

# Leptin Sensitiv ELISA

**REF** E077

**IVD**

**Istruzioni per l'uso Italiano**



E077\_IFU\_IVD\_IT

Approvazione: 09.11.2023

Revisione: 002/11.2023

Per la diagnostica in vitro. IVD per uso professionale.

Prima dell'utilizzo, leggere attentamente le istruzioni per l'uso.

<b>Leptin Sensitiv ELISA E077</b>	<b>96 prove</b>
<b>CE</b>	DE/CA40/00809/21/1
Principio del test	Saggio immunoenzimatico
Durata (tempo di incubazione)	1,75 h
Anticorpi	Anticorpi monoclonali, pronti all'uso
Tampone	Pronto all'uso e concentrato 20x
Calibratori	5 calibratori singoli: 0,05 - 5 µg/L, leptina umana ricombinante
Materiale di riferimento	Leptina ricombinante secondo lo standard internazionale OMS/NIBSC 97/594 (15,16)
Intervallo del saggio	0,01 – 50 µg/L
Controllo	2 controlli, liofilizzati
Campioni	Siero / plasma umano Misurazioni precise anche nelle persone magre, ad es. pazienti anoressici o cachettici, adolescenti e bambini piccoli.
Volume dei campioni necessario	25 µL
Diluizione dei campioni	1:10
Sensibilità analitica	ø 0,01 µg/L
Varianza intra- e inter-saggio	ø <10%
Valori di riferimento	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

Modifiche rispetto alla versione precedente:

<b>Revisione</b>	<b>Descrizione</b>
001	Passaggio alle istruzioni per l'uso elettroniche, modifiche redazionali
002	Pagina 8, 6.2 Il riferimento 37 è stato sostituito da 10













Mediagnost GmbH  
Aspenhastrasse 25  
72770 Reutlingen  
Germany  
☎ +49 7121 514840  
✉ [contact@mediagnost.de](mailto:contact@mediagnost.de)  
[www.mediagnost.de](http://www.mediagnost.de)

## Indice

Simboli e abbreviazioni .....	4
1 Destinazione d'uso.....	5
2 Introduzione .....	5
3 Principio del test.....	5
4 Materiali .....	6
5 Avvertenze e precauzioni.....	7
6 Campioni.....	8
7 Indicazioni tecniche.....	9
8 Stabilità e conservazione .....	10
9 Svolgimento del test – Schema di svolgimento .....	11
10 Controllo di qualità .....	12
11 Valutazione .....	12
12 Valori di riferimento .....	14
13 Proprietà e validazione del saggio .....	21
14 Riferimenti.....	22

Tutti gli incidenti gravi collegati al prodotto Leptin Sensitiv ELISA E077 di Mediagnost devono essere segnalati al fabbricante e all'autorità competente del paese in cui risiede l'utente e/o il paziente.

## Simboli e abbreviazioni

Simbolo	Descrizione
	Data di scadenza
	Consultare le istruzioni per l'uso elettroniche
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Numero lotto
	Fabbricante
	Numero di catalogo
	Limite di temperatura
	Contenuto sufficiente per <n> prove
	Identificativo univoco del prodotto
	Tenere lontano dalla luce

Abbreviazione	Descrizione
<b>MTP</b>	Piastra per microtitolazione
<b>CAL A – E</b>	Calibratore A – E
<b>CTR1</b>	Controllo 1
<b>CTR2</b>	Controllo 2
<b>DET</b>	Coniugato anticorpo-POD
<b>DIL</b>	Tampone di diluizione
<b>WB</b>	Tampone di lavaggio
<b>S</b>	Substrato
<b>STP</b>	Soluzione di arresto
<b>CF</b>	Pellicola adesiva di copertura
<b>CERT</b>	Certificato del lotto

## **1 Destinazione d'uso**

Misurazione quantitativa della leptina umana nel siero o nel plasma umano.

## **2 Introduzione**

L'ormone proteico leptina venne identificato nel 1994 quale prodotto del gene OB (1,2). Ha un peso molecolare di 16 kD e si presume che svolga un ruolo determinante nella regolazione del peso corporeo. La leptina viene prodotta quasi esclusivamente dalle cellule adipose differenziate (3-5). Agisce sul sistema nervoso centrale, soprattutto sull'ipotalamo, sopprimendo l'assorbimento degli alimenti e incrementando il consumo energetico (2,6-9).

Oltre alla sua azione sul metabolismo, la leptina esercita anche una potente azione su numerosi assi endocrini.

Per l'impiego clinico è importante sapere che i valori di leptina evidenziano una moderata variazione circadiana, con un massimo verso le 2 di notte (10). I valori di leptina a quest'ora sono più alti circa del 30-100% rispetto ai valori misurati al mattino o nel primo pomeriggio. Durante i prelievi di sangue è dunque opportuno tener conto di queste oscillazioni, oltre all'assorbimento degli alimenti. In condizioni standard, ad es. normali ritmi di alimentazione e prelievo di sangue al mattino o nel primo pomeriggio, una misurazione della leptina è sufficiente per ottenere informazioni valide.

Per un'interpretazione precisa dei valori di leptina misurati sono necessari intervalli di riferimento. Poiché la massa grassa corporea è ciò che influisce maggiormente sui valori, occorre mettere in relazione gli intervalli di riferimento alla massa grassa corporea (indice di massa corporea, IMC o percentuale di grasso corporeo, determinato mediante impedenziometria bioelettrica, BIA). I valori di leptina dipendono dall'età (11). Inoltre, a parità di massa grassa, le donne hanno un livello di leptina superiore agli uomini (12, 13). Pertanto gli intervalli di riferimento devono tener conto anche del sesso e dello sviluppo puberale.

Con il presente kit di immunodosaggio è possibile determinare la leptina umana nel siero o nel plasma a fini diagnostici. Il kit di test è adatto anche per la misurazione della leptina a concentrazioni particolarmente basse come ad es. in campioni di pazienti anoressici o cachettici e bambini.

Per l'applicazione standard, misurazione di siero o plasma di persone normopeso (valori previsti tra 1 e 100 ng/mL di leptina) consigliamo il nostro Leptin ELISA codice prodotto E07.

## **3 Principio del test**

ELISA E077 di Mediagnost per la misurazione sensibile della leptina è un cosiddetto saggio a sandwich che utilizza due anticorpi specifici. Il primo anticorpo abbinato alla piastra per microtitolazione si lega alla leptina del campione. Nella fase successiva, il secondo anticorpo anti-leptina specifico si lega alla leptina così immobilizzata. La successiva reazione enzimatica determina una colorazione blu del substrato, la cui intensità dipende dal contenuto di leptina del campione. Dopo l'arresto della reazione con l'acido, l'intensità del colore giallo viene quantificata attraverso la misurazione dell'assorbimento e viene convertita nella concentrazione di leptina mediante una curva di calibrazione.

## 4 Materiali

### 4.1 Contenuto del kit di test

I reagenti compresi nella fornitura del kit di test sono sufficienti per 96 test.

Abbreviazione	Descrizione	Quantità
MTP	<b>Piastra per microtitolazione</b> , pronta all'uso, rivestita con anticorpo murino anti-leptina umana. I pozzetti sono separabili singolarmente.	8 x 12 pozzetti
CAL A – E	<b>Calibratori A – E</b> , liofilizzati (leptina umana ricombinante); le concentrazioni sono indicate in ng/mL sulle etichette e sul certificato del lotto.	5 x 1 mL
CTR1	<b>Controllo 1</b> , liofilizzato, (siero umano); valore target e intervallo di ammissibilità sono riportati in ng/mL sul certificato del lotto.	1 x 250 µL
CTR2	<b>Controllo 2</b> , liofilizzato, (siero umano); valore target e intervallo di ammissibilità sono riportati in ng/mL sul certificato del lotto.	1 x 250 µL
DET	<b>Coniugato anticorpo-POD</b> , pronto all'uso, anticorpo murino anti-leptina umana biotinilato + coniugato streptavidina-perossidasi.	1 x 12 mL
DIL	<b>Tampone di diluizione</b> , pronto all'uso	1 x 60 mL
WB	<b>Tampone di lavaggio</b> , soluzione concentrata 20x	1 x 50 mL
S	<b>Substrato</b> , pronto all'uso, substrato della perossidasi (POD) di rafano, tetrametilbenzidina stabilizzata.	1 x 12 mL
STP	<b>Soluzione di arresto</b> , pronta all'uso, 0,2 M di acido solforico.	1 x 12 mL
CF	<b>Pellicola adesiva di copertura per piastra per microtitolazione</b>	2x
CERT	<b>Certificato del lotto</b>	1x

### 4.2 Materiali necessari, non compresi nella fornitura

- Acqua demineralizzata o acqua distillata (Aqua destillata, A. dest), 950 mL
- Micropipette regolabili e pipette multicanale con puntali intercambiabili
- Miscelatore vortex
- Agitatore di piastre per microtitolazione (350 rpm)
- Lavatrice di piastre per microtitolazione (opzionale)
- Fotometro per piastre per microtitolazione (ELISA-Reader), filtri a 450 nm e ≥590 nm
- Provette in polipropilene (PP)/polietilene (PE) per la diluizione dei campioni

## 5 Avvertenze e precauzioni

Il kit Mediagnost è adatto solo alla diagnostica in vitro e non per l'impiego interno in persone e animali. Questo prodotto è destinato solo all'utilizzo da parte di personale qualificato e deve essere utilizzato solo esattamente come descritto nelle istruzioni comprese nella fornitura. Mediagnost GmbH non può essere considerata responsabile per un'eventuale perdita o danni, insorti a causa della mancata osservazione delle istruzioni, salvo diversamente disposto dalla legge. La scheda di dati di sicurezza è consultabile alla pagina [www.mediagnost.de](http://www.mediagnost.de) o disponibile su richiesta.

**ATTENZIONE: il presente kit contiene materiale di origine umana e/o animale. I componenti del kit devono essere manipolati come potenzialmente infettivi.**

I controlli CTR1 e CTR2 contengono materiale di origine umana. Il materiale umano utilizzato per la preparazione di questo prodotto è stato testato con esito negativo per la presenza di alcuni importanti agenti infettivi, ad es. RNA del virus dell'immunodeficienza umano (HIV) ed RNA del virus dell'epatite C (HCV). Sono stati altresì ottenuti risultati negativi ai test per l'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg), ai test degli anticorpi contro il virus dell'immunodeficienza umana I e II (anti-HIV-I e -II), contro l'antigene core dell'epatite B (anti-HBc), nonché contro il virus dell'epatite C (anti-HCV). Tuttavia, poiché nessun test è in grado di escludere completamente la presenza di agenti infettivi, i reagenti devono essere manipolati come materiale potenzialmente infettivo.

Non utilizzare alcun reagente scaduto, evidentemente danneggiato, contaminato da microbi, o in caso di perdite. In casi di questo genere, rivolgersi a [contact@mediagnost.de](mailto:contact@mediagnost.de) e conservare i reagenti correlati al reclamo. È vietato scambiare componenti tra i lotti.

Per la conservazione, l'uso e lo smaltimento dei componenti del kit occorre rispettare adeguate misure precauzionali e le regole di buona prassi di laboratorio. Lo smaltimento dei componenti del kit deve essere effettuato in base alle normative locali.

### 5.1 Reagenti

**CAL, CTR, DET, DIL** contengono:

Pittogrammi di pericolo (CLP):



GHS07

Avvertenza (CLP):

Ingredienti pericolosi:

Indicazioni di pericolo (CLP):

Consigli di prudenza (CLP):

Attenzione

2-metil-2H-isotiazol-3-one, massa di reazione di 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-one e 2-metil-2H-isotiazol-3-one (3:1)

H317 - Può provocare una reazione allergica cutanea.

H412 - Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

P261 - Evitare di respirare la nebbia/i vapori/gli aerosol.

P273 - Non disperdere nell'ambiente.

P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi.

P333 + P313 - In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.

P362 + P364 - Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

P501 - Smaltire il prodotto/recipiente in conformità con le normative nazionali.

## 6 Campioni

### 6.1 Materiale del campione

Come materiale per il campione è idoneo il siero o il plasma umano. In campioni di plasma con EDTA e di siero corrispondenti non sono state rilevate variazioni significative nel contenuto di leptina.

### 6.2 Prelievo di sangue/ prelievo del campione

Il prelievo del campione di sangue deve avvenire mediante puntura venosa standard da parte di personale qualificato. Evitare le reazioni emolitiche.

I campioni di siero o plasma umani devono essere prelevati al mattino o nel primo pomeriggio con il soggetto in stato nutrizionale normale.

Le concentrazioni di leptina presentano una variazione circadiana, con un massimo verso le 2 di notte (10). Nei prelievi di sangue, oltre all'assorbimento degli alimenti, è opportuno tener conto di tali oscillazioni.

### 6.3 Volume dei campioni necessario

Una singola determinazione richiede un campione minimo di 10 µL, una determinazione in duplicato 20 µL. Per la manipolazione sicura corretta è necessario un volume del campione più grande a seconda della procedura specifica.

### 6.4 Stabilità del campione

I campioni devono essere conservati in contenitori idonei e richiudibili.

Per la conservazione a lungo termine dei campioni, si raccomanda una temperatura di conservazione di -20 °C o inferiore. La conservazione dei campioni per un periodo di 2 anni a -20 °C non ha mostrato alcuna influenza sul valore misurato. Il congelamento e lo scongelamento dei campioni devono essere ridotti al minimo. 5 cicli di congelamento e scongelamento non hanno mostrato alcun effetto sui campioni.

Temperatura di conservazione	Tempo di conservazione
20 – 25 °C	max 2 giorni
2 – 8 °C	max 3 giorni

### 6.5 Interferenza

Fino a una concentrazione di **1 mg/mL**, **100 mg/mL** e **200 µg/mL**, emoglobina, trigliceridi e bilirubina non hanno evidenziato alcun effetto sul campione. L'uso di campioni emolitici, lipemici o itterici deve essere preventivamente controllato dall'utente.

### 6.6 Diluizione dei campioni

I campioni devono essere diluiti nel tampone di diluizione **DIL** 1:10. Se si prevedono o si ottengono valori inferiori a 0,5 ng/mL di leptina, il campione deve e può essere diluito meno, minimo 1:5. Se si prevedono o si ottengono più di 50 ng/mL, il campione deve e può essere più diluito, vedere Tabella 13.

#### 6.6.1 Esempio di protocollo di diluizione

Per una determinazione in duplicato, ad es., 225 µL di tampone di diluizione **DIL** vengono posti in contenitori in PE/PP, nei quali vengono pipettati 25 µL di siero o plasma (corrispondenti a una diluizione 1:10). Dopo la miscelazione, vengono utilizzati nel saggio 2 x 100 µL di questa soluzione (100 µL per pozzetto).



## 7 Indicazioni tecniche

### 7.1 Preparazione dei reagenti

Tutti i componenti del kit devono essere portati a **temperatura ambiente prima dell'uso** (20-25 °C). Eventuali precipitati presenti in alcuni tamponi devono essere nuovamente disciolti mediante miscelazione e riscaldamento prima dell'uso. I reagenti dei kit con numeri di lotto diversi non possono essere mescolati.

### 7.2 Ricostituzione

I calibratori **A – E** e i controlli **CTR1** e **CTR2** vengono ricostituiti con il tampone di diluizione **DIL** contenuto nel kit. Per la ricostituzione, i reagenti devono rimanere a temperatura ambiente per 15 minuti e poi essere mescolati energicamente con un miscelatore vortex. Tuttavia, è necessario evitare la formazione di schiuma.

### 7.3 Diluizione

Dopo la ricostituzione, i controlli **CTR1** e **CTR2** vengono diluiti nello stesso rapporto dei campioni con il tampone di diluizione **DIL**. Dopo la ricostituzione i calibratori sono pronti all'uso e non possono essere diluiti.

Il volume del tampone di lavaggio **WB** necessario per l'esecuzione del saggio viene preparato diluendo il concentrato 20x con acqua distillata nel rapporto 1:20.

### 7.4 Incubazione

Un'incubazione a temperatura ambiente significa: **incubazione a 20-25 °C**.

Il substrato **S**, tetrametilbenzidina stabilizzata, è fotosensibile. La conservazione e l'incubazione devono quindi avvenire in luoghi protetti dalla luce.

### 7.5 Esecuzione del test

Le determinazioni (bianco, calibratori **A-E**, controlli **CTR1** e **CTR2** e campioni) devono sempre essere eseguite in duplicato. È necessario prestare attenzione per garantire un pipettaggio accurato e la stretta osservanza del protocollo del test. Durante l'esecuzione del test, i calibratori **A-E**, i controlli **CTR1**, **CTR2** e i rispettivi campioni devono essere pipettati il più rapidamente possibile. Il coniugato anticorpo-POD **DET**, il substrato **S** e la soluzione di arresto **STP** devono essere aggiunti alla piastra nello stesso ordine e con lo stesso intervallo di tempo. In questo modo si evitano variazioni nella determinazione della concentrazione dovute a tempi di incubazione diversi.

### 7.6 Agitazione

I materiali in incubazione devono essere agitati a una frequenza di rotazione di **350 rpm** in un agitatore adatto alle piastre per microtitolazione. A seconda dell'apparecchiatura è possibile che si verifichino singole deviazioni da questo valore, nel qual caso è necessario regolare la frequenza di rotazione. Un'agitazione troppo bassa può causare riduzione della densità ottica, elevata imprecisione e/o valori errati dovuti all'insufficiente miscelazione delle soluzioni, mentre un'agitazione eccessiva può causare un aumento della densità ottica.

### 7.7 Lavaggio

Un lavaggio corretto è essenziale per lo svolgimento sicuro, corretto e accurato del test. Un lavaggio insufficiente è una causa comune di procedure non valide del test. Le possibili conseguenze sono variazioni non controllate e non specifiche delle densità ottiche misurate che possono portare a calcoli errati dei risultati dei campioni. Possibili indizi di ciò sono, ad es., valori elevati del bianco e valori misurati imprecisi in modo variabile. Per il lavaggio è necessario utilizzare il tampone di lavaggio in dotazione diluito alla concentrazione di lavoro. Il volume di lavaggio per ciclo di lavaggio e pozzetto deve essere di almeno 300 µL.

Se si utilizza una speciale **lavatrice automatica per piastre per microtitolazione**, assicurarsi di seguire le istruzioni per l'uso. Le impostazioni del dispositivo devono essere adattate, tra l'altro, alla geometria delle piastre per microtitolazione e ai parametri delle specifiche di lavaggio. È necessario prestare attenzione affinché i capillari di erogazione e aspirazione del dispositivo non danneggino la superficie dei pozzetti della piastra per microtitolazione. Il liquido residuo dopo ogni aspirazione deve essere ridotto al minimo. Al termine dell'intero processo di lavaggio, la quantità di liquido residuo deve essere controllata e, se necessario, ridotta picchiando più volte la piastra per microtitolazione su cellulosa esente da pelucchi.

Il **lavaggio manuale** è una buona alternativa. Il liquido di lavaggio può essere erogato tramite multistepper, pipetta multicanale o con un flacone spray. Il liquido di lavaggio può essere rimosso facendo oscillare energicamente la piastra per microtitolazione su una bacinella. Se si utilizzano dispositivi di aspirazione, occorre prestare attenzione a non danneggiare le superfici dei pozzetti della piastra per microtitolazione. Dopo ogni singolo ciclo di lavaggio, il liquido residuo deve essere accuratamente rimosso picchiando la piastra per microtitolazione su cellulosa esente da pelucchi.

## 8 Stabilità e conservazione

### 8.1 Condizioni di conservazione

Dopo il ricevimento, il kit di test deve essere conservato a 2-8 °C fino alla data di scadenza.

### 8.2 Durata di conservazione

La durata di conservazione dei reagenti **dopo l'apertura iniziale** è di 4 settimane. Conservare le strisce inutilizzate **della piastra di test** insieme al tampone di asciugatura in un contenitore **ermetico** nella busta a clip richiudibile a 2 - 8 °C. Utilizzare le strisce solo nel telaio fornito. I **componenti ricostituiti** (calibratori **A - E** e controlli **CTR1** e **CTR2**) devono essere conservati a -20 °C. Per un ulteriore utilizzo, scongelare alla massima temperatura ambiente e non agitare eccessivamente. Fino a 3 di questi cicli di congelamento/scongelamento non hanno mostrato alcun effetto sul test. Il tampone di lavaggio **WB** diluito 1:20 pronto all'uso ha una durata di 4 settimane a 2-8 °C.

## 9 Svolgimento del test – Schema di svolgimento

Preparazione dei reagenti			
Preparazione del reagente		Ricostituzione	Diluizione
<b>CAL A-E</b>	<b>Calibratori</b>	in <b>1 mL</b> ciascuno Tampone di diluizione <b>DIL</b>	-
<b>CTR1</b> <b>CTR2</b>	<b>Controlli</b>	in <b>250 µL</b> ciascuno Tampone di diluizione <b>DIL</b>	<b>1:10</b> in tampone di diluizione <b>DIL</b>
<b>WB</b>	<b>Tampone di lavaggio</b> concentrazione di 20x	-	<b>1:20</b> con <b>Aqua dest.</b>
<b>Diluizione del campione: 1:10</b> ad es. 225 µL DIL + 25 µL campione			
Prima dello svolgimento del test portare tutti i <b>reagenti</b> a <b>temperatura ambiente (20-25 °C)</b> .			
Svolgimento del test con determinazione in duplicato			
Pipettare	Reagenti	Posizione	
100 µL	Tampone di diluizione <b>DIL</b> (bianco)	A1/A2	
100 µL	Calibratore <b>CAL A (0,05 ng/mL)</b>	B1/B2	
100 µL	Calibratore <b>CAL B (0,5 ng/mL)</b>	C1/C2	
100 µL	Calibratore <b>CAL C (1,5 ng/mL)</b>	D1/D2	
100 µL	Calibratore <b>CAL D (3,5 ng/mL)</b>	E1/E2	
100 µL	Calibratore <b>CAL E (5 ng/mL)</b>	F1/F2	
100 µL	<b>CTR1</b> Controllo 1 (diluito 1:10)	G1/G2	
100 µL	<b>CTR2</b> Controllo 2 (diluito 1:10)	H1/H2	
100 µL	Campione (diluito 1:10)	Pipettare all'occorrenza nei restanti pozzetti	
Coprire ermeticamente i pozzetti con pellicola adesiva.			
Incubazione: 1 h a (20-25 °C), 350 rpm			
3x 300 µL	Aspirare e lavare la piastra <b>3x</b> con <b>300 µL</b> di tampone di lavaggio (diluito a 1:20) per pozzetto.	In ogni pozzetto	
100 µL	Coniugato anticorpo-POD <b>DET</b>	In ogni pozzetto	
Coprire ermeticamente i pozzetti con pellicola adesiva.			
Incubazione: 30 minuti a (20-25 °C), 350 rpm			
3x 300 µL	Aspirare e lavare la piastra <b>3x</b> con <b>300 µL</b> di tampone di lavaggio (diluito a 1:20) per pozzetto.	In ogni pozzetto	
100 µL	Substrato <b>S</b>	In ogni pozzetto	
Incubazione del Substrato S: 15 minuti al buio a (20-25 °C)			
100 µL	Soluzione di arresto <b>STP</b>	In ogni pozzetto	
Misurazione dell'assorbimento entro 30 minuti a <b>450 nm</b> (filtro di riferimento ≥590 nm).			

## 10 Controllo di qualità

I seguenti criteri sono applicabili alla stima e alla valutazione di una sessione di saggio valida:

- Per la valutazione del test occorre assicurarsi che le assorbanze del bianco non superino le 0,25 unità; il calibratore E invece deve raggiungere assorbanze superiori a 1,0 unità.
- Le concentrazioni misurate dei controlli del kit devono rientrare nell'intervallo di ammissibilità, indicato sul certificato del lotto allegato al kit di test.

Se questi criteri non sono soddisfatti, il test non è valido e deve essere ripetuto.

Si devono prendere in considerazione anche altri fattori:

- I campioni le cui assorbanze si trovano al di fuori dell'intervallo di calibrazione di **CAL A - CAL E** sono al di fuori della curva di calibrazione e devono essere nuovamente analizzati in una seconda sessione di test con una diluizione adeguata per una determinazione affidabile.
- Le assorbanze dei calibratori, indicate anche sul certificato del lotto, corrispondono a dati d'esempio e non devono essere utilizzate per il calcolo dei campioni misurati.

## 11 Valutazione

### 11.1 Creazione della curva di calibrazione

I calibratori forniti contengono le seguenti concentrazioni di leptina:

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

- a) Determinare il **valore medio** della densità ottica del bianco dalle determinazioni in duplicato (pozzetto A1/A2).
- b) Sottrarre il valore medio del bianco dai valori medi della densità ottica dei calibratori, dei controlli e dei campioni.
- c) Le concentrazioni del calibratore (asse X) sono tracciate rispetto alla densità ottica misurata (asse Y).
- d) Il calcolo della curva di calibrazione deve essere effettuato con un programma statistico, poiché la curva non è generalmente descritta in modo ideale da una regressione lineare. Per la valutazione sono adatti **un polinomio di grado superiore, adattamenti a 4 parametri o regressione non lineare**; in alcuni casi può essere appropriato un adattamento spline o da punto a punto.
- e) Dalla curva di calibrazione si ottiene la concentrazione di leptina dei controlli diluiti **CTR1** e **CTR2** o dei campioni diluiti. **Moltiplicando** il rispettivo contenuto di leptina calcolato **con** il corrispondente **fattore di diluizione** si ottiene la concentrazione di leptina dei campioni/controlli non diluiti.

## 11.2 Esempio di una tipica curva di calibrazione

I dati esemplificativi e la curva di calibrazione della Figura 1 **non** possono essere utilizzati per il calcolo dei risultati del test! Per ogni test deve essere eseguita una curva di calibrazione separata.

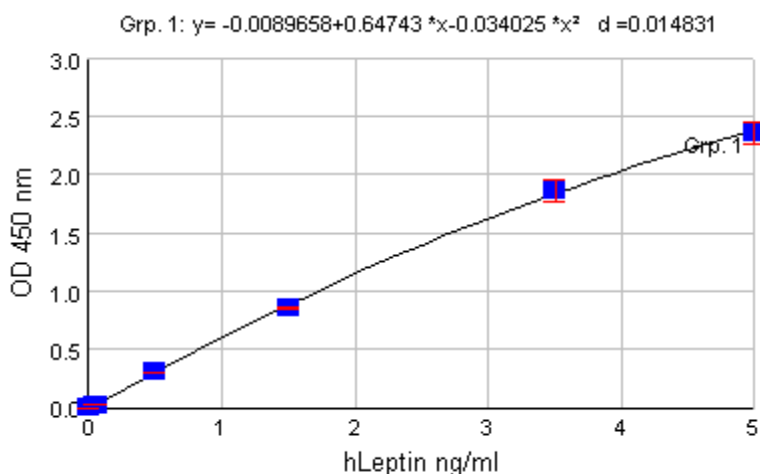


Fig. 1 – Esempio di curva di calibrazione

## 11.3 Calcolo esemplificativo della concentrazione di leptina di un campione diluito 1:10

- Assorbanza misurata del campione: 0,293
- Assorbanza misurata del bianco: 0,015

Dalla differenza tra l'assorbanza del campione e l'assorbanza del valore del bianco (= 0,278) il **programma di valutazione calcola** la concentrazione di leptina del campione diluito con il corrispondente adattamento della curva (qui: polinomio di 2° grado) risolvendo l'equazione della Fig. 1 per X. In questo caso si ottiene una concentrazione di leptina nel campione diluito di

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

Tenendo conto del fattore di diluizione di 1:10, il campione contiene quindi 4,4524 ng/mL di leptina.

## 11.4 Interpretazione dei risultati

Il risultato del test da solo non deve essere l'unica ragione per le decisioni terapeutiche. I risultati devono essere interpretati in relazione all'anamnesi, alle altre osservazioni cliniche e ai risultati di altre indagini diagnostiche. Inoltre si raccomanda ad ogni laboratorio di stabilire i propri intervalli di riferimento.

## 11.5 Limitazioni

Leptin Sensitiv ELISA E077 di Mediagnost è basato su anticorpi. In generale questa tecnica può essere influenzata dalla presenza nel campione di anticorpi eterofili o fattori reumatoidi. Questa influenza è ridotta dal disegno del saggio, ma non può essere completamente esclusa.

## 12 Valori di riferimento

Le concentrazioni di leptina nel siero sono di solito fortemente correlate alla massa grassa corporea. Le persone magre presentano generalmente bassi livelli di leptina, mentre le persone obese tendono ad avere alti livelli di leptina. Esiste anche una chiara differenza di genere tra uomini (valori più bassi) e donne (valori più alti) per una data percentuale di grasso corporeo. Anche la fase puberale influisce sui livelli di leptina. Queste variabili devono essere prese in considerazione per i valori attesi di leptina. Esistono diversi metodi per determinare la percentuale di grasso corporeo, ad es. il calcolo dell'indice di massa corporea (IMC, peso [in kg] diviso per il quadrato dell'altezza [in m]), la stima dell'impedenza bioelettrica (BIA) o l'assorbimetria a raggi X a doppia energia (DXA) corporea totale. Sebbene l'IMC sia meno accurato rispetto a metodi più sofisticati come la BIA o la DXA nell'analisi della massa grassa corporea effettiva, l'indicazione dell'IMC presenta diversi vantaggi:

- 1) L'IMC è indipendente dai modelli di regressione applicati.
- 2) L'IMC è facile da determinare, poiché è sufficiente fornire l'altezza e il peso.
- 3) L'IMC può in genere essere determinato retrospettivamente.
- 4) L'IMC è la misura più accurata per le variazioni a breve termine della massa grassa, ad es. durante il digiuno.

Pertanto sono stati stabiliti i seguenti intervalli attesi delle concentrazioni di leptina sierica sulla base dell'IMC come principale variabile indipendente limitante, con l'inclusione del sesso e dello sviluppo puberale (14; si vedano le Figure da 2 a 9 e le Tabelle da 1 a 9 di seguito). A partire dall'età di 20 anni, non è stata riscontrata alcuna correlazione significativa dei valori con l'età. Dato l'IMC del paziente, i valori attesi elencati, distinti per sesso ed età, possono essere utilizzati per il confronto con i valori di leptina misurati in pazienti normali, al fine di identificare deviazioni patologiche.

Le migliori regressioni per i diversi gruppi di persone (vedere Figure da 2 a 9) si ottengono con la seguente funzione esponenziale:

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

Il 5° e 95° percentile sono espressi dalle seguenti equazioni:

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

o 
$$\text{leptina} = a \cdot e^{(b \cdot BMI + c)}$$

Con il grafico semilogaritmico (asse Y = log leptina) queste funzioni danno origine a linee rette. I valori per a, b e c nella Tabella 1 sono riportati divisi per sesso, sviluppo puberale e adulti. Con questi valori, gli intervalli previsti per la leptina possono essere facilmente estesi a intervalli dell'IMC più alti o più bassi, se necessario.

Esempio:

Il 50° percentile per ragazzi nello Stadio di Tanner 3 e 4 viene espresso dalla curva seguente:

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

Il 5° percentile corrisponde a:  $\text{leptina} = 0,0181 \cdot e^{(0,2067 \cdot IMC - 1,1919)}$

e il 95° percentile corrisponde a:  $\text{leptina} = 0,0181 \cdot e^{(0,2067 \cdot IMC + 1,1919)}$

In un grafico semilogaritmico, queste funzioni corrispondono a rette parallele con distanze uguali al 50° percentile.

### 12.1 Calcolo della deviazione standard (DS; valori Z)

Un metodo adeguato per determinare la deviazione di una concentrazione di leptina misurata dal corrispondente intervallo di riferimento è il calcolo della deviazione standard. In questo caso il valore di leptina misurato per un determinato IMC del paziente viene messo in relazione con il valore di leptina del corrispondente gruppo di sesso ed età. La deviazione calcolata corrisponde a x volte la deviazione standard. In questo modo, i livelli di leptina possono essere classificati in base all'IMC, sesso e sviluppo/età puberale, e raggruppati per ulteriori analisi. Ciò consente, ad es., di eliminare l'influenza dell'IMC, sesso ed età per le analisi successive.

Data la dipendenza logaritmica dei livelli di leptina, la DS della leptina viene calcolata come segue:

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

In questa equazione, "ln" sta per logaritmo naturale (riferito alla base e). Le costanti a, b e d sono riportate separatamente per sesso ed età nella Tabella 1.

Esempio:

Un ragazzo allo Stadio di Tanner 3, IMC = 25 kg/m<sup>2</sup>, concentrazione di leptina misurata = 5 ng/mL:

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

## 12.2 Stima della diluizione ottimale del campione

Poiché i valori di leptina sierica variano di diversi ordini di grandezza a seconda della massa grassa corporea, un'adeguata diluizione del campione è un prerequisito per un'elevata accuratezza della misurazione. I campioni devono essere diluiti in modo che le concentrazioni finali rientrino nell'intervallo della curva di calibrazione. Gli intervalli previsti sono un utile aiuto per stimare i livelli di leptina attesi in relazione all'IMC, sesso ed età.

### Esempio 1

Donna adulta, IMC = 35 kg/m<sup>2</sup>. Il livello medio di leptina con l'IMC di 35 kg/m<sup>2</sup> è di circa 50 ng/mL secondo gli intervalli di riferimento per le donne adulte. La diluizione ottimale sarebbe quindi 1:20.

### Esempio 2

Ragazzo in età prepuberale, IMC = 24 kg/m<sup>2</sup>. Il livello medio di leptina per i ragazzi in Stadio di Tanner 1 e 2 con l'IMC di 24 kg/m<sup>2</sup> è di circa 10 ng/mL secondo gli intervalli di riferimento. La diluizione ottimale sarebbe quindi 1:10.

**Tabella 1** – Costanti a, b, c e d per il calcolo degli intervalli di riferimento e variazioni standard della leptina in base all'IMC. Gruppi di individui normali e sani sono stati separati per sesso e per stadio di sviluppo puberale/età. TS = Stadio di Tanner, n = numero di persone, a, b, c e d = costanti.

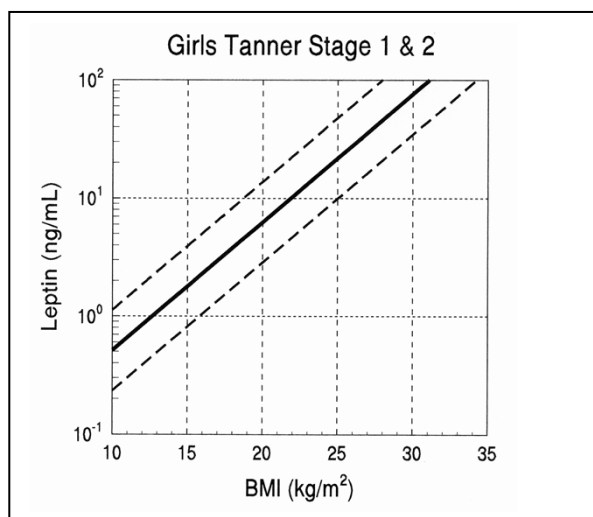
Gruppo	n	a	b	c	d
<b>Maschile</b>					
TS 1 e 2	136	0,0146	0,2706	0,8821	0,5379
TS 3 e 4	50	0,0181	0,2067	1,1919	0,6850
TS 5	112	0,0316	0,1462	1,0821	0,6558
Adulti	380	0,0130	0,2200	1,1053	0,6740
<b>Femminile</b>					
TS 1 e 2	136	0,0422	0,2499	0,7849	0,4786
TS 3 e 4	43	0,0543	0,2357	0,5745	0,3379
TS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

**Tabella 2 – Ragazze in Stadio di Tanner 1 e 2**

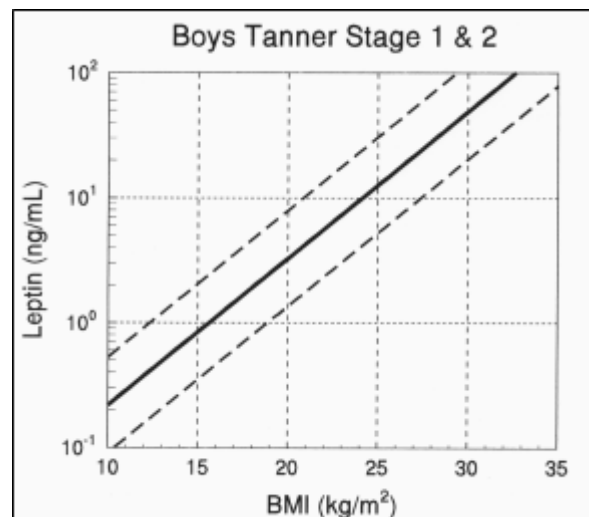
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Percentile (µg/L)				
	1	5	50	95	99
11	0,22	0,30	0,66	1,45	1,99
12	0,28	0,39	0,85	1,86	2,56
13	0,36	0,50	1,09	2,38	3,29
14	0,46	0,64	1,40	3,06	4,22
15	0,60	0,82	1,79	3,93	5,42
16	0,76	1,05	2,30	5,04	6,96
17	0,98	1,35	2,95	6,47	8,93
18	1,25	1,73	3,79	8,31	11,5
19	1,61	2,22	4,87	10,7	14,7
20	2,07	2,85	6,25	13,7	18,9
21	2,65	3,66	8,03	17,6	24,3
22	3,41	4,70	10,3	22,6	31,2
23	4,37	6,03	13,2	29,0	40,0
24	5,62	7,75	17,0	37,2	51,4
25	7,21	9,95	21,8	47,8	65,9
26	9,26	12,8	28,0	61,4	84,7
27	11,9	16,4	35,9	78,8	109,0
28	15,3	21,1	46,1	101,0	140,0
29	19,6	27,0	59,2	130,0	
30	15,2	34,7	76,1		
31	32,3	44,6	97,7		
32	41,5	57,2	125,0		
33	53,2	73,4			
34	68,4	94,3			
35	87,8	121,0			
36	113,0				
37	145,0				

**Tabella 3 – Ragazzi in Stadio di Tanner 1 e 2**

IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Percentile (µg/L)				
	1	5	50	95	99
11	0,08	0,12	0,29	0,69	0,99
12	0,01	0,16	0,38	0,91	1,30
13	0,14	0,20	0,49	1,19	1,71
14	0,19	0,26	0,65	1,56	2,24
15	0,24	0,35	0,85	2,04	2,93
16	0,32	0,46	1,11	2,68	3,84
17	0,41	0,60	1,45	3,51	5,04
18	0,55	0,79	1,90	4,60	6,60
19	0,72	1,03	2,50	6,03	8,66
20	0,94	1,35	3,27	7,90	11,3
21	1,24	1,77	4,29	10,4	14,9
22	1,62	2,33	5,62	13,6	19,5
23	2,12	3,05	7,37	17,8	25,5
24	2,78	3,99	9,66	23,3	33,5
25	3,65	5,24	12,7	30,6	43,9
26	7,78	6,87	16,9	40,1	57,5
27	6,27	9,0	21,7	52,5	75,4
28	8,22	11,8	28,5	68,9	98,8
29	10,7	15,5	37,4	90,3	129,0
30	14,1	20,3	48,9	118,0	
31	18,5	26,6	64,2		
32	24,3	34,8	84,1		
33	31,8	45,6	110,0		
34	41,7	59,8	144,0		
35	54,6	78,4			
36	71,6	102,0			
37	93,9	134,0			
38	123,0				



**Fig. 2 – Intervalli di riferimento per concentrazioni sieriche umane in base all'IMC: Ragazze in Stadio di Tanner 1 + 2 (vedere testo).**



**Fig. 3 – Intervalli di riferimento per concentrazioni sieriche umane in base all'IMC: Ragazzi in Stadio di Tanner 1 + 2 (vedere testo).**

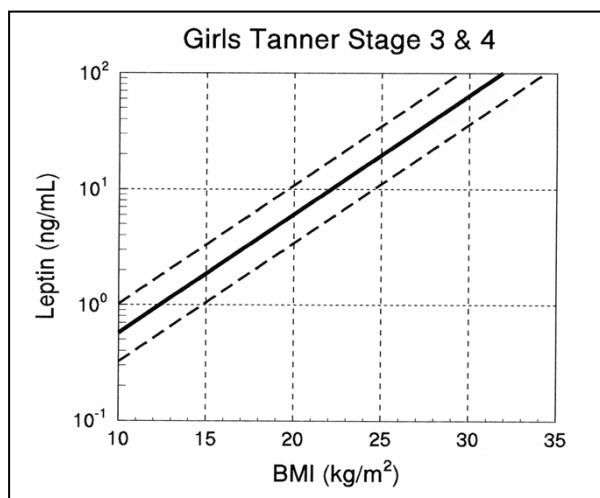


**Tabelle 4 – Ragazze in Stadio di Tanner 3 e 4**

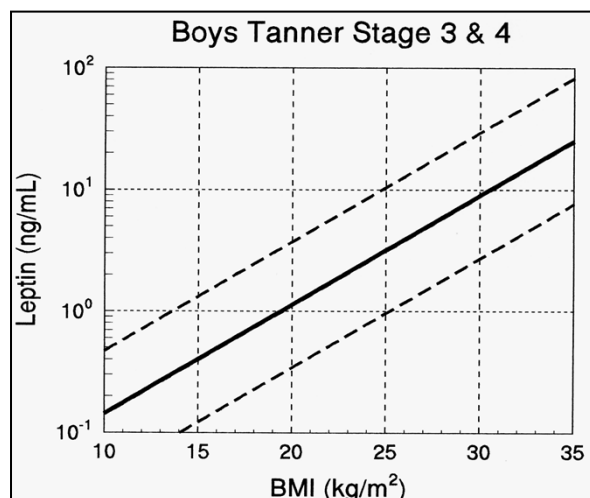
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Percentile (µg/L)				
	1	5	50	95	99
11	0,32	0,41	0,73	1,29	1,63
12	0,41	0,52	0,92	1,63	2,06
13	0,52	0,66	1,16	2,07	2,61
14	0,65	0,83	1,47	2,61	3,31
15	0,83	1,05	1,87	3,31	4,19
16	1,05	1,33	2,36	4,19	5,30
17	1,33	1,68	2,99	5,30	6,71
18	1,68	2,13	3,78	6,71	8,49
19	2,13	2,69	4,79	8,5	10,8
20	2,69	3,41	6,06	10,7	13,6
21	3,41	4,31	7,67	13,61	17,2
22	4,32	5,46	9,71	17,2	21,8
23	5,46	6,91	12,3	21,8	27,6
24	6,91	8,75	15,6	27,6	34,9
25	8,75	11,1	19,7	34,9	44,2
26	11,1	14,0	24,9	44,2	56,0
27	14,0	17,7	31,6	56,0	70,9
28	17,8	22,5	39,9	70,9	89,7
29	22,5	28,4	50,5	89,7	114,0
30	28,4	36,0	63,9	114,0	144,0
31	36,0	45,6	80,9	144,0	
32	45,6	57,7	80,2	144,0	
33	57,7	73,0	102,0		
34	73,0	92,4	130,0		
35	92,4	117,0			
36	117,0	148,0			
37	148,0				

**Tabella 5 – Ragazzi in Stadio di Tanner 3 e 4**

IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Percentile (µg/L)				
	1	5	50	95	99
11	0,03	0,05	0,18	0,58	0,94
12	0,04	0,07	0,22	0,71	1,16
13	0,49	0,08	0,27	0,88	1,43
14	0,06	0,10	0,33	1,08	1,75
15	0,07	0,12	0,40	1,32	2,16
16	0,09	0,15	0,49	1,63	2,65
17	0,11	0,18	0,61	2,00	3,26
18	0,14	0,23	0,75	2,46	4,01
19	0,17	0,28	0,92	3,03	4,93
20	0,21	0,34	1,13	3,72	6,06
21	0,26	0,42	1,39	4,58	7,46
22	0,32	0,52	1,71	5,63	9,17
23	0,39	0,64	2,10	6,92	11,3
24	0,48	0,78	2,58	8,51	13,9
25	0,59	0,96	3,18	10,5	17,0
26	0,73	1,19	3,91	12,9	21,0
27	0,89	1,46	4,80	15,8	25,8
28	1,10	1,79	5,90	19,4	31,7
29	1,35	2,20	7,26	23,9	39,0
30	1,66	2,71	8,93	29,4	48,0
31	2,05	3,33	11,0	36,2	58,9
32	2,51	4,09	13,5	44,5	72,4
33	3,09	5,04	16,6	54,7	89,1
34	3,80	6,20	20,4	67,2	109,0
35	4,68	7,62	25,1	82,6	134,0
36	5,75	9,37	30,9	101,0	
37	7,07	11,5	37,9	124,0	
38	8,7	14,2	46,7		
39	10,7	17,4	57,4		
40	13,1	21,4	70,5		



**Fig. 4 – Intervalli di riferimento** per concentrazioni sieriche umane in base all'IMC: Ragazze in Stadio di Tanner 3 + 4 (vedere testo).



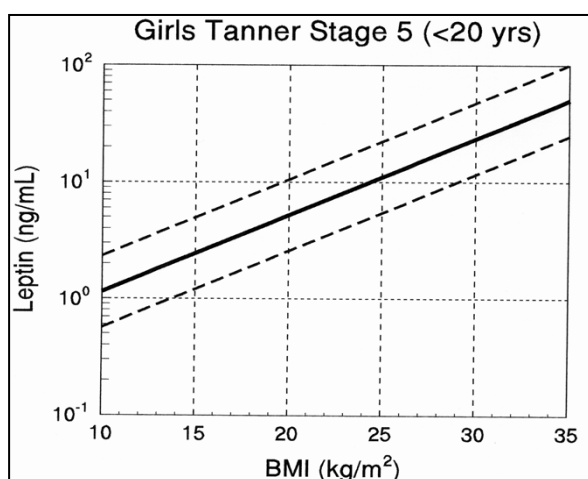
**Fig. 5 – Intervalli di riferimento** per concentrazioni sieriche umane in base all'IMC: Ragazzi in Stadio di Tanner 3 + 4 (vedere testo).

**Tabella 6 – Ragazze in Stadio di Tanner 5**

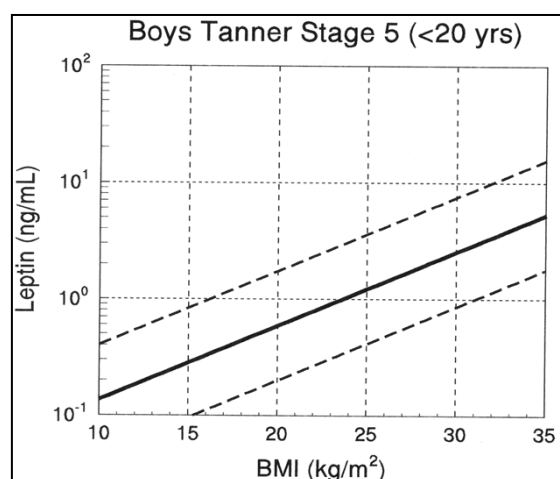
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Percentile (µg/L)				
	1	5	50	95	99
11	0,50	0,66	1,34	2,71	3,62
12	0,58	0,77	1,56	3,15	4,21
13	0,67	0,89	1,81	3,67	4,89
14	0,78	1,04	2,11	4,26	5,69
15	0,91	1,21	2,45	4,96	6,62
16	1,05	1,41	2,85	5,76	7,70
17	1,22	1,64	3,31	6,70	8,95
18	1,42	1,90	3,85	7,79	10,4
19	1,66	2,21	4,48	9,06	12,1
20	1,93	2,57	5,20	10,5	14,1
21	2,24	2,99	6,05	12,3	16,4
22	2,60	3,48	7,03	14,2	19,0
23	3,03	4,04	8,18	16,6	22,1
24	3,52	4,70	9,51	19,3	25,7
25	4,09	5,46	11,0	22,4	29,9
26	4,76	6,35	12,9	26,0	34,8
27	5,53	7,39	15,0	30,3	40,4
28	6,43	8,59	17,39	35,2	47,0
29	7,48	9,99	20,2	40,9	54,7
30	8,70	11,6	23,5	47,6	63,5
31	10,1	13,5	27,3	55,3	73,9
32	11,8	15,7	31,8	64,4	85,9
33	13,7	18,3	37,0	74,9	99,9
34	15,9	21,2	43,0	87,0	116,0
35	18,5	24,7	50,0	101,0	135,0
36	21,5	28,7	58,1	118,0	
37	25,0	33,4	67,6	137,0	
38	29,1	38,8	78,6		
39	33,8	45,1	91,4		
40	39,4	52,5	106,0		

**Tabella 7 – Ragazzi in Stadio di Tanner 5**

IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Percentile (µg/L)				
	1	5	50	95	99
11	0,03	0,05	0,16	0,47	0,73
12	0,04	0,06	0,18	0,54	0,84
13	0,05	0,07	0,21	0,62	0,97
14	0,05	0,08	0,24	0,72	1,12
15	0,06	0,10	0,28	0,84	1,30
16	0,07	0,11	0,33	0,97	1,51
17	0,08	0,13	0,38	1,12	1,74
18	0,1	0,15	0,44	1,3	2,02
19	0,11	0,17	0,51	1,50	2,34
20	0,13	0,2	0,59	1,74	2,7
21	0,15	0,23	0,68	2,01	3,13
22	0,17	0,27	0,79	2,33	3,62
23	0,20	0,31	0,91	2,69	4,19
24	0,23	0,36	1,05	3,12	4,85
25	0,27	0,41	1,22	3,61	5,62
26	0,31	0,48	1,41	4,17	6,5
27	0,36	0,55	1,63	4,83	7,52
28	0,41	0,64	1,89	5,59	8,71
29	0,48	0,74	2,19	6,47	10,1
30	0,55	0,86	2,54	7,49	11,7
31	0,64	1,00	2,94	8,67	13,5
32	0,74	1,15	3,4	10,0	15,6
33	0,86	1,33	3,94	11,6	18,1
34	0,99	1,54	4,55	13,4	20,9
35	1,15	1,79	5,27	15,6	24,2
36	1,33	2,07	6,10	18,0	28,1
37	1,54	2,39	7,06	20,8	32,5
38	1,78	2,77	8,17	24,1	37,6
39	2,06	3,21	9,46	27,9	43,5
40	2,38	3,71	10,9	32,3	50,3



**Fig. 6 – Intervalli di riferimento** per concentrazioni sieriche umane in base all'IMC: Ragazze in Stadio di Tanner 5 (vedere testo).



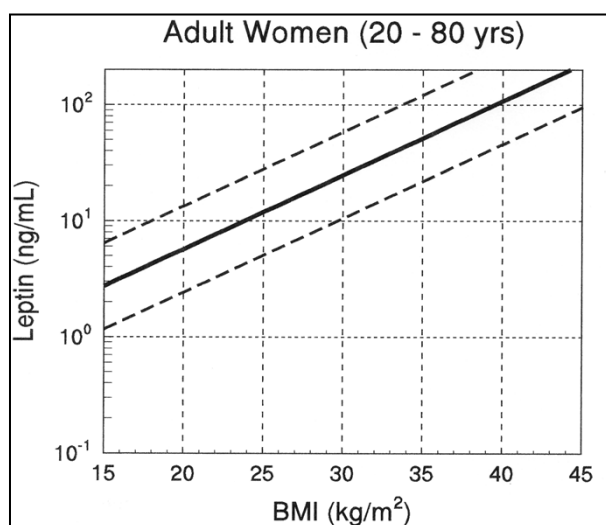
**Fig. 7 – Intervalli di riferimento** per concentrazioni sieriche umane in base all'IMC: Ragazzi in Stadio di Tanner 5 (vedere testo).

**Tabella 8 – Donne**

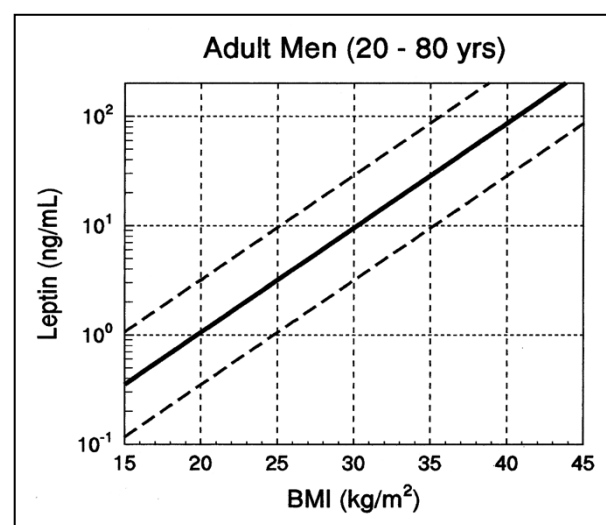
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Percentile (µg/L)				
	1	5	50	95	99
11	0,46	0,65	1,53	3,59	5,10
12	0,53	0,75	1,77	4,16	5,90
13	0,61	0,87	2,05	4,82	6,83
14	0,71	1,01	2,37	5,58	7,91
15	7,82	1,17	2,75	6,46	9,17
16	0,95	1,35	3,18	7,48	10,61
17	1,10	1,57	3,68	8,66	12,3
18	1,28	1,81	4,27	10,0	14,2
19	1,48	2,10	4,94	11,6	16,5
20	1,71	2,43	5,72	13,4	19,1
21	1,99	2,82	6,62	15,6	22,1
22	2,30	3,26	7,67	18,0	25,6
23	2,66	3,78	8,88	20,9	29,3
24	3,08	4,38	10,3	24,2	34,3
25	3,57	5,07	11,9	28,0	39,7
26	4,13	5,87	13,8	32,4	46,0
27	4,79	6,79	16,0	37,5	53,3
28	5,54	7,87	18,5	43,5	61,7
29	6,42	9,11	21,4	50,4	71,5
30	7,43	10,6	24,8	58,3	82,8
31	8,61	12,2	28,7	67,5	95,8
32	9,97	14,1	33,3	78,2	111,0
33	11,5	16,4	38,5	90,5	129,0
34	13,4	19,0	44,6	105,0	149,0
35	15,5	22,0	51,6	121,0	
36	17,9	25,4	59,8	141,0	
37	20,8	29,5	69,3		
38	24,0	34,1	80,2		
39	27,8	39,5	92,9		
40	32,2	45,7	108,0		

**Tabella 9 – Uomini**

IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Percentile (µg/L)				
	1	5	50	95	99
11	0,03	0,05	0,15	0,44	0,69
12	0,04	0,06	0,18	0,55	0,87
13	0,05	0,08	0,23	0,69	1,08
14	0,06	0,09	0,28	0,85	1,34
15	0,07	0,12	0,35	1,06	1,67
16	0,09	0,15	0,44	1,33	2,09
17	0,12	0,18	0,55	1,65	2,60
18	0,14	0,23	0,68	2,06	3,24
19	0,18	0,28	0,85	2,57	4,04
20	0,22	0,35	1,06	3,20	5,03
21	0,23	0,44	1,32	3,98	6,27
22	0,35	0,54	1,64	4,97	7,81
23	0,43	0,78	2,05	6,19	9,73
24	0,54	0,85	2,55	7,71	12,1
25	0,67	1,05	3,18	9,61	15,1
26	0,83	1,31	3,96	12,0	18,8
27	1,04	1,64	4,94	14,9	23,5
28	1,30	2,04	6,15	18,6	29,2
29	1,61	2,54	7,67	23,2	36,4
30	2,01	3,16	9,56	28,9	45,4
31	2,51	3,94	11,9	36,0	56,6
32	3,12	4,91	14,8	44,9	70,5
33	3,89	6,12	18,5	55,8	87,8
34	4,85	7,63	23,0	69,6	109,0
35	6,04	9,51	28,7	86,7	136,0
36	7,53	11,8	35,8	108,0	
37	9,38	14,8	44,6	135,0	
38	11,7	18,4	55,5		
39	14,6	22,9	69,2		
40	18,2	28,6	86,2		



**Fig. 8 – Intervalli di riferimento per concentrazioni sieriche umane in base all'IMC: Donne (vedere testo).**



**Fig. 9 – Intervalli di riferimento per concentrazioni sieriche umane in base all'IMC: Uomini (vedere testo).**

### 13 Proprietà e validazione del saggio

#### 13.1 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica di Leptin Sensitiv ELISA E077 corrisponde a 0,01 ng/mL (valore del bianco più doppio della deviazione standard del valore del bianco).

#### 13.2 Recupero ed esattezza

È stata aggiunta leptina ricombinante (OMS/NIBSC IS 97/594; 15, 16) al tampone di diluizione **DIL** e ai campioni di siero. È stato così misurato il contenuto di leptina dei campioni così arricchiti e calcolato il rispettivo recupero. I risultati sono riportati nella Tabella 10.

**Tabella 10** – Recupero relativo della leptina in campioni di siero [%] secondo OMS/NIBSC 97/594

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

#### 13.3 Accuratezza

I coefficienti di variazione inter-saggio e intra-saggio sono entrambi notevolmente inferiori al 10%. La Tabella 11 e la Tabella 12 riportano determinazioni di esempio.

**Tabella 11** Varianza inter-saggio

	Valore medio [ng/mL]	Deviazione standard [ng/mL]	CV [%]
Campione 1	2,04	0,147	7,2
Campione 2	6,93	0,423	6,1
Campione 3	14,86	1,11	7,5

**Tabella 12** Varianza intra-saggio

	Valore medio [ng/mL]	Deviazione standard [ng/mL]	CV [%]
Campione 1	22,44	1,28	4,35
Campione 2	4,1	0,108	2,63

#### 13.4 Linearità

Diluizioni da 1:5 fino a 1:320 sono state testate con quattro campioni sierici. I valori misurati di leptina sono raffigurati nella Tabella 13.

**Tabella 13** – Diluizioni di campioni sierici da 1:5 a 1:320

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

### 13.5 Interferenza

L'interferenza di emoglobina, bilirubina e trigliceridi sulla determinazione della leptina è stata testata attraverso l'aggiunta di diverse quantità di queste sostanze a campioni di siero umani. I valori misurati inclusi nella Tabella 14 mostrano che né la bilirubina né i trigliceridi o l'emoglobina nelle concentrazioni massime indicate influiscono sulla misurazione di leptina nel siero umano.

**Tabella 14 – Interferenze.** Qui viene mostrata la quantità relativa [%] di leptina misurata confrontando il siero arricchito con il siero nativo

	<b>Trigliceridi 100 mg/mL</b>	<b>Bilirubina 200 mg/mL</b>	<b>Emoglobina 1 mg/mL</b>
<b>Campione 1</b>	95	101	94
<b>Campione 2</b>	107	105	105
<b>Campione 3</b>	111	101	101

### 14 Riferimenti

1. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 372:425-432.
2. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, et al. 1995 Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 269:543-546.
3. MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. 1995 Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:9034-9037.
4. Rentsch J, Chiesi M. 1996 Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. *FEBS Lett*. 379:55-59.
5. Wabitsch M, Jensen PB, Blum WF, et al. 1996 Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes*. 45:1435-1438.
6. Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, et al. 1995 The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature*. 377:530-532.
7. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. 1995 Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 269:546-549.
8. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, et al. 1995 Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. 269:540-543.
9. Levin N, Nelson C, Gurney A, Vandlen R, de-Sauvage F. 1996 Decreased food intake does not completely account for adiposity reduction after ob protein infusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:1726-1730.
10. Sinha MK, Ohannesian JP, Heimann ML, et al. 1996 Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest*. 97:1344-1347.
11. Havel PJ, Kasim-Karakas S, Dubuc GR, Mueller W, Phinney SD. 1996 Gender difference in plasma leptin concentrations. *Nature Med*. 2:949-950.
12. Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J, et al. 1996 Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab*. 81:3424-3427.
13. Hassink SG, Sheslow DV, de Lancey E, Opentanova I, Considine RV, Caro JF 1996 Serum leptin in children with obesity: relationship to gender and development. *Pediatrics*. 98:201-203.
14. Blum WF, Juul A; Reference ranges of serum leptin, s.318-326. In: *Leptin -the voice of adipose tissue*, Blum WF et al, eds., Johann Ambrosius Verlag, Heidelberg, 1997.
15. Robinson CJ, Gaines-Das R, Woollacott D, et al. 2001 The first international standard for human leptin and the first international standard for mouse leptin: comparison of candidate preparations by in vitro bioassays and immunoassays. *J Molecular Endocrinol*. 27: 69-76.
16. Adresse NIBSC: Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Great Britain; <https://www.nibsc.org>