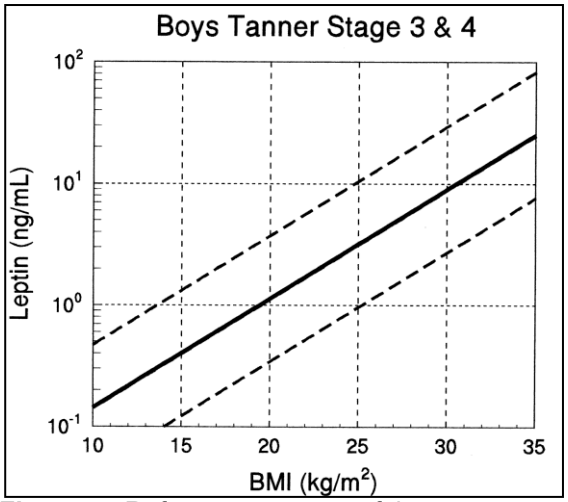

Figure 5 Reference ranges of human serum levels referring to BMI: Boys Tanner stage 3 & 4 (see text for details).

Table 6 Girls Tanner stage 5

Percentile (µg/l)					
BMI (kg/m²)	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		

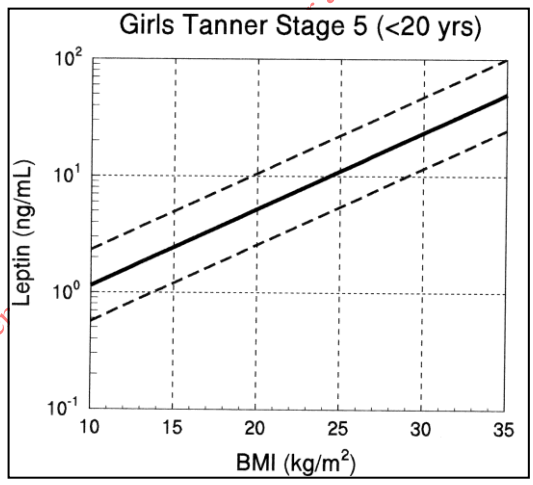

Figure 6 Reference ranges of human serum levels referring to BMI: Girls Tanner stage 5 (see text for details).

Table 7 Boys Tanner stage 5

Percentile (µg/l)					
BMI (kg/m²)	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

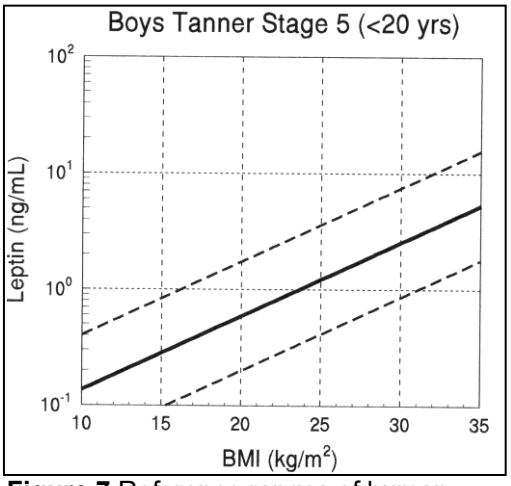

Figure 7 Reference ranges of human serum levels referring to BMI: Boys Tanner stage 5 (see text for details).

Exemplarischer Assay accomplishment / Exemplarischer Assay accomplishment / Version only for Assay validation / zu verwenden

Table 8 Adult women

Percentile (µg/l)					
BMI (kg/m²)	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		

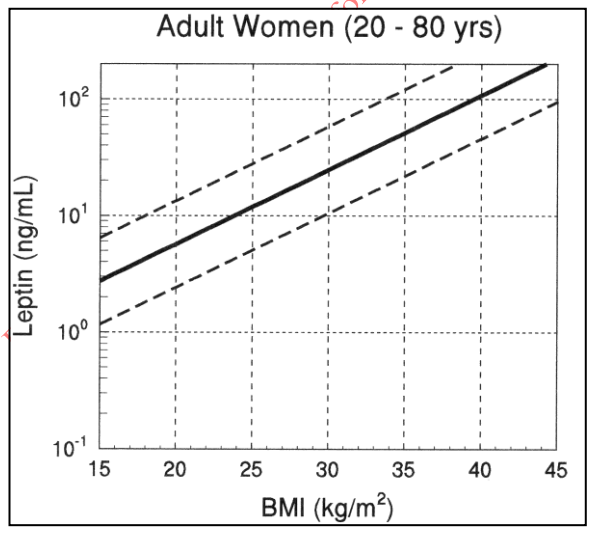

Figure 8 Reference ranges of human serum levels referring to BMI: Adult women (see text for details).

Table 9 Adult men

Percentile (µg/l)					
BMI (kg/m²)	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		

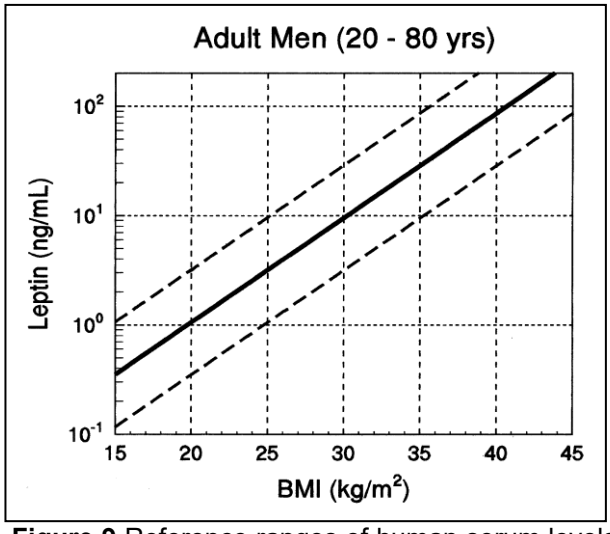

Figure 9 Reference ranges of human serum levels referring to BMI: Adult men (see text for details).

Exemplarische Version - nicht für Assayentwicklung verwenden
For assay accomplishment / Exemplarische Version - nicht für Assayentwicklung verwenden

12 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

12.1 Sensitivity

Limit of Detection / analytical sensitivity was assessed by measuring the blank and calculating the theoretical concentration of the blank + 2SD. The analytical sensitivity of the E07 is <0.25 ng/ml (different determinations with range of 0.012 up to 0.24 ng/mL; with a mean of 0.095 ng/mL).
Based on the undiluted sample the limit of quantification is 1 ng/mL.

12.2 Precision

Intra-Assay Variance & Accuracy

Two samples were measured eight times in three different assays. Exemplary results are shown in Table 10, here the deviation of the target value is 6.3 and 7%. The measured coefficient of variation (CV) is 4.26% on average (n=6).

Table 10: Intra-Assay Variation

	Target value [ng/mL]	[n]	Mean [ng/mL]	Standard Deviation [ng/mL]	CV [%]
Sample 1	85	8	90.36	4.68	5.18
Sample 2	6	8	6.42	0.3	4.71

Inter-Assay Variance & Accuracy

Precision was evaluated by measuring the leptin content of the same serum samples several times in independent assays. On average the coefficient of variation was 12% (SD 3.5) and the deviation of the target value was less than 20% in 90% of the tested samples. The results are summarized in table 11.

Table 11 Inter-Assay variability and accuracy. Results are based on 835 measurement within 10 years conducted with 15 different lots.

Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Mean [ng/mL]	11.11	5.64	37.06	2.38	6.18	7.21	4.65	4.35	2.45	36.08	5.93	25.12	17.54
SD [ng/mL]	0.92	0.57	3.26	0.43	0.64	0.57	0.49	0.61	0.47	3.68	0.75	2.63	1.66
Number [n]	121	99	28	182	86	86	79	23	27	25	22	26	31
CV [%]	8.33	10.10	8.81	17.97	10.35	7.88	10.57	14.04	19.21	10.19	12.57	10.45	9.46

12.3 Linearity

Samples are routinely used undiluted. Dilution of 1:2 up to 1:20 have been tested with two serum samples and the recalculated amount of measured Leptin was not significant different of the amount in the undiluted sample. This however seems to be dependent on the sample. Two other samples were diluted up to 1:80 and showed insufficient linearity (Table 12), thus a dilution higher than 1:10 is not recommended.

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplar ist die Version - nicht zur Assaydurchführung verwenden

Table 12 Linearity of sample dilution. The recalculated leptin concentrations of differently diluted human serum samples are shown here. The dilutions were treated like samples and the Mediagnost Leptin ELISA E07 was conducted as described in the package insert.

Dilution	Sample 1 [µg/L]	Sample 2 [µg/L]	Dilution	Sample 3 [µg/L]	Sample 4 [µg/L]
undiluted	35.2	17.8	undiluted	36.8	10.5
1:2	35.0	17.3	1:2	41.3	12.7
1:5	38.6	18.0	1:4	41.4	14.1
1:10	35.5	17.7	1:10	39.9	15.7
1:20	40.6	15.9	1:30	54.5	18.6
-	-	-	1:60	57.1	26.1
-	-	-	1:80	55.6	28.5
Mean [µg/L]	36.96	17.4	-	46.67	18.01
Standard Deviation [µg/L]	2.5	0.86	-	8.65	6.86
Coefficient of Variation [%]	6.8	4.97	-	18.54	38.06

12.4 Recovery

Recombinant leptin in Dilution Buffer (DIL) was used to enrich human serum samples. The leptin content of the so enriched samples was measured and recovery in comparison to the theoretical Leptin amount was calculated. Results are shown in table 13 and demonstrate that the two exemplary samples do not contain substances interfering with leptin measurement.

Table 13 Recovery of recombinant human Leptin in Buffer & Serum samples

		recombinant Leptin		Recovery [%]	
	w/o Leptin	5 µg/L	10 µg/L	5 µg/L	10µg/L
Buffer	-	5.79	11.78	116	118
Sample 1	5.74	10.72	15.36	100	98
Sample 2	4.38	9.67	14.63	103	102

The results shown in Table 13 demonstrate that the two tested samples did not contain substances interfering with Leptin measurement. Further, the traceability of the test system to the international standard WHO/NIBSC 97/594 was evaluated. Therefore the NIBSC standard was diluted to 10, 20 and 40 ng/mL and used as sample. Recovery based on the nominal Leptin content of the NIBSC Standards was 106, 113 and 102% , respectively.

12.5 Interference

Interference of bilirubin, hemoglobin and triglycerides was tested by adding different amounts of these substances to human serum containing Leptin. For comparison the same amount of buffer without any substance was also added to the serum. Table 14 demonstrates that neither bilirubin nor triglycerides or haemoglobin exert any influence on the measurement of Leptin in human serum.

Table 14 Interference of physiological substances

	Triglyceride 100 mg/mL	Bilirubin 100 µg/mL	Hemoglobin 1 mg/mL
Serum 1	95	101	94
Serum 2	107	105	105
Serum 3	111	101	101

Any version of use for assay accomplishment / Exemplar Version nicht für Assaydurchführungsverwendung

13 COMPARISON STUDIES

Here the Mediagnost Assay is compared with three different commercially available test systems demonstrating a good correlation between both assays (Figure 10).

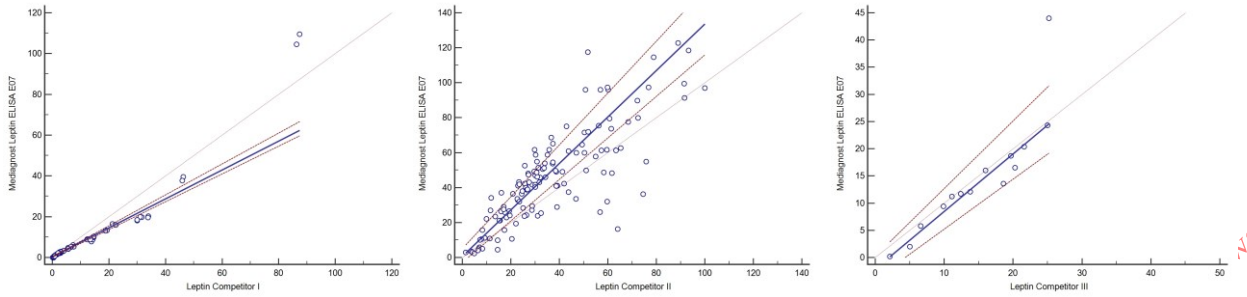

Figure 10 Assay Comparison. Leptin [ng/mL] of different sample panels (n=80/127/14) was evaluated by three different commercially available immunoassays and Mediagnost E07. Results were analysed by Passing-Bablok regression. A significant deviation from linearity (Cusum test) is seen with competitor I. The analysis revealed the following linear equations and residual standard deviations:

Competitor I y = 0.359 + 0.709x (6.013)
Competitor II y = 0.713 + 1.329x (10.372)
Competitor III y = -2.067 + 1.057x (4.0173)

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version -nicht für Assaydurchführung verwenden

Instructions for use for scientific application

14 SCIENTIFIC APPLICATION

In addition to serum and plasma samples Leptin can be determined in other human body fluids and in cell culture supernatants of human cell lines for research purposes.

14.1 Samples suitable for scientific application

Serum, plasma, saliva, urine and cell culture supernatant of human cell lines
Serum and plasma samples are recommended to use undiluted.
In the other samples, the Leptin levels can vary considerable, the optimal dilution must be found out by the customer.

Table 15 Results of sample matrix tests. Leptin was added to the respectively diluted samples. Enriched samples were measured without further dilution. Shown is the relative recovery of added leptin of the value measured in enriched assay buffer.

Dilution	Sample	[ng/mL]	Recovery [%]
-	Dilution Buffer (DIL) + recombinant Leptin	4.342	--
-	Saliva	0.247	--
1:2	Saliva + rec. Leptin	4.738	103
1:5	Saliva + rec. Leptin	4.354	95
1:10	Saliva + rec. Leptin	4.408	96
1:20	Saliva + rec. Leptin	4.343	95
-	Urine	0.203	--
1:2	Urine + rec. Leptin	4.486	99
1:5	Urine + rec. Leptin	5.101	112
1:10	Urine + rec. Leptin	5.316	117
1:20	Urine + rec. Leptin	4.492	99
-	Cell culture medium	0.003	--
1:2	Cell culture medium + rec. Leptin	3.922	90
1:5	Cell culture medium + rec. Leptin	5.571	128
1:10	Cell culture medium + rec. Leptin	5.112	118
1:20	Cell culture medium + rec. Leptin	3.63	84
without added Leptin			
Dilution	**Sample**	**[ng/mL]**	**Recovery [%]**
1:1	Amniotic fluid	21.981	100
1:2	Amniotic fluid	21.812	99
1:4	Amniotic fluid	19.236	88
1:8	Amniotic fluid	18.537	84
1:16	Amniotic fluid	17.876	81

Exemplary version-do not use for accomplishment / Exemplarische Version -nicht für Assaydurchführung verwenden

14.2 Species Cross-Reactivity

Serum of the cited species was diluted and used as sample in this assay system.

No signal was detected in serum of the following species:

Horse, Cow, Chicken, Rabbit, Dog, Guinea pig, Sheep, Mouse, Goat, Donkey, Rat, Cat, Pig.

15 LITERATUR / REFERENCES

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.
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.

Exemplar-Kopie - nicht zur Verwendung vorgesehen / Exemplarische Version - nur für Assessmentzwecke

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.

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version nicht für Assaydurchführung verwenden

16 FRENCH: RÉSUMÉ DU DOSAGE Leptin ELISA E07

Preparation/ Dilution des réactifs		
Calibrateurs A-E	Reconstituer avec le Tampon de Dilution **DIL** (aprés utilisation, conserver à –20°C)	750 µL
Contrôles CTR1&CTR2	Reconstituer avec le Tampon de Dilution **DIL** (aprés utilisation, conserver à –20°C)	500 µL
Tampon de lavage conc. WB	Diluer dans l'Eau distillée (ex. ajouter le contenu du flacon (50 mL) dans une bouteille graduée et ajouter de l'eau distillée jusqu'à 1000 mL)	1:20 ➔ **WB 1:20**
Diluer l´échantillon, généralement, il n'est pas nécessaire ; utiliser 20 µL, **non dilué,** par détermination		
Avant utilisation, tous les composants doivent être portés à température ambiante (20-25°C)		

Procédure de dosage en doublets:

Distribuer	Réactifs	Position des puits
100 µL	Tampon de Dilution **DIL**	**Distribuer le DIL dans tous les puits nécessaires**
20 µL	Tampon de Dilution **DIL** (blanc)	A1 / A2
20 µL	Calibrateur **A** (**1 ng/mL**)	B1 / B2
20 µL	Calibrateur **B** (**10 ng/mL**)	C1 / C2
20 µL	Calibrateur **C** (**25 ng/mL**)	D1 / D2
20 µL	Calibrateur **D** (**50 ng/mL**)	E1 / E2
20 µL	Calibrateur **E** (**100 ng/mL**)	F1 / F2
20 µL	Contrôle **CTR1**	G1 / G2
20 µL	Contrôle **CTR2**	H1 / H2
20 µL	**Echantillon**	Les puits suivants
Recouvrir la microplaque avec une bande adhésive		

Incubation: 1 h à température ambiante **(20-25°C), 200 - 350** tours par minute

5 x 300 µL	Aspirer le contenu des puits et laver 5 x avec 300 µL de tampon de lavage **WB 1:20**	Tous les puits
100 µL	Ajouter l'Anticorps-POD-Conjugate **DET**	Tous les puits
Recouvrir la microplaque avec une bande adhésive		

Incubation: 30 min à température ambiante **(20-25°C), 200 – 350** tours par minute

5 x 300 µL	Aspirer le contenu des puits et laver 5 x avec 300 µL de tampon de lavage **WB 1:20**	Tous les puits
100 µL	Ajouter le substrat **S**	Tous les puits

Incubation: 15 min dans le noir à température ambiante **(20-25°C)**

100 µL	Ajouter la Solution d'arrêt **STP**	Tous les puits
Mesurer l'absorbance dans les 30 min à 450 nm avec ≥ 590 nm longueur d'onde de référence		

Exemplarische Version -nicht für Analysenausführung verwenden / Exemplarische Version -nicht für Analysenausführung verwenden

17 ITALIAN: RIASSUNTO DELLA PROCEDURA Leptin ELISA E07

Ricostituzione/diluizione di reagenti e campioni		
Calibratori A-E	Tampone di diluizione **DIL** dopo l'uso conservare a -20°C	**750 µL**
Controlli CTR1/ CTR2	Tampone di diluizione **DIL** dopo l'uso conservare a -20°C	**500 µL**
Tampone di lavaggio concentrato WB	Diluire in acqua distillata (es. aggiungere l'intero contenuto della bottiglia (50 mL) in un contenitore graduato e portare a volume di 1000 mL)	**1:20** ➔ **WB 1:20**
La diluizione dei campioni non è necessaria, utilizzare 20 µL di campione non diluito		
Prima del dosaggio portare tutti i reattivi a temperatura ambiente.		

Procedura in doppia determinazione

Quantità	Reattivi	Posizione pozzetto
100 µL	Tampone di diluizione **DIL**	**Pipettare in tutti I pozzetti necessari**
20 µL	Tampone di diluizione **DIL**	A1/2
20 µL	Calibratore **A (1 ng/mL)**	B1/2
20 µL	Calibratore **B (10 ng/mL)**	C1/2
20 µL	Calibratore **C (25 ng/mL)**	D1/2
20 µL	Calibratore **D (50 ng/mL)**	E1/2
20 µL	Calibratore **E (100 ng/mL)**	F1/2
20 µL	Controllo **CTR1**	G1/2
20 µL	Controllo **CTR2**	H1/2
20 µL	Campione nei	Pozzetti successivi
Coprire i pozzetti con il foglio adesivo		
Incubazione: 1 h a RT, (20-25°C), **200 - 350 rpm**		
5 x 300 µL	Aspirare il contenuto dei pozzetti e **lavare** 5x con 300 µL di Tampone di lavaggio **WB 1:20**	Tutti i pozzetti
100 µL	Coniugato anticorpo POD **DET**	Tutti i pozzetti
Coprire i pozzetti con il foglio adesivo		
Incubazione: 30 min a RT, (20-25°C), **200 - 350 rpm**		
5 x 300 µL	Aspirare il contenuto dei pozzetti e **lavare** 5x con 300 µL di Tampone di lavaggio **WB 1:20**	Tutti i pozzetti
100 µL	Substrato **S**	Tutti i pozzetti
Incubazione: 15 min al **buio** a RT (20-25°C)		
100 µL	Soluzione di stop **STP**	Tutti i pozzetti
Misurare l'assorbanza entro 30 min. a **450 nm** (Reference ≥ 590 nm)		

Exemplarische Version -nicht für Assay accomplishment- Durchführung verwenden

18 Internationale Assay Description

International Test Description

CAL A-E	**Rec in 750 µL DIL**	
CTR1	**Rec in 500 µL DIL**	
CTR2	**Rec in 500 µL DIL**	
WB		**1:20 A. dest. ➔ WB 1:20**
-	**SPE**	
-	**°C 20-25 °C**	

100 µL	**DIL**	**A1 - End**
20 µL	**DIL**	A1/A2
20 µl	**CAL A (1 ng/mL)**	B1/B2
20 µl	**CAL B (10 ng/mL)**	C1/C2
20 µl	**CAL C (25 ng/mL)**	D1/D2
20 µl	**CAL D (50 ng/mL)**	E1/E2
20 µl	**CAL E (100 ng/mL)**	F1/F2
20 µl	**CTR1**	G1/G2
20 µl	**CTR2**	H1/H2
20 µl	**SPE**	
	TAPE	
	1 h °C 20-25 ↔ 200 - 350 rpm	
5x 300 µL	**5x WB 1:20**	
100 µL	**DET**	
	TAPE	
	0.5 h °C 20-25 ↔ 200 - 350 rpm	
5x 300 µL	**5x WB 1:20**	
100 µL	**S**	
	0.25 h °C 20-25	
	STP	
	MEASURE	

Exemplary - do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version - nicht für Assaydurchführung verwenden

19 ASSAY PROCEDURE

Preparation of reagents		Reconstitution	Dilution
CAL A-E	**Calibrators**	in **750 µL** Dilution Buffer **DIL**	-
CTR1 / CTR2	**Controls**	in **500 µL** Dilution Buffer **DIL**	-
WB	**Washing Buffer** 20-fold conc.	-	**1:20** with **Aqua dest.** ➔ **WB 1:20**

Sample dilution is in general not necessary, use **20 µl undiluted** per determination.

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

Assay Procedure in Double Determination:

Pipette	Reagents	Position
100 µL	Dilution Buffer **DIL**	**Pipette in all required wells**
20 µL	Dilution Buffer **DIL** (**Blank**)	A1/A2
20 µL	Calibrator **A** (**1 ng/mL**)	B1/B2
20 µL	Calibrator **B** (**10 ng/mL**)	C1/C2
20 µL	Calibrator **C** (**25 ng/mL**)	D1/D2
20 µL	Calibrator **D** (**50 ng/mL**)	E1/E2
20 µL	Calibrator **E** (**100 ng/mL**)	F1/F2
20 µL	Control **CTR1** (undiluted)	G1/G2
20 µL	Control **CTR2** (undiluted)	H1/H2
20 µL	Sample (undiluted)	in the rest of the wells according the requirements

Cover the wells with the sealing tape.

Sample Incubation: 1 h at 20-25°C, 200 - 350 rpm		
5 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and **wash** 5 x with 300 µL each Washing Buffer **WB 1:20**/ **well**	In each well
100 µL	Antibody-POD-Conjugate **DET**	In each well

Cover the wells with the sealing tape.

Incubation: 30 Minutes at 20-25°C, 200 - 350 rpm		
5 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and **wash** 5 x with 300 µL each Washing Buffer **WB 1:20**/ **well**	In each well
100 µL	Substrate **S**	In each well

Incubation: 15 Minutes in the Dark at 20-25°C		
100 µL	Stop Solution **STP**	In each well

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

Copy of the Page 34.

Exemplarische Version - nicht für Assay-Durchführung verwenden
Version do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version -nicht für Assay-Durchführung verwenden