



Leptin-EASIA

KAP2281

LOT : 140606/2



Read entire protocol before use.

Leptin-EASIA

I. INTENDED USE

Immunoenzymetric assay for the in vitro quantitative measurement of human Leptin in serum.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource Leptin-EASIA Kit
- B. **Catalogue number :** KAP2281 : 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CLINICAL BACKGROUND

A. Biological activities

Leptin, the product of the *ob* gene, is a hormone secreted by adipocytes (1). Animals with mutations in the *ob* gene are obese, diabetic and have reduced activity (2). Administration of recombinant leptin to these animals decreases food intake and causes weight loss. In humans, this type of mutation has not been found.

Human leptin cDNA encodes a 167 amino acid non-glycosylated protein including a 21 AA signal peptide, which is cleaved to give mature human leptin. The human receptor for leptin (OB-R) has been identified (7) as a 1144 amino acid transmembrane glycoprotein. It is expressed in the choroid plexus and in the hypothalamus. Leptin is implicated in an increasing number of endocrine regulations including adiposity (3), satiety, energy homeostasis (4), puberty and fertility (5, 6).

B. Clinical application


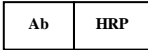

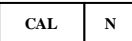
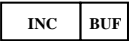


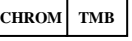
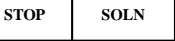
Little is known about the physiologic actions of leptin in humans. The availability of a sensitive and specific assay to measure concentrations of leptin in serum will accelerate our understanding.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DIASource Leptin-EASIA is a solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay performed on microtiterplate. The assay uses monoclonal antibodies (MAbs) directed against distinct epitopes of human Leptin. Calibrators and samples react with the capture monoclonal antibody (MAB 1) coated on microtiter well and with a monoclonal antibody (MAB 2) labelled with horseradish peroxidase (HRP). After an incubation period allowing the formation of a sandwich: coated MAB 1 – human Leptin – MAB 2 – HRP, the microtiterplate is washed to remove unbound enzyme labelled antibody. Bound enzyme-labelled antibody is measured through a chromogenic reaction. Chromogenic solution (TMB ready for use) is added and incubated. The reaction is stopped with the addition of Stop Solution and the microtiterplate is then read at the appropriate wavelength. The amount of substrate turnover is determined colourimetrically by measuring the absorbance, which is proportional to the Leptin concentration.

A calibration curve is plotted and Leptin concentration in samples is determined by interpolation from the calibration curve. The use of the EASIA reader (linearity up to 3 OD units) and a sophisticated data reduction method (polychromatic data reduction) result in a high sensitivity in the low range and in an extended calibration range.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 tests Kit	Color Code	Reconstitution
 Microtiterplate with 96 anti Leptin (monoclonal antibodies) coated wells	96 wells	blue	Ready for use
 Conjugate: HRP labelled anti-Leptin (monoclonal antibodies) in TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin, thymol and ProClin 300 (< 0.05%)	1 vial 11 ml	red	Ready for use
 Zero Calibrator in bovine serum with thymol	1 vial lyophil.	yellow	Add 1 ml distilled water
 Calibrator N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in bovine serum with thymol	5 vials lyophil.	yellow	Add 0.5 ml distilled water
 Incubation Buffer: TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin, thymol and ProClin 300 (< 0.05%)	1 vial 6 ml	black	Ready for use
 Wash Solution (Tris-HCl)	1 vial 10 ml	brown	Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
 Controls - N = 1 or 2 in human plasma with benzamidin and thymol	2 vials lyophil.	silver	Add 0.5 ml distilled water
 Chromogenic TMB Solution	1 vial 25 ml	white	Ready for use
 Stop Solution: HCl 2N	1 vial 25 ml	white	Ready for use

Note: 1. Use Zero Calibrator for sample dilutions.
2. 1 ng of the calibrator preparation is equivalent to 1 ng of the NIBSC 1st IS 97/594.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

- High quality distilled water
- Pipettes for delivery of: 50 µl, 100 µl, 500 µl and 1 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- Vortex mixer
- Magnetic stirrer
- Horizontal microtiterplate shaker capable of 700 rpm ± 100 rpm

- Washer for Microtiterplates
- Microtiterplate reader capable of reading at 450 nm, 490 nm and 650 nm (in case of polychromatic reading) or capable of reading at 450 nm and 650 nm (bichromatic reading)
- Optional equipment: The ELISA-AID™ necessary to read the plate according to polychromatic reading (see paragraph XI.A.) can be purchased from Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

VII. REAGENT PREPARATION

- Calibrators:** Reconstitute the zero calibrator with 1 ml distilled water and the other calibrators with 0.5 ml distilled water.
- Controls:** Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- Working Wash solution:** Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 199 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (200x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the vial label, if kept at 2 to 8°C.
- Unused strips must be stored, at 2-8°C, in a sealed bag containing a desiccant until expiration date.
- After reconstitution, calibrators and controls should be frozen immediately after use and kept at -20°C for 3 months. Only one freeze thawing cycle is allowed, discard the calibrators and controls after the second use.
- The concentrated Wash Solution is stable at room temperature until expiration date.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, the conjugate is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum must be kept at 2 - 8°C.
- If the test is not run within 24 hours, storage in aliquots at -20°C is recommended. Avoid subsequent freeze thaw cycles.
- Prior to use, all samples should be at room temperature. It is recommended to vortex the samples before use.
- Do not use haemolysed samples.
- Do not use lipemic samples.

X. PROCEDURE

- Handling notes**
Do not use the kit or components beyond expiry date.
Do not mix materials from different kit lots.
Bring all the reagents to room temperature prior to use.
Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
Perform calibrators, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.
Use a clean plastic container to prepare the Wash Solution.
In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.
For the dispensing of the Chromogenic Solution and the Stop Solution avoid pipettes with metal parts.
High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
Respect the incubation times.
To avoid drift, the time between pipetting of the first calibrator and the last sample must be limited to the time mentioned in section XIII paragraph E (Time delay).
Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.
Dispense the Chromogenic Solution within 15 minutes following the washing of the microtiterplate.
During incubation with Chromogenic Solution, avoid direct sunlight on the microtiterplate.

B. Procedure

- Select the required number of strips for the run. The unused strips should be resealed in the bag with a desiccant and stored at 2-8°C.
- Secure the strips into the holding frame.
- Pipette 50 µl of each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.
- Pipette 100 µl of anti-Leptin-HRP conjugate into all the wells.
- Pipette 50 µl of Incubation Buffer into all the wells

6. Incubate for 2 hours at room temperature on a horizontal shaker set at 700 rpm \pm 100 rpm.
7. Aspirate the liquid from each well.
8. Wash the plate 4 times by:
 - Dispensing 0.4 ml of Wash Solution into each well
 - Aspirating the content of each well
9. Pipette 100 μ l of Chromogenic Solution into each well within 15 minutes following the washing step.
10. Incubate the microtiterplate for 30 minutes at room temperature on a horizontal shaker set at 700 rpm \pm 100 rpm, avoid direct sunlight.
11. Pipette 200 μ l of Stop Solution into each well.
12. Read the absorbencies at 450 nm and 490 nm (reference filter 630 nm or 650 nm) within 3 hours and calculate the results as described in section XI.

XI. CALCULATION OF RESULTS

A. Polychromatic Reading:

1. In this case, the ELISA-AID™ software will do the data processing.
2. The plate is first read at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
3. A second reading is performed at 490 nm against the same reference filter.
4. The ELISA-AID™ Software will drive the reader automatically and will integrate both readings into a polychromatic model. This technique can generate OD's up to 10.
5. The principle of polychromatic data processing is as follows:
 - $X_i = OD$ at 450 nm
 - $Y_i = OD$ at 490 nm
 - Using a standard unweighted linear regression, the parameters A & B are calculated : $Y = A \cdot X + B$
 - If $X_i < 3$ OD units, then X calculated = X_i
 - If $X_i > 3$ OD units, then X calculated = $(Y_i - B)/A$
 - A 4-parameter logistic curve fitting is used to build up the calibration curve.
 - The Leptin concentration in samples is determined by interpolation on the calibration curve.

B. Bichromatic Reading

1. Read the plate at 405 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
2. Calculate the mean of duplicate determinations.
3. On semi-logarithmic or linear graph paper plot the OD values (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of Leptin (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points by connecting the plotted points with straight lines.
4. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
5. Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.

XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

Leptin-EASIA		OD units
		Polychromatic model
Calibrator	0 ng/ml	0.019
	0.5 ng/ml	0.058
	1 ng/ml	0.106
	4.8 ng/ml	0.577
	27 ng/ml	3.052
	60 ng/ml	5.368

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection Limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations above the average OD at zero binding, was 0.04 ng/ml.

B. Specificity

No significant cross-reaction was observed in presence of 3 μ g/ml of IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, TNF- α , TNF- β , IFN- γ , IP-10, ScF, GRO α , OSM, LIF, MCP-1, RANTES, PDGF, G-CSF, EGF, IL-12, PF4, MIG, C-peptide, IGF-1, IGF-2, Insulin & Glucagon.

C. Precision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)
A	10	1.5 \pm 0.2	13.3	A	20	5.9 \pm 0.6	10.2
B	10	9.0 \pm 0.9	10.0	B	20	18.9 \pm 2.4	12.7
C	10	43.4 \pm 1.5	3.5				

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

RECOVERY TEST

Sample	Added Leptin (ng/ml)	Theoretical Concent. (ng/ml)	Recovered Leptin (ng/ml)	Recovery (%)
Serum 1	0	7.2	7.6	105.6
	0.5	7.7	7.9	102.6
	2.4	9.6	9.1	94.8
	13.5	20.7	16.9	81.6
	30	37.2	34.5	92.7
Serum 2	0	13.3	12.4	93.2
	0.5	13.8	12.9	93.5
	2.4	15.7	14.5	92.4
	13.5	26.8	24.2	90.3
	30	43.3	38.6	89.1

DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Concent. (ng/ml)	Measured Concent. (ng/ml)
Serum 1	1/1	-	31.8
	1/2	15.9	15.6
	1/4	8.0	7.9
	1/8	4.0	3.9
	1/16	2.0	1.9
	1/32	1.0	0.8
Serum 2	1/1	-	32.8
	1/2	16.4	17.8
	1/4	8.2	8.3
	1/8	4.1	3.7
	1/16	2.1	1.7
	1/32	1.0	0.7

Samples were diluted with zero calibrator

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 40 minutes after the calibrators have been added to the coated wells.

TIME DELAY

Sample ng/ml	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min
1	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0
2	4.8	5.1	4.8	5.1	5.0
3	19.3	19.7	19.7	19.7	19.4
4	40.9	39.9	38.0	40.8	39.4

F. Hook effect

A sample spiked with 350 ng/ml Leptin gives higher OD's than the last calibrator point.

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.

- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots. Controls that contain azide will interfere with the enzymatic reaction and cannot be used.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises
- It is recommended that controls be routinely assayed as unknown samples to measure assay variability. The performance of the assay should be monitored with quality control charts of the controls.
- It is good practise to check visually the curve fit selected by the computer.

XV. REFERENCE INTERVALS

These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

Women (ages 16 to 80)				
BMI	n	Mean	SD	Range (ng/ml)
14-18	4	0.6	0.1	0.5 – 0.7
18-24	28	3.4	2.3	0.5 – 7.9
25-29	20	8.8	3.3	4.1 – 14.5
30-56	36	23.0	10.0	5.5 – 40.4

Men (ages 15 to 78)				
BMI	n	Mean	SD	Range (ng/ml)
14-18	1	0.5	-	-
18-24	20	1.2	0.9	0.5 – 3.2
25-29	27	4.2	3.9	0.5 – 14.6
30-56	23	10	10.5	2.5 – 42.1

The range is expressed as 2.5% to 97.5% percentiles.

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with all reagents, Stop Solution contains HCl. In case of contact, wash thoroughly with water.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

XVII. BIBLIOGRAPHY

1. FRIEMAN J. and al. (1998)
Leptin and regulation of body weight in mammals.
Nature ,395:763-769.
2. SMITH F.J. and al. (1998)
Brain administration of OB protein inhibits neuropeptide-Y- induced feeding of ob/ob mice.
Regulatory Peptides,75-76:433-439.
3. GUILLAUME M. and al. (1996)
Obesity in children,environmental and genetic aspects.
Horm. Metab. Res., 28 : 573-581.
4. KEIM N.L.and al. (1998)
Relation between circulating leptin cocentrations and appetite during a prolonged, moderate energy deficit in women.
American journal of Clinical Nutrition,68:794-801.
5. LEPERCQ J.and al. (1998)
Overexpression of placental leptin in diabetic pregnancy.
Diabetes,47:847-850.

6. MIYAKAWA M. and al.(1998)
Effect of growth hormone on serum concentrations of leptin : study in patients with acromegaly and GH deficiency.
The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism ,83:3476-3479.
7. TARTAGLIA L.A .and al.(1995)
Identification and expression cloning of a leptin receptor OR.
Cell , 83 (7):1263-1271.
8. CONSIDINE R..V. and al.(1996)
Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans.
N. Engl. J. Med., 334(5):292-295.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	CALIBRATORS (µl)	SAMPLE(S) CONTROLS (µl)
Calibrators (0-5) Samples, Controls	50 -	- 50
Anti-Leptin-HRP Conjugate	100	100
Incubation Buffer	50	50
Incubate for 2 hours at room temperature with continuous shaking at 700 rpm. Aspirate the contents of each well. Wash 4 times with 400 µl of Wash Solution and aspirate.		
Chromogenic Solution (TMB)	100	100
Incubate for 30 min at room temperature with continuous shaking at 700 rpm.		
Stop Solution	200	200
Read on a microtiterplate reader and record the absorbance of each well at 450 nm (and 490 nm) versus 630 (or 650 nm)		

DIAsource Catalogue Nr : KAP2281	P.I. Number : 1700656/en	Revision nr : 140606/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Revision date : 2014-06-06

Lea todo el protocolo antes de usar.

Leptin-EASIA

I. INDICACIONES

Ensayo inmunoenzimométrico para la determinación cuantitativa in vitro de leptina humana en suero.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre comercial:** Kit DIAsource Leptin-EASIA
- B. **Número de catálogo:** KAP2281: 96 pruebas
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

Para recibir asistencia técnica o información sobre pedidos contacte con:
Tel: +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. ANTECEDENTES CLÍNICOS

A. Actividades biológicas

La leptina, producto del gen *ob*, es una hormona secretada por los adipocitos (1). Los animales con mutaciones en el gen *ob* son obesos, diabéticos y presentan menor actividad (2). La administración de leptina recombinante a estos animales hace que disminuyan la ingesta de alimentos y provoca la pérdida de peso. Este tipo de mutación no se ha encontrado en los seres humanos.

El ADNc de la leptina humana codifica una proteína no glicosilada de 167 aminoácidos que incluye un péptido señal de 21 AA, el cual se escinde para producir leptina humana madura. El receptor humano de la leptina (OB-R) ha sido identificado (7) como una glicoproteína transmembrana de 1144 aminoácidos. Se expresa en el plexo coroideo y en el hipotálamo. La leptina está implicada en un número cada vez mayor de regulaciones endocrinas, incluyendo la adiposidad (3), la saciedad, la homeostasis de la energía (4), la pubertad y la fertilidad (5, 6).

B. Aplicación clínica

Se sabe poco sobre las acciones fisiológicas de la leptina en los seres humanos. Disponer de un ensayo sensible y específico para determinar las concentraciones séricas de leptina acelerará nuestra comprensión.


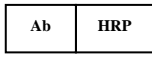
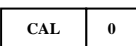
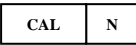
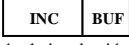
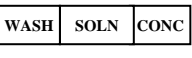
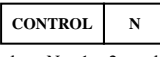
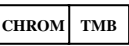
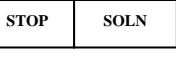
IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

DIASource Leptin-EASIA es un inmunoensayo enzimático de sensibilidad amplificada en fase sólida que se realiza en placa de microvaloración. El ensayo utiliza anticuerpos monoclonales (AcM) dirigidos contra distintos epítomos de leptina humana. Los calibradores y las muestras reaccionan con el anticuerpo monoclonal de captura (AcM 1) que recubre el pocillo de microvaloración y con un anticuerpo monoclonal (AcM 2) marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Tras un período de incubación que permite la formación de un sándwich:

AcM 1 recubierto — leptina humana — AcM 2 — HRP, se lava la placa de microvaloración para eliminar el anticuerpo marcado con enzimas no unidas. El anticuerpo marcado con enzimas unidas se mide a través de una reacción cromogénica. Se añade la solución cromogénica (TMB lista para usar) y se incubaba. Se detiene la reacción añadiendo solución de parada y a continuación se lee la placa de microvaloración a la longitud de onda adecuada. La cantidad de sustrato transformado se determina colorimétricamente midiendo la absorbancia, que es proporcional a la concentración de leptina.

Se representa una curva de calibración y se determina la concentración de leptina de las muestras mediante interpolación en la curva de calibración. El uso del lector de EASIA (linealidad hasta 3 unidades de DO) y de un método sofisticado de reducción de datos (reducción de datos policromáticos) da lugar a una sensibilidad alta en el intervalo bajo y a un intervalo de calibración extendido.

V. REACTIVOS PROPORCIONADOS

Reactivos	Kit de 96 pruebas	Código de color	Reconstitución
 Placa de microvaloración de 96 pocillos recubiertos con anti-leptina (anticuerpos)	96 pocillos	azul	Listo para usar
 Conjugado: Anti-leptina marcada con HRP (anticuerpos monoclonales) en tampón de maleato-TRIS con albúmina de suero bovino, timol y ProClin 300 (< 0,05 %).	1 vial 11 ml	rojo	Listo para usar
 Calibrador cero en suero bovino con timol	1 vial liofil.	amarillo	Añadir 1 ml de agua destilada
 Calibrador N = 1 a 5 (véanse los valores exactos en las etiquetas del vial) en suero bovino con timol	5 viales liofil.	amarillo	Añadir 0,5 ml de agua destilada
 Tampón de incubación: Tampón de maleato-TRIS con albúmina de suero bovino, timol y ProClin 300 (< 0,05 %)	1 vial 6 ml	negro	Listo para usar
 Solución de lavado (Tris-HCl)	1 vial 10 ml	marrón	Diluir 200 x con agua destilada (usar un agitador magnético)
 Controles - N = 1 o 2 en plasma humano con benzamida y timol	2 viales liofil.	plata	Añadir 0,5 ml de agua destilada
 Solución de TMB cromogénica	1 vial 25 ml	blanco	Listo para usar
 Solución de parada: HCl 2N	1 vial 25 ml	blanco	Listo para usar

Nota: 1. Usar el calibrador cero para las diluciones de la muestra.
2. 1 ng de la preparación del calibrador es equivalente a 1 ng del 1^{er} estándar internacional 97/594 del NIBSC.

VI. SUMINISTROS NO PROPORCIONADOS

El material siguiente es necesario pero no se proporciona en el kit:

1. Agua destilada de alta calidad

2. Pipetas para dispensación de: 50 µl, 100 µl, 500 µl y 1 ml (se recomienda usar pipetas de precisión con puntas de plástico desechables)
3. Agitador tipo vórtex
4. Agitador magnético
5. Agitador de placas de microvaloración con capacidad de 700 rpm ± 100 rpm
6. Lavador de placas de microvaloración
7. Lector de placas de microvaloración con capacidad para leer a 450, 490 y 650 nm (en el caso de lectura policromática) o con capacidad para 450 y 650 nm (lectura bicromática).
8. Equipo opcional: El software ELISA-AIDTM que hace falta para leer la placa según la lectura policromática (véase el párrafo XI.A.) se puede adquirir en Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 EE UU.

VII. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- A. **Calibradores:** reconstituya el calibrador cero con 1 ml de agua destilada y los otros calibradores con 0,5 ml de agua destilada.
- B. **Controles:** reconstituya los controles con 0,5 ml de agua destilada.
- C. **Solución de lavado de trabajo:** prepare un volumen adecuado de solución de lavado de trabajo añadiendo 199 volúmenes de agua destilada a 1 volumen de solución de lavado (200 x). Use un agitador magnético para homogeneizar. Deseche la solución de lavado de trabajo no utilizada al final de la jornada.

VIII. CONSERVACIÓN Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir o de la reconstitución, todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad, indicada en la etiqueta del vial, si se conservan entre 2 y 8 °C.
- Las tiras sin usar deben conservarse entre 2 y 8 °C en una bolsa sellada que contenga desecante hasta la fecha de caducidad.
- Tras la reconstitución, los calibradores y los controles deben congelarse de inmediato después de usar y conservarse a -20 °C durante 3 meses. Solo se permite un ciclo de congelación/descongelación, deseche los calibradores y controles después del segundo uso.
- La solución de lavado concentrada es estable a temperatura ambiente hasta la fecha de caducidad.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada deberá utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el conjugado se mantiene estable hasta la fecha de caducidad si se conserva en el vial original bien cerrado entre 2 y 8 °C.
- Las alteraciones del aspecto físico de los reactivos del kit pueden indicar inestabilidad o deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- El suero debe conservarse entre 2 y 8 °C.
- Si la prueba no se realiza antes de 24 horas se recomienda conservar en partes alícuotas a -20 °C. Evite ciclos posteriores de congelación y descongelación.
- Todas las muestras deben estar a temperatura ambiente antes de usar. Se recomienda agitar las muestras en un vórtex antes de usar.
- No utilice muestras hemolizadas.
- No utilice muestras lipémicas.

X. PROCEDIMIENTO

A. Notas sobre la manipulación

- No utilice el kit o sus componentes pasada la fecha de caducidad.
- No mezcle materiales de distintos lotes de kit.
- Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de usar. Mezcle bien todos los reactivos y muestras agitándolos o revolviéndolos suavemente.
- Realice los calibradores, los controles y las muestras por duplicado. Se recomienda alinear verticalmente.
- Utilice un recipiente de plástico limpio para preparar la solución de lavado.
- Para prevenir que se produzca contaminación cruzada, utilice una punta de pipeta desechable al añadir cada reactivo y muestra.
- No utilice pipetas con partes metálicas para dispensar la solución cromogénica y la solución de parada.
- Las pipetas de alta precisión o un equipo de pipeteo automatizado mejorarán la precisión.
- Respete los tiempos de incubación.
- Para que no haya desvíos, el tiempo entre el pipeteo del primer calibrador y la última muestra debe limitarse al tiempo indicado en el apartado XIII, párrafo E (Tiempo de demora).
- Prepare una curva de calibración para cada análisis, no utilice datos de análisis anteriores.
- Dispense la solución cromogénica antes de transcurridos 15 minutos desde el lavado de la placa de microvaloración.
- Durante la incubación con solución cromogénica, evite la luz solar directa en la placa de microvaloración.

B. Procedimiento

1. Seleccione el número necesario de tiras para el análisis. Las tiras no utilizadas deberían volverse a guardar herméticamente en la bolsa con un desecante y conservarse entre 2 y 8 °C.
2. Fije las tiras en el marco de soporte.
3. Pipetee 50 µl de cada calibrador, control y muestra en los pocillos adecuados.
4. Pipetee 100 µl del conjugado anti-leptina-HRP en todos los pocillos.
5. Pipetee 50 µl de tampón de incubación en todos los pocillos.
6. Incube durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador horizontal configurado a 700 ± 100 rpm.
7. Aspire el líquido de cada pocillo.
8. Lave la placa 4 veces:
 - Dispensando 0,4 ml de solución de lavado en cada pocillo
 - Aspirando el contenido de cada pocillo
9. Pipetee 100 µl de solución cromogénica en cada pocillo antes de 15 minutos después del paso de lavado.
10. Incube la placa de microvaloración durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador horizontal configurado a 700 ± 100 rpm y evite la luz solar directa.
11. Pipetee 200 µl de solución de parada en cada pocillo.
12. Lea las absorbancias a 450 y 490 nm (filtro de referencia a 630 o 650 nm) antes de 3 horas y calcule los resultados conforme se describe en el apartado XI.

XI. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

A. Lectura policromática

1. En este caso, el software ELISA-AID™ realizará el procesamiento de los datos.
2. La placa se lee primero a 450 nm con respecto a un filtro de referencia configurado a 650 nm (o 630 nm).
3. Se realiza una segunda lectura a 490 nm con respecto al mismo filtro de referencia.
4. El software ELISA-AID™ controlará el lector automáticamente e integrará ambas lecturas en un modelo policromático. Esta técnica puede generar densidades ópticas (DO) de hasta 10.
5. El principio del procesamiento de datos policromáticos es el siguiente:
 - $X_i = DO$ a 450 nm
 - $Y_i = DO$ a 490 nm
 - Utilizando una regresión lineal no ponderada estándar, se calculan los parámetros A y B: $Y = A \cdot X + B$
 - Si $X_i < 3$ unidades de DO, entonces la X calculada = X_i
 - Si $X_i > 3$ unidades de DO, entonces la X calculada = $(Y_i - B) / A$
 - Se emplea un ajuste de la curva logística de 4 parámetros para generar la curva de calibración.
 - La concentración de leptina de las muestras se determina mediante interpolación en la curva de calibración.

B. Lectura bicromática

1. Lea la placa a 405 nm con respecto a un filtro de referencia configurado a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcule la media de las determinaciones por duplicado.
3. Represente en papel milimetrado o semilogarítmico los valores de DO (en las ordenadas) de cada calibrador en función de la concentración correspondiente de leptina (abscisas) y trace una curva de calibración por los puntos de los calibradores conectando los puntos con líneas rectas.
4. Lea la concentración de cada control y muestra mediante interpolación en la curva de calibración.
5. La reducción de datos con programas informáticos simplificará estos cálculos. Si se emplea un procesamiento automático de los resultados, se recomienda un ajuste de la curva mediante función logística de 4 parámetros.

XII. DATOS TÍPICOS

Los datos siguientes son solo a efectos ilustrativos y no deben utilizarse nunca en lugar de la curva de calibración generada en tiempo real.

Leptin-EASIA		Unidades de DO Modelo policromático
Calibrador	0 ng/ml	0,019
	0,5 ng/ml	0,058
	1 ng/ml	0,106
	4,8 ng/ml	0,577
	27 ng/ml	3,052
	60 ng/ml	5,368

XIII. EFICACIA Y LIMITACIONES

A. Límite de detección

Se analizaron veinte calibradores cero junto con un conjunto de otros calibradores. El límite de detección, definido como la concentración aparente dos desviaciones estándar por encima del promedio de DO en la unión cero, fue de 0,04 ng/ml.

B. Especificidad

No se observó ninguna reacción cruzada significativa en presencia de 3 µg/ml de IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, TNFα, TNF-β, IFN-γ, IP-10, ScF, GROα, OSM, LIF, MCP-1, RANTES, PDGF, G-CSF, EGF, IL-12, PF4, MIG, péptido C, IGF-1, IGF-2, insulina y glucagón.

C. Precisión

INTRAENSAYO				INTERENSAYO			
Suero	N	<X> ± DE (ng/ml)	CV (%)	Suero	N	<X> ± DE (ng/ml)	CV (%)
A	10	1,5 ± 0,2	13,3	A	20	5,9 ± 0,6	10,2
B	10	9,0 ± 0,9	10,0	B	20	18,9 ± 2,4	12,7
C	10	43,4 ± 1,5	3,5				

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

D. Exactitud

PRUEBA DE RECUPERACIÓN

Muestra	Leptina añadida (ng/ml)	Concent. teórica (ng/ml)	Leptina recuperada (ng/ml)	Recuperación (%)
Suero 1	0	7,2	7,6	105,6
	0,5	7,7	7,9	102,6
	2,4	9,6	9,1	94,8
	13,5	20,7	16,9	81,6
	30	37,2	34,5	92,7
Suero 2	0	13,3	12,4	93,2
	0,5	13,8	12,9	93,5
	2,4	15,7	14,5	92,4
	13,5	26,8	24,2	90,3
	30	43,3	38,6	89,1

PRUEBA DE DILUCIÓN

Muestra	Dilución	Concent. teórica (ng/ml)	Concent. medida (ng/ml)
Suero 1	1/1	-	31,8
	1/2	15,9	15,6
	1/4	8,0	7,9
	1/8	4,0	3,9
	1/16	2,0	1,9
	1/32	1,0	0,8
	Suero 2	1/1	-
1/2		16,4	17,8
1/4		8,2	8,3
1/8		4,1	3,7
1/16		2,1	1,7
1/32		1,0	0,7

Las muestras se diluyeron con el calibrador cero.

E. Tiempo de demora entre el último calibrador y la dispensación de la muestra

Como se muestra a continuación, los resultados del ensayo siguen siendo precisos incluso cuando se dispensa una muestra 40 minutos después de haber añadido los calibradores a los pocillos recubiertos.

TIEMPO DE DEMORA

Muestra ng/ml	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min
1	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0
2	4,8	5,1	4,8	5,1	5,0
3	19,3	19,7	19,7	19,7	19,4
4	40,9	39,9	38,0	40,8	39,4

F. Efecto gancho

Una muestra a la que se añadieron 350 ng/ml de leptina arroja una DO más alta que el punto del último calibrador.

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el control 1 o el control 2 no se encuentran dentro del intervalo especificado en la etiqueta del vial, no se pueden utilizar dichos resultados, salvo que se proporcione una explicación satisfactoria sobre la discrepancia.
- Cada laboratorio puede, si lo desea, realizar sus propias mezclas de muestras control, que deberían conservarse congeladas en alícuotas. Los controles que contienen azida interferirán con la reacción enzimática por lo que no se pueden utilizar.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados duplicados de las muestras deben basarse en las Buenas Prácticas de Laboratorio.
- Se recomienda analizar los controles de forma rutinaria como muestras desconocidas para medir la variabilidad del ensayo. La eficacia del ensayo debe monitorizarse con gráficas de control de calidad de los controles.
- Es una buena práctica comprobar visualmente el ajuste de la curva seleccionada por el ordenador.

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores se proporcionan solo como guía; cada laboratorio debería establecer su propio intervalo de valores normales.

Mujeres (edad de 16 a 80 años)				
IMC	n	Media	DE	Intervalo (ng/ml)
14-18	4	0,6	0,1	0,5 - 0,7
18-24	28	3,4	2,3	0,5 - 7,9
25-29	20	8,8	3,3	4,1 - 14,5
30-56	36	23,0	10,0	5,5 - 40,4

Hombres (edad de 15 a 78 años)				
IMC	n	Media	DE	Intervalo (ng/ml)
14-18	1	0,5	-	-
18-24	20	1,2	0,9	0,5 - 3,2
25-29	27	4,2	3,9	0,5 - 14,6
30-56	23	10	10,5	2,5 - 42,1

El intervalo se expresa en percentiles del 2,5 y 97,5 %.

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Solo para uso diagnóstico *in vitro*.

Los componentes de la sangre humana incluidos en este kit se han analizado mediante métodos europeos aprobados y/o métodos aprobados por la FDA, siendo negativos para HBsAg, anti-VHC y anti-VIH-1 y 2. Ningún método conocido puede ofrecer una garantía total de que los hemoderivados humanos no transmitan hepatitis, SIDA u otras infecciones. Por tanto, la manipulación de reactivos y las muestras de suero debe realizarse de conformidad con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos y derivados de animales se han obtenido de animales sanos. Los componentes bovinos son originarios de países en los que no se ha notificado EEB. Sin embargo, los componentes que contengan sustancias animales deben tratarse como potencialmente infecciosos.

Evite el contacto con la piel de los reactivos; la solución de parada contiene HCl. En caso de contacto, lávese bien con agua.

No fume, beba, coma ni use cosméticos en la zona de trabajo. No pipetee con la boca. Lleve ropa protectora y guantes desechables.

XVII. BIBLIOGRAFÍA

- FRIEMAN J. and al. (1998)
Leptin and regulation of body weight in mammals.
Nature, 395:763-769.
- SMITH F.J. and al. (1998)
Brain administration of OB protein inhibits neuropeptide-Y-induced feeding of ob/ob mice.
Regulatory Peptides, 75-76:433-439.

- GUILLAUME M. and al. (1996)
Obesity in children, environmental and genetic aspects.
Horm. Metab. Res., 28: 573-581.
- KEIM N.L. and al. (1998)
Relation between circulating leptin concentrations and appetite during a prolonged, moderate energy deficit in women.
American journal of Clinical Nutrition, 68:794-801.
- LEPERCQ J. and al. (1998)
Overexpression of placental leptin in diabetic pregnancy.
Diabetes, 47:847-850.
- MIYAKAWA M. and al. (1998)
Effect of growth hormone on serum concentrations of leptin: study in patients with acromegaly and GH deficiency.
The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 83:3476-3479.
- TARTAGLIA L.A. and al. (1995)
Identification and expression cloning of a leptin receptor OR.
Cell, 83 (7):1263-1271.
- CONSIDINE R.V. and al. (1996)
Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans.
N. Engl. J. Med., 334(5):292-295.

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CALIBRADORES (µl)	MUESTRA(S) CONTROLES (µl)
Calibradores (0-5) Muestras, controles	50 -	- 50
Conjugado anti-leptina-HRP Tampón de incubación	100 50	100 50
Incuba durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación continua a 700 rpm. Aspire el contenido de cada pocillo. Lave 4 veces con 400 µl de solución de lavado y aspire.		
Solución cromogénica (TMB)	100	100
Incuba durante 30 min a temperatura ambiente con agitación continua a 700 rpm.		
Solución de parada	200	200
Lea en un lector de placas de microvaloración y registre la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (490 nm) frente a 630 (o 650 nm).		

N.º de catálogo de DIAsource: KAP2281	Número de I.P.: 1700656/es	N.º de revisión: 140606/1
---	-------------------------------	------------------------------

Fecha de revisión: 2014-06-06