



Instructions for Use

Leptin Sandwich ELISA

IVD



REF EIA-2395

Σ 96



DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße 18, 35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:



DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
 Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
 Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
 Por favor, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.
 Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.**

Introduced modifications / Durchgeführte Änderungen / Modifiche introdotte / Modificaciones introducidas	
The following changes have been made in comparison to the previous version: Im Vergleich zur Vorgängerversion wurden folgende Änderungen vorgenommen: Rispetto alla versione precedente, sono state apportate le seguenti modifiche: Se han introducido los siguientes cambios en comparación con la versión anterior:	
Detailed editorial revision. Changed wording in several chapters.	
1 INTENDED USE & 5 SAMPLE COLLECTION, STORAGE AND PREPARATION:	Plasma specified as Li-Heparin plasma .
2 PRINCIPLE OF THE TEST:	Updated wording. The principle itself did not change.
3 WARNINGS AND PRECAUTIONS	Completely reviewed
4.1 Materials provided with the kit:	Reference material for standards added.
4.2 Material required but not provided:	DRG Instruments Microtiter Plate Reader removed.
4.3 Storage and Stability of the Kit:	Addition of open kit stability with 8 weeks;
4.4 Reagent Preparation:	Correction for stability of diluted wash solution to 1 week ;
5.2 Samples Storage:	Storage at 2 °C - 8 °C extended from 24 hours to 2 months , long-time storage at -20 °C added with up to 24 months
6.2 Test Procedure:	Updated wording. The procedure did not change!
7 REFERENCE VALUES:	Updated values correlated to BMI, values for children added.
9.4.1 Intra Assay:	Correction of minor transfer mistakes.
10.1 Interfering Substances:	Information about biotin interference added.
10.3 High Dose Hook Effect:	Updated to 5000 ng/mL (old: 500 ng/mL);
12 REFERENCES / LITERATURE:	Addition of references # 13 - 15

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

1	INTENDED USE.....	3
2	PRINCIPLE OF THE TEST.....	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	4
4	MATERIALS.....	5
5	SAMPLE COLLECTION, STORAGE AND PREPARATION.....	7
6	ASSAY PROCEDURE.....	7
7	REFERENCE VALUES.....	9
8	QUALITY CONTROL.....	9
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	9
10	LIMITATIONS OF USE.....	11
11	LEGAL ASPECTS.....	11

1	ZWECKBESTIMMUNG.....	12
2	TESTPRINZIP.....	12
3	WARNUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN.....	12
4	MATERIALIEN.....	14
5	ENTNAHME, LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER PROBEN.....	16
6	TESTDURCHFÜHRUNG.....	16
7	REFERENZWERTE.....	18
8	QUALITÄTSKONTROLLE.....	18
9	ASSAY-CHARAKTERISTIKA.....	18
10	GRENZEN DES TESTS.....	19
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN.....	19

1	DESTINAZIONE D'USO.....	20
2	PRINCIPIO DEL TEST.....	20
3	AVVERTENZE E PRECAUZIONI.....	20
4	MATERIALI.....	22
5	RACCOLTA, CONSERVAZIONE E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI.....	24
6	PROCEDURA DELL'ANALISI.....	24
7	VALORI DI RIFERIMENTO.....	26
8	CONTROLLO QUALITÀ.....	26
9	CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI.....	26
10	LIMITAZIONI D'USO.....	27
11	ASPETTI LEGALI.....	27

1	FINALIDAD PREVISTA.....	28
2	FUNDAMENTO DEL ENSAYO.....	28
3	ADVERTENCIA Y PRECAUCIONES.....	28
4	MATERIALES.....	30
5	TOMA DE LA MUESTRA, ALMACENAMIENTO Y PREPARACIÓN.....	32
6	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO.....	32
7	VALORES DE REFERENCIA.....	34
8	CONTROL DE CALIDAD.....	34
9	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO.....	34
10	LIMITACIONES DE USO.....	35
11	ASPECTOS LEGALES.....	35

12	REFERENCES / LITERATURE.....	36
----	------------------------------	----

	SYMBOLS USED.....	37
--	-------------------	----

1 INTENDED USE

The **DRG Leptin Sandwich ELISA** is a manual enzyme immunoassay for the **quantitative** measurement of leptin in human serum or Li-heparin plasma.

For *in vitro* diagnostic use. For laboratory professional use.

The device is intended to be used as an aid to the diagnosis of adiposity, leptin resistance, and congenital leptin deficiency.

1.1 Scientific Validity

Leptin is produced primarily in the adipocytes of white adipose tissue and circulates in blood in free form and bound to proteins (1). In mammals, leptin is pleiotropic, regulating a multitude of physiological processes. Leptin reduces appetite and food intake, and inhibits hepatic glucose production, fatty acid synthesis and the expression of resistin. In contrast, Leptin increases energy expenditure by inducing oxidation of fatty acids in liver and muscle. Moreover, Leptin stimulates insulin secretion and glucose uptake as well as secretion of inflammatory cytokines (2,3). Leptin serves as a lipostatic signal and conveys critical information regarding metabolic state to the brain by stimulating anorexigenic proopiomelanocortin/cocaine and amphetamine-related transcript neurons and inhibiting orexigenic neuropeptide Y/agouti-related protein neurons (4,5). The actions of Leptin are opposed by the hormone ghrelin. Both hormones act on receptors in the arcuate nucleus of the hypothalamus to regulate appetite to achieve energy homeostasis (6).

Although leptin reduces appetite as a circulating signal, obese individuals generally exhibit a higher circulating concentration of leptin than normal weight individuals due to their higher percentage body fat (7). These people show resistance to leptin, similar to resistance of insulin in type 2 diabetes, with the elevated levels failing to control hunger and modulate their weight. In obesity, a decreased sensitivity to leptin occurs, resulting in an inability to detect satiety despite high energy stores (8). Although regulation of fat stores is deemed to be the primary function of leptin, it also plays a role in other physiological processes, as evidenced by its multiple sites of synthesis other than fat cells, and the multiple cell types beside hypothalamic cells that have leptin receptors.

Leptin-deficient pathologies are typically accompanied by hyperphagia and obesity (9,10). Extreme obesity can be observed with mutations in the leptin receptor. The anorexigenic properties of leptin have been well characterized in the context of leptin-deficient humans, resulting in the reduction of food intake and body mass (11,12).

In conclusion, Leptin can be measured for the differential diagnosis of obesity with leptin resistance.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The DRG Leptin Sandwich ELISA is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the **sandwich principle**.

The microtiter wells are coated with a monoclonal antibody directed towards a unique antigenic site of the leptin molecule.

During the first incubation, leptin in the added sample binds to the immobilized antibody.

Unbound sample material is washed off.

In a second incubation added antiserum, which contains biotinylated anti-leptin antibody, forms a sandwich complex with the bound leptin on the microtiter wells.

Afterwards, the unbound antiserum is washed off and streptavidin peroxidase complex (*Enzyme Complex*) is added for detection of the biotin molecules.

After a washing step to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate solution. The colorimetric reaction is stopped by addition of stop solution, and optical density (OD) of the resulting yellow product is measured. The intensity of color is proportional to the concentration of the analyte in the sample.

A standard curve is constructed by plotting OD values against concentrations of standards, and concentrations of unknown samples are determined using this standard curve.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

- This kit is for *in vitro* diagnostic use only. For laboratory professional use only.
- Before starting the assay, read the instructions for use completely and carefully. Use the valid version of instructions for use provided with the kit. Be sure that everything is understood.
- Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
- Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- Do not reuse microtiter wells.
- Reagents of other manufacturers must not be used together with the reagents of this test kit.
- All reagents in this kit are clear liquids, substrate solution is clear and colorless. Changes in its appearance may affect the performance of the test. In that case, contact DRG.
- Microbial contamination of reagents or samples may give false results.
- Allow the reagents to reach room temperature (20 °C to 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the optical density readings of the assay.
- All indicated volumes must be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
- Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution coloured. Do not pour reagents back into original vials as reagent contamination may occur.

General precautions

- Follow good laboratory practice and safety guidelines.
- Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and samples with skin and mucous membranes.
- Do not smoke, eat, drink, or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
- Wear lab coats and disposable latex gloves when handling samples and reagents and safety glasses where necessary.

Biohazard information

- All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. However, no known test method can offer total assurance that no infectious agent is present.
- The device contains material of animal origin, which is certified apparently free of infectious or contagious diseases and injurious parasites.
- Bovine components originate from countries where BSE has not been reported.
- All materials and samples of human or animal origin must be handled as if capable of transmitting infectious diseases.
- Handling must be done in accordance with the procedures defined by appropriate national biohazard and safety guideline or regulation. Waste must be discarded according to local rules and regulations.

Information to chemical hazard and hazard classification

- Some reagents contain ProClin 300®, BND or MIT as preservative in non-declarable concentrations. Nevertheless, in case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
- Substrate Solution contains an ingredient in non-declarable concentrations which causes serious eye irritation. In case of possible contact with eyes, rinse immediately carefully and thoroughly with eye wash or water. After contact with skin, wash with plenty of water. Take-off contaminated clothing and wash it before reuse.
- Avoid contact with Stop Solution containing 0.5 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
- Chemicals and prepared or used reagents must be treated as hazardous waste according to the national safety guideline or regulation.
- This product does not contain substances which have carcinogenic, mutagenic or toxic for reproduction (CMR) properties.

All reagents of this test kit do NOT contain hazardous substances in concentrations to be declared, a classification and labelling is not required.

For detailed information please refer to the Safety Data Sheet, which is available upon request directly from DRG.

4 MATERIALS

4.1 Materials provided with the kit

1. **Microtiterwells**, 12 x 8 strips, 96 wells (break apart);
Wells coated with anti-leptin antibody (monoclonal).
2. **Standard (Standard 0 - 5)**, 6 vials, 0.5 mL each, lyophilized;
Concentrations: 0 – 2 – 5 – 25 – 50 – 100 ng/mL
The standards are calibrated against the following reference material: WHO International Standard Leptin, human; NIBSC Code 97/594
See "Reagent Preparation".
Contain non-mercury preservative.
3. **Control Low & High**, 2 vials, 0.5 mL each, lyophilized;
For control values and ranges please refer to vial label or Certificate of Analysis.
See "Reagent Preparation".
Contain non-mercury preservative.
4. **Assay Buffer**, 1 vial, 11 mL, ready to use;
Contains non-mercury preservative.
5. **Antiserum**, 1 vial, 11 mL, ready to use,
monoclonal biotinylated anti-Leptin antibody;
Contain non-mercury preservative.
6. **Enzyme Complex**, 1 vial, 11 mL, ready to use;
Streptavidin conjugated to horseradish peroxidase
Contains non-mercury preservative.
7. **Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use;
Contains 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB).
Keep away from direct sun light.
8. **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use;
Contains 0.5 M H₂SO₄.
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
9. **Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated);
See "Reagent Preparation".
10. Instructions for Use
11. Certificate of Analysis (CoA)

4.2 Materials required but not provided

- A calibrated microtiter plate reader (450 nm, with reference wavelength at 620 nm to 630 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes
- Manual or automatic equipment for rinsing microtiter plate wells
- Absorbent paper
- Distilled water
- Timer
- Graph paper or software for data reduction

4.3 Storage and Stability of the Kit

When stored at 2 °C to 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date.

Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2 °C to 8 °C.

Under the described storage conditions, opened kits retain their reactivity for 8 weeks.

The microtiter plate contains snap-off strips. Do not open the pouch of the wells until it reaches room temperature. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch including the desiccant and used in the frame provided. Once the foil bag has been opened, care must be taken to close it tightly again.

4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature (20 °C to 26 °C) prior to use.

Standards

Reconstitute the lyophilized contents of each standard vial with 0.5 mL distilled water and let stand for at least 10 minutes at room temperature. Mix several times before use.

Note: *The reconstituted standards are stable for 6 weeks at 2 °C to 8 °C.
For longer storage the reconstituted standards must be aliquoted and stored frozen at -20 °C.*

Controls

Reconstitute the lyophilized content of each vial with 0.5 mL distilled water and let stand for at least 10 minutes at room temperature. Mix the control several times before use.

Note: *The reconstituted controls are stable for 6 weeks at 2 °C to 8 °C.
For longer storage the reconstituted controls must be aliquoted and stored frozen at -20 °C.*

Wash Solution

Add distilled water to the 40X concentrated Wash Solution.

Dilute 30 mL of concentrated *Wash Solution* with 1170 mL distilled water to a final volume of 1200 mL.

The diluted Wash Solution is stable for 1 week at room temperature.

4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit and all used materials/reagents must be performed according to the national regulations. Special information for this product is given in the Safety Data Sheet, section 13.

4.6 Damaged Test Kits

In case of any damage to the test kit or components, DRG must be informed in writing, at the latest one week after receiving the kit. Damaged single components must not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they must be disposed of according to the official regulations.

5 SAMPLE COLLECTION, STORAGE AND PREPARATION

The following sample material can be used in this test:

Human serum or lithium heparin plasma

Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

In general, it should be avoided to use hemolytic, icteric, or lipaemic samples. For further information refer to chapter "Interfering Substances".

5.1 Sample Collection

Serum: Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

Plasma: Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anticoagulant (e.g. Sarstedt Monovette with the appropriate plasma preparation) and centrifuged immediately after collection.

5.2 Samples Storage

Samples must be capped and can be stored for up to 2 months at 2 °C to 8 °C prior to performing the assay.

Samples stored for a longer time (up to 24 months) must be frozen only once at -20 °C prior to assay. Thawed samples must be inverted several times prior to testing.

5.3 Sample Dilution

If in an initial assay, a sample is found to contain more analyte than the highest standard, the sample can be diluted with *Standard 0* and re-assayed as described in "Assay Procedure".

For the calculation of the concentrations this dilution factor must be considered.

Example:

- a) dilution 1:10: 10 µL sample + 90 µL *Standard 0*; Mix thoroughly.
- b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Standard 0*; Mix thoroughly.

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 Procedural Notes

- All reagents and samples must be allowed to come to room temperature (20 °C to 26 °C) before use.
- All reagents must be mixed without foaming.
- Do not interchange caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control, or sample in order to avoid carry-over.
- Mix the contents of the microtiter plate wells thoroughly to ensure good test results.
- Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
- Once the test has been started, all steps must be completed without interruption and in the same sequence for each step.
- The enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.
- Optical density is a function of the incubation time and temperature. Respect the incubations times and temperatures as given in chapter "Test Procedure".
- Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- **Important note to wash procedure:**
Washing is critical. Improperly washed wells will give erroneous results. The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
- **Test performance using fully automated analysis devices:**
Automated test performance using fully automated, open-system analysis devices is possible. However, the combination must be validated by the user.

6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

The controls serve as internal controls for the reliability of the test procedure. They must be assayed with each test run.

The given test procedure describes manual processing.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2. Pipette **15 µL** of each **Standard, Control** and **sample** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Add **100 µL Assay Buffer** into each well.
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
4. Incubate for **120 minutes** at room temperature.
5. Wash the wells as follows:
If the wash step is performed manually:
Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells **3 times** with **300 µL** diluted *Wash Solution* per well.
If an automated plate washer is used:
Rinse the wells **3 times** with **400 µL** diluted *Wash Solution* per well.
At the end of the washing step, always strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
6. Dispense **100 µL Antiserum** to each well.
7. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
8. Wash as described in step 5.
9. Dispense **100 µL Enzyme Complex** into each well.
10. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
11. Wash as described in step 5.
12. Add **100 µL of Substrate Solution** to each well.
13. Incubate for **15 minutes** at room temperature.
14. Stop the enzymatic reaction by adding **50 µL of Stop Solution** to each well.
15. Measure the optical density of the solution in each well at **450 nm (reading) and at 620 nm to 630 nm (background subtraction, recommended)** with a microtiter plate reader.
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average optical density (OD) values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using linear graph paper, construct a standard curve by plotting the (mean) OD obtained from each standard against its concentration with OD value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Determine the corresponding concentration from the standard curve by using the (mean) OD value for each sample.
4. Automated method: The results in the Instructions for Use have been calculated automatically using a 4-Parameter curve fit. (4-Parameter Rodbard or 4-Parameter Marquardt are the preferred methods.) Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard can be further diluted or must be reported as > 100 ng/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor must be considered.
6. For duplicate determinations, the mean of the two values must be taken. If the two values deviate substantially from one another DRG recommends retesting the samples.

6.3.1 Example of Typical Standard Curve

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

Standard	Optical Density (450 nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	0.02
Standard 1 (2 ng/mL)	0.07
Standard 2 (5 ng/mL)	0.16
Standard 3 (25 ng/mL)	0.74
Standard 4 (50 ng /ml)	1.41
Standard 5 (100 ng/mL)	2.30

7 REFERENCE VALUES

It is strongly recommended that each laboratory determine its own normal and abnormal values.

In a study conducted with apparently healthy subjects, using the DRG Leptin Sandwich ELISA the following data were observed:

	Adult females and males			Children (1 - 10 years)
BMI	18.5 – 24.9	25 – 30	> 30	not determined
n	18	12	9	51
2.5th - 97.5th Percentile (ng/mL)	< 0.7 – 8.3	1.5 – 19.3	4.0 – 32.0	< 0.7 – 7.0
Mean (ng/mL)	3.4	7.4	14.1	2.8
Median (ng/mL)	2.3	5.6	7.1	2.6
Range (min. - max.) (ng/mL)	< 0.7 – 9.1	1.3 – 21.2	3.4 – 32.1	< 0.7 – 11.7

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results must be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day-to-day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the Certificate of Analysis (CoA) added to the kit. The values and ranges stated on the Certificate of Analysis always refer to the current kit lot and must be used for direct comparison of the results.

If available, it is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analyzing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above-mentioned items without finding any error contact your distributor or DRG directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Measuring Range

The range of the assay is between 0.7 ng/mL - 100 ng/mL.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross-Reactivity)

The following substances were tested for cross reactivity of the assay:

Component	Cross reactivity
Human Leptin	100 %
Rat Leptin	< 0.2 %
Mouse Leptin	< 0.2 %
Human Insulin	N.D.
Human Proinsulin	N.D.
Rat Insulin	N.D.
Human C-Peptide	N.D.
Glucagon	N.D.
IGF-I	N.D.

N.D.: Not detectable

9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity [$\text{Mean OD}_{(\text{Standard } 0)} + 2 \times \text{SD}, n = 20$] was calculated to be 0.7 ng/mL.

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra-Assay

The within assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	20	1.1	9.6
2	20	3.2	7.8
3	20	27.4	8.6

9.4.2 Inter Assay

The between assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	6	1.4	6.9
2	6	3.7	3.7
3	6	9.7	9.1

9.4.3 Inter-Lot

The inter-assay (between-lots) variability is shown below:

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	4	6.7	11.0
2	4	20.3	11.6
3	4	1.3	7.6
4	4	14.4	8.7

9.5 Recovery

Samples have been spiked by adding Leptin solutions with known concentrations.

The % recovery has been calculated by multiplication of the ratio of the measurements and the expected values with 100 (expected value = (endogenous Leptin + added Leptin) / 2; because of a 1:2 dilution of serum with spike material).

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration (ng/mL)	4.6	21.4	9.6
Average Recovery	88.8	97.0	94.8
Range of Recovery (%)	from	86.8	90.6
	to	93.1	102.1
		106.0	106.0

9.6 Linearity

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration (ng/mL)	4.6	21.4	9.6
Average Recovery	93.2	92.7	104.7
Range of Recovery (%)	from	85.1	86.2
	to	107.5	103.1
		114.3	114.3

10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the instructions for use and with adherence to good laboratory practice.

Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

10.1 Interfering Substances

Hemoglobin (up to 4 mg/mL), bilirubin (up to 0.5 mg/mL) and triglyceride (up to 30 mg/mL) have no influence on the assay results.

A biotin concentration of up to 1200 ng/mL in a sample has no influence on the assay results.

10.2 Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence on the measurement of leptin in a sample.

10.3 High Dose Hook Effect

"High Dose Hook Effect" is not detected up to 5000 ng/mL of leptin.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover, the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DRG.

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2 are also invalid.

Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

11.4 Reporting of Serious Incident

Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user and/or the patient is established.

1 ZWECKBESTIMMUNG

Der **DRG Leptin Sandwich ELISA** ein manueller Enzymimmunoassay zur **quantitativen** Messung von Leptin in humanem Serum oder Lithium-Heparinplasma.

Für den Einsatz in der *In-vitro* Diagnostik. Nur für den professionellen Gebrauch in Laboratorien.

Der Testkit kann als Hilfsmittel bei der Diagnose von Adipositas, Leptinresistenz und angeborenem Leptinmangel eingesetzt werden.

2 TESTPRINZIP

Der **DRG Leptin Sandwich ELISA** ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf der **Sandwichtechnik** basiert.

Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem monoklonalen Antikörper beschichtet, der gegen eine definierte Antikörper-Bindungsstelle des Leptin-Moleküls gerichtet ist.

Während der ersten Inkubation bindet das Leptin in der zugegebenen Probe an den immobilisierten Antikörper. Ungebundenes Probenmaterial wird durch einen Waschschrift entfernt.

In einer zweiten Inkubation bildet zugegebenes Antiserum, das biotinylierte Anti-Leptin-Antikörper enthält, einen Sandwich-Komplex mit dem an die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gebundenen Leptin.

Anschließend wird ungebundenes Antiserum ausgewaschen und ein Streptavidin-Peroxidase-Komplex (*Enzyme Complex*) zum Nachweis der Biotin-Moleküle zugegeben.

Nach einem Waschschrift, um alle ungebundenen Substanzen zu entfernen, wird die feste Phase mit der Substratlösung inkubiert. Die Farbreaktion wird durch die Zugabe der Stopplösung beendet und die optische Dichte (OD) des resultierenden gelben Produktes gemessen. Die Intensität der Farbe ist proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe.

Durch Auftragen der OD-Werte gegen die Konzentrationen der Standards wird eine Standardkurve erstellt, und die Konzentrationen der unbekanntenen Proben werden anhand dieser Standardkurve bestimmt.

3 WARNUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur für den Einsatz in der *In-vitro* Diagnostik bestimmt. Nur für den professionellen Gebrauch in Laboratorien.
- Vor Beginn des Tests ist die Gebrauchsanweisung vollständig und sorgfältig zu lesen. Verwenden Sie nur die gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung. Stellen Sie sicher, dass alles verstanden wurde.
- Komponenten aus Kits mit unterschiedlichen Chargennummern dürfen nicht gemischt oder zusammen verwendet werden. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zusammen zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um die gleiche Charge handelt. Die Kits können unter unterschiedlichen Bedingungen versandt oder gelagert worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Reagenzien nicht über das auf den Kit-Etiketten angegebene Verfallsdatum hinaus verwenden.
- Mikrotiterwells nicht wiederverwenden.
- Reagenzien anderer Hersteller dürfen nicht zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwendet werden.
- Alle Reagenzien dieses Kits sind klare Flüssigkeiten, die Substratlösung ist klar und farblos. Veränderungen des Aussehens können die Durchführung des Tests beeinträchtigen. In diesem Fall wenden Sie sich bitte an DRG.
- Eine mikrobielle Kontamination von Reagenzien oder Proben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Lassen Sie die Reagenzien vor Testbeginn Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) erreichen. Die Temperatur wirkt sich auf die Messungen der optischen Dichte des Assays aus.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Volumina müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Behältnisse jeweils nur für ein einziges Reagenz verwenden. Dies gilt insbesondere für die Substrat-Behälter. Die Verwendung eines Behälters zum Pipettieren der Substratlösung, der zuvor für die Konjugatlösung verwendet wurde, kann zu einer Verfärbung der Lösung führen. Geben Sie keine Reagenzien zurück in die Originalfläschchen, da es zu einer Kontamination der Reagenzien kommen kann.

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

- Gute Laborpraxis und Sicherheitsrichtlinien beachten.
- Niemals mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In Bereichen, in denen Proben oder Kit-Reagenzien verwendet werden, darf nicht geraucht, gegessen, getrunken oder Kosmetika aufgetragen werden.
- Beim Umgang mit Proben und Reagenzien sind Laborkittel und Einweg-Latexhandschuhe sowie falls erforderlich eine Schutzbrille zu tragen.

Informationen zur biologischen Gefährdung

- Alle Reagenzien dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden durch von der FDA zugelassene Verfahren auf HIV I/II, HBsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Kein bekanntes Testverfahren kann jedoch mit absoluter Sicherheit ausschließen, dass kein Infektionserreger vorhanden ist.
- Das Produkt enthält Material tierischen Ursprungs, das nachweislich frei von infektiösen oder ansteckenden Krankheiten und schädigenden Parasiten ist.
- Die Rinderbestandteile stammen aus Ländern, in denen keine BSE-Fälle gemeldet wurden.
- Alle Materialien und Proben menschlichen oder tierischen Ursprungs sind so zu behandeln, als könnten sie Infektionskrankheiten übertragen.
- Die Handhabung muss in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, die in den entsprechenden nationalen Richtlinien oder Vorschriften für Biogefährdung und Sicherheit festgelegt sind. Abfälle müssen gemäß den örtlichen Vorschriften und Bestimmungen entsorgt werden.

Informationen zu chemischen Gefahren und Gefahreinstufung

- Einige Reagenzien enthalten ProClin 300®, BND oder MIT als Konservierungsmittel in nicht deklarationspflichtigen Konzentrationen. Bei Berührung mit den Augen oder der Haut dennoch sofort mit Wasser spülen.
- Die Substratlösung enthält einen Inhaltsstoff in nicht deklarationspflichtiger Konzentration, der schwere Augenreizungen verursacht. Bei möglichem Kontakt mit den Augen sofort sorgfältig und gründlich mit Augenspülung oder Wasser spülen. Bei Berührung mit der Haut mit reichlich Wasser abwaschen. Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor Wiederverwendung waschen.
- Kontakt mit der Stopplösung (*Stop Solution*) vermeiden, da sie 0,5 M H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Chemikalien und zubereitete oder verwendete Reagenzien müssen als gefährlicher Abfall gemäß den nationalen Sicherheitsrichtlinien oder -vorschriften behandelt werden.
- Dieses Produkt enthält keine Stoffe, die krebserregende, erbgutverändernde oder fortpflanzungsgefährdende Eigenschaften (CMR) haben.

Alle Reagenzien dieses Testkits enthalten KEINE gefährlichen Stoffe in deklarationspflichtigen Konzentrationen, eine Einstufung und Kennzeichnung ist nicht erforderlich.

Ausführliche Informationen entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt, das Sie auf Anfrage direkt bei DRG erhalten.

4 MATERIALIEN

4.1 Im Kit mitgelieferten Materialien

1. **Microtiterwells**, 12 x 8 Streifen, 96 Wells (einzeln brechbar);
Mit anti-Leptin-Antikörper (monoklonal) beschichtet.
2. **Standard (Standard 0 - 5)**, 6 Fläschchen, je 0,5 mL, lyophilisiert;
Konzentrationen: 0 – 2 – 5 – 25 – 50 – 100 ng/mL
Die Standards sind gegen das folgende Referenzmaterial kalibriert: WHO International Standard Leptin, human; NIBSC Code 97/594
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **Control Low & High** (Kontrolle), 2 Fläschchen, je 0,5 mL, lyophilisiert;
Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem Analysenzertifikat (CoA).
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
4. **Assay Buffer** (Assaypuffer), 1 Fläschchen, 11 mL, gebrauchsfertig;
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **Antiserum**, (Antiserum), 1 Fläschchen, 11 mL, gebrauchsfertig;
biotinylierter monoklonaler Leptin Antikörper
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
6. **Enzyme Complex** (Enzymkomplex), 1 Fläschchen, 11 mL, gebrauchsfertig;
Streptavidin mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
7. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
Enthält 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB).
Von direktem Sonnenlicht fernhalten.
8. **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
enthält 0,5 M H₂SO₄,
Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
9. **Wash Solution** (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, **40X** konzentriert;
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.
10. **Gebrauchsanweisung**
11. **Certificate of Analysis (CoA)**, (Analysenzertifikat)

4.2 Erforderliche, aber nicht enthaltene Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät (450 nm, mit Referenzwellenlänge bei 620 nm bis 630 nm)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten
- Manuelle oder automatische Waschorrichtung für Mikrotiterplatten
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes Wasser
- Laborwecker
- Millimeterpapier oder Software zur Datenauswertung

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C bis 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.

Nach dem Öffnen müssen alle Reagenzien bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits 8 Wochen ihre Reaktivität.

Die Mikrotiterplatte besteht aus einzeln herausnehmbaren und abbrechbaren Streifen. Öffnen Sie den Beutel mit der Mikrotiterplatte erst, wenn er Raumtemperatur erreicht hat.

Ungenutzte Vertiefungen müssen bei 2 °C bis 8 °C im verschlossenen Folienbeutel mit dem Trockenmittel gelagert und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien und die benötigte Anzahl der Mikrotiterstreifen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) bringen.

Standards

Das Lyophilisat in jedem Fläschchen mit 0,5 mL destilliertem Wasser auflösen und mindestens 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. Vor der Verwendung mehrere Male mischen.

Achtung: *Bei 2 °C bis 8 °C sind die rekonstituierten Standards 6 Wochen haltbar.*

Für eine längere Lagerung müssen die rekonstituierten Standards aliquotiert und bei -20 °C eingefroren werden.

Control

Das Lyophilisat in jedem Fläschchen mit 0,5 mL destilliertem Wasser auflösen und mindestens 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. Vor der Verwendung mehrere Male mischen.

Achtung: *Bei 2 °C bis 8 °C sind die rekonstituierten Kontrollen 6 Wochen haltbar.*

Für eine längere Lagerung müssen die rekonstituierten Kontrollen aliquotiert und bei -20 °C eingefroren werden.

Wash Solution

Die 40-fach konzentrierte *Wash Solution* (30 mL) mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 mL verdünnen.

Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 1 Woche stabil.

4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits und aller verwendeten Materialien / Reagenzien muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt, Abschnitt 13.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DRG in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Beschädigte Einzelkomponenten dürfen nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen aufbewahrt werden, bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5 ENTNAHME, LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Das folgende Probenmaterial kann in diesem Test eingesetzt werden:

Humanes Serum oder Lithium-Heparinplasma

Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

Generell sollte die Verwendung von hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben vermieden werden. Weitere Informationen finden Sie im Kapitel „Interferenzen“.

5.1 Probenentnahme

Serum: Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette für Serum), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

Plasma: Die Blutentnahme erfolgt mit Röhrchen, die ein Antikoagulant enthalten (z.B.: Sarstedt Monovette – mit entsprechender Plasma-Präparierung). Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

5.2 Probenlagerung

Proben müssen stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 2 Monate bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Für eine längere Aufbewahrung (bis zu 24 Monate) müssen die Proben bei -20 °C eingefroren und bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

5.3 Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf festgestellt wird, dass die Analytkonzentration einer Probe höher ist, als die des höchsten Standards, kann diese Probe mit *Standard 0* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Beispiel:

- a) Verdünnung 1:10: 10 µL Probe + 90 µL *Standard 0*; Sorgfältig mischen.
- b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL *Standard 0*; Sorgfältig mischen.

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) gebracht werden.
- Alle Reagenzien müssen ohne Schaumbildung gemischt werden.
- Die Kappen der Reagenzfläschchen dürfen nicht vertauscht werden, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Einweg-Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Mischen Sie den Inhalt der Mikrotiterplatten-Vertiefungen gründlich, um gute Testergebnisse zu gewährleisten.
- Kavitäten während der Testdurchführung nicht trocknen lassen; Reagenzien unmittelbar nach Ende des Waschschriffs hinzufügen.
- Sobald der Test begonnen wurde, müssen alle Schritte ohne Unterbrechung und in der gleichen Reihenfolge für jeden Schritt abgeschlossen werden.
- Die enzymatische Reaktion ist linear proportional zu Zeit und Temperatur.
- Die optische Dichte ist eine Funktion der Inkubationszeit und -temperatur. Die in Kapitel "Testverfahren" angegebenen Inkubationszeiten und -temperaturen müssen eingehalten werden.
- Es wird empfohlen, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen, usw. Nur eine solche Vorbereitung garantiert für jeden Pipettierschritt gleiche Zeiten ohne Unterbrechung.
- **Wichtiger Hinweis zum Waschvorgang:**
Das Waschen ist entscheidend. Unsachgemäß gewaschene Vertiefungen führen zu fehlerhaften Ergebnissen. Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschriffs!
- **Testdurchführung mit vollautomatischen Analysegeräten:**
Eine automatisierte Testdurchführung mit vollautomatischen, systemoffenen Analysegeräten ist möglich. Die Kombination muss jedoch vom Anwender validiert werden.

6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

Die Kontrollen dienen der internen Überprüfung der Zuverlässigkeit des Testverfahrens. Sie müssen bei jedem Testdurchlauf gemessen werden.

Das angegebene Testverfahren beschreibt die manuelle Abarbeitung.

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 15 µL Standard, Control und Probe** mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells pipettieren.
3. **100 µL Assay Buffer** in jedes Well dazugeben.
Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
4. **120 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Die Vertiefungen folgendermaßen waschen:
Wenn der Waschschrift manuell durchgeführt wird:
Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln.
Wells **3-mal** mit **300 µL** verdünnter *Wash Solution* pro Well waschen.
Bei Verwendung eines Waschautomaten:
Wells **3-mal** mit **400 µL** verdünnter *Wash Solution* pro Well waschen.
Am Ende des Waschschrifts die Vertiefungen immer kräftig auf saugfähigem Papier ausklopfen, um verbliebene Flüssigkeit zu entfernen.
6. **100 µL Antiserum** in jedes Well pipettieren.
7. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
8. Waschschrift durchführen wie in Schritt 5 beschrieben.
9. **100 µL Enzyme Complex** in jedes Well pipettieren.
10. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
11. Waschschrift durchführen wie in Schritt 5 beschrieben.
12. **100 µL Substrate Solution** in jedes Well pipettieren.
13. **15 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
14. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **50 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
15. Die Optische Dichte (OD) bei **450 nm (Messung) und 620 nm bis 630 nm (Abzug des Hintergrundes, empfohlen)** mit einem Mikrotiterplattenleser innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der *Stop Solution* bestimmen.

6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls und Patientenproben bestimmen.
2. Erstellen Sie unter Verwendung von linearem Millimeterpapier eine Standardkurve, indem Sie die (mittlere) OD jedes Standards gegen seine Konzentration auftragen, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse liegt.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode:
Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4-Parameter-Gleichung bestimmt. (4-Parameter-Rodbard oder 4-Parameter-Marquardt sind die bevorzugten Methoden.) Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben mit Konzentrationen, die höher sind als die des höchsten Standards, können weiter verdünnt werden oder müssen angegeben werden als > 100 ng/mL. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.
6. Bei Doppelbestimmungen muss der Mittelwert der beiden Werte genommen werden. Weichen die beiden Werte erheblich voneinander ab, empfiehlt die DRG, die Proben erneut zu testen.

6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DRG ELISA gezeigt. Diese Werte dürfen **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	0,02
Standard 1 (2 ng/mL)	0,07
Standard 2 (5 ng/mL)	0,16
Standard 3 (25 ng/mL)	0,74
Standard 4 (50 ng /ml)	1,41
Standard 5 (100 ng/mL)	2,30

7 REFERENZWERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

In einer Studie mit dem DRG Leptin Sandwich ELISA wurden die Proben von scheinbar gesunden Probanden untersucht. Dabei ergaben sich folgende Werte:

	Erwachsene Frauen und Männer			Kinder (1 - 10 Jahre)
BMI	18,5 – 24,9	25 – 30	> 30	nicht bestimmt
n	18	12	9	51
2,5th – 97,5th Perzentile (ng/mL)	< 0,7 – 8,3	1,5 – 19,3	4,0 – 32,0	< 0,7 – 7,0
Mittelwert (ng/mL)	3,4	7,4	14,1	2,8
Median (ng/mL)	2,3	5,6	7,1	2,6
Bereich (min. - max.) (ng/mL)	< 0,7 – 9,1	1,3 – 21,2	3,4 – 32,1	< 0,7 – 11,7

Die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse sollten niemals als alleinige Grundlage für therapeutische Konsequenzen dienen. Die Ergebnisse müssen zusammen mit anderen klinischen Befunden und diagnostischen Tests des Patienten interpretiert werden.

8 QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im Analysenzertifikat (CoA), das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Falls verfügbar, wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DRG in Verbindung.

9 ASSAY-CHARAKTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,7 ng/mL - 100 ng/mL.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

9.3 Sensitivität

Die analytische Sensitivität (Mittlere OD_(Standard 0) + 2 × SD, n = 20) beträgt 0,7 ng/mL.

Die Daten zu:

9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.5 Wiederfindung

9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

10 GRENZEN DES TESTS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren mit vollständigem Verständnis der Gebrauchsanweisung und unter Einhaltung der GLP (Good Laboratory Practice)-Richtlinien durchgeführt wird.

Jede unsachgemäße Handhabung der Proben oder eine Modifikation dieses Tests kann die Ergebnisse beeinflussen.

10.1 Interferenzen

Hämoglobin (bis zu 4 mg/mL), Bilirubin (bis zu 0,5 mg/mL) und Triglyceride (bis zu 30 mg/mL) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

Bis zu einer Konzentration von 1200 ng/mL hat Biotin in Proben keinen Einfluss auf die Testergebnisse.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Zurzeit sind uns keine Substanzen (Medikamente) bekannt, die einen Einfluss auf die Bestimmung von Leptin in einer Probe haben.

10.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test bis zu einer Konzentration von 5000 ng/mL Leptin nicht auf

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DRG in Verbindung.

11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1 genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2 erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

11.4 Meldung von schwerwiegenden Vorkommnissen

Jedes schwerwiegende Vorkommnis im Zusammenhang mit dem Produkt ist dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Anwender und/oder der Patient niedergelassen ist, zu melden.

1 DESTINAZIONE D'USO

Il DRG Leptin Sandwich ELISA è un test immunoenzimatico manuale per la misurazione **quantitativa** di leptina nel siero o nel plasma litio eparina umano.

Per uso diagnostico *in vitro*. Per uso professionale di laboratorio.

Il prodotto è destinato ad essere utilizzato come ausilio alla diagnosi di adiposità, resistenza alla leptina e deficit congenito di leptina.

2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test kit DRG Leptin Sandwich ELISA è un test immunologico in fase solida con enzimi ancorati su un substrato (ELISA) basato sul **principio sandwich**.

I micropozzetti sono ricoperti con un anticorpo monoclonale diretto contro un unico sito antigenico su una molecola di leptina.

Durante la prima incubazione, la leptina nel campione aggiunto si lega all'anticorpo immobilizzato.

Il materiale campione non legato viene rimosso con una fase di lavaggio.

In una seconda incubazione, l'antisiero aggiunto contenente l'anticorpo anti-leptina biotinilato forma un complesso a sandwich con la leptina legata ai pozzetti della piastra da microtitolazione.

L'antisiero non legato viene poi lavato e viene aggiunto un complesso streptavidina-perossidasi (*Enzyme Complex*) per rilevare le molecole di biotina.

Dopo una fase di lavaggio per rimuovere tutte le sostanze non legate, la fase solida viene incubata con la soluzione di substrato. La reazione colorimetrica viene bruscamente interrotta con l'aggiunta di soluzione di arresto e viene misurata la densità ottica (DO) del prodotto giallo risultante.

L'intensità della colorazione è proporzionale alla concentrazione dell'analita nel campione.

Una curva standard viene costruita tracciando i valori di DO rispetto alle concentrazioni di standard, e le concentrazioni di campioni sconosciuti vengono determinate usando questa curva standard.

3 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Questo kit è solo per uso diagnostico *in vitro*. Solo per uso professionale di laboratorio.
- Prima di iniziare il test, leggere completamente e attentamente le istruzioni per l'uso. Utilizzare la versione valida delle istruzioni per l'uso fornita con il kit. Assicurarsi che tutto sia stato compreso.
- Non miscelare o usare componenti di kit di lotto differente. Non scambiare pozzetti di piastre diverse, anche dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati spediti o conservati in condizioni differenti e le caratteristiche di legame delle piastre potrebbero essere leggermente diverse.
- Non utilizzare reagenti oltre la data di scadenza riportata sulle etichette del kit.
- Non riutilizzare i pozzetti di microtitolazione.
- Non usare reagenti di altri produttori assieme ai reagenti di questo kit.
- Tutti i reagenti di questo kit sono liquidi trasparenti; la soluzione di substrato è trasparente e incolore. Modifiche nell'aspetto possono influenzare la performance del test. In questo caso, contattare DRG.
- La contaminazione microbica dei reagenti o dei campioni può dare risultati aberranti.
- Prima di iniziare il test, lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (20 °C - 26 °C). La temperatura influisce sulle letture di densità ottica del saggio.
- Usare i volumi indicati secondo il protocollo. I risultati ottimali del test si ottengono solo utilizzando pipette calibrate e lettori di piastre per microtitolazione.
- Utilizzare serbatoi solo per reagenti singoli. Ciò vale in particolare per i serbatoi per il substrato. L'utilizzo di un serbatoio per l'erogazione di una soluzione di substrato precedentemente usato per la soluzione di coniugato può far virare la colore della soluzione. Non versare nuovamente i reagenti nei flaconi originali, poiché potrebbe verificarsi una contaminazione.

Precauzioni generali

- Seguire le linee guida per la buona pratica e la sicurezza in laboratorio.
- Non pipettare mai a bocca ed evitare il contatto dei reagenti e dei campioni con la pelle e le mucose.
- Non fumare, mangiare, bere o applicare cosmetici nelle aree dove vengono manipolati campioni o reagenti del kit.
- Indossare camici da laboratorio e guanti in lattice monouso quando si maneggiano campioni e reagenti e occhiali di sicurezza ove necessario.

Informazioni sul rischio biologico

- Tutti i reagenti di questo kit che contengono siero o plasma umano sono stati testati e confermati negativi per HIV I/II, HBsAg e HCV usando procedure approvate dalla FDA. Tuttavia, nessun metodo noto può garantire con certezza assoluta che non sia presente alcun agente infettivo.
- Il dispositivo contiene materiale di origine animale, certificato apparentemente privo di malattie infettive o contagiose e parassiti nocivi.
- I componenti bovini provengono da paesi in cui la BSE non è stata segnalata.
- Maneggiare tutti i materiali e i campioni di origine umana o animale come potenziali fonti di malattie infettive.
- Manipolare in conformità con le procedure definite dalle linee guida o dai regolamenti nazionali in materia di rischio biologico e sicurezza. Smaltire i rifiuti secondo le norme e i regolamenti locali.

Informazioni sul rischio chimico e sulla classificazione dei pericoli

- Alcuni reagenti contengono ProClin 300[®], BND o MIT come conservante in concentrazioni non dichiarabili. Tuttavia, in caso di contatto con gli occhi o la pelle, sciacquare immediatamente con acqua.
- La soluzione di substrato contiene un ingrediente in concentrazioni non dichiarabili che provoca grave irritazione oculare. In caso di possibile contatto con gli occhi, sciacquare subito accuratamente ed abbondantemente con lavaggio oculare o acqua. Dopo il contatto con la pelle, lavare abbondantemente con acqua. Togliere gli indumenti contaminati e lavarli prima di riutilizzarli.
- Evitare il contatto con la *Stop Solution* (soluzione di arresto) che contiene 0,5 M H₂SO₄. Può provocare irritazioni e ustioni alla pelle.
- Trattare i prodotti chimici e i reagenti preparati o usati come rifiuti pericolosi secondo le linee guida o i regolamenti nazionali sulla sicurezza.
- Questo prodotto non contiene sostanze con proprietà cancerogene, mutagene o tossiche per la riproduzione (CMR).

Tutti i reagenti di questo kit NON contengono sostanze pericolose in concentrazioni da dichiarare, non è richiesta una classificazione ed etichettatura.

Per informazioni dettagliate fare riferimento alla Scheda di Sicurezza, disponibile su richiesta direttamente da DRG.

4 MATERIALI

4.1 Materiali forniti nel kit

1. **Microtiterwells** (Pozzetti di microtitolazione), 12 x 8 strisce, 96 pozzetti (separabili);
Pozzetti sensibilizzati con anticorpo anti-leptina (monoclonale)
2. **Standard (Standard 0 - 5)**, 6 flaconi, 0,5 mL ognuno, liofilizzato;
Concentrazione: 0 – 2 – 5 – 25 – 50 – 100 ng/mL
Gli standard sono standardizzati contro il seguente materiale di riferimento: WHO International Standard Leptin, human; NIBSC Code 97/594.
Vedi "Preparazione dei reagenti".
Contiene conservante senza mercurio.
3. **Control Low & High** (Controllo), 2 flaconi, 0,5 mL ognuno, liofilizzato;
Per i valori e gli intervalli di controllo si prega di fare riferimento all'etichetta della fiala o al certificato di analisi.
Vedi „Preparazione dei reagenti“.
Contiene conservante senza mercurio.
4. **Assay Buffer** (Tampone del test), 1 flacone, 11 mL, pronto all'uso;
Contiene conservante senza mercurio
5. **Antiserum** (Antisiero), 1 flacone, 11 mL, pronto all'uso;
anticorpo anti-leptina monoclonale coniugata alla biotina.
Contiene conservante senza mercurio
6. **Enzyme Complex** (Complesso enzimatico), 1 flacone, 11 mL, pronto all'uso;
Streptavidina coniugato alla perossidasi di rafano.
Contiene conservante senza mercurio.
7. **Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso;
Contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB).
Tenere al riparo dalla luce solare diretta.
8. **Stop Solution** (Soluzione di arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso;
Contiene 0,5 M H₂SO₄.
Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
9. **Wash Solution** (Soluzione di lavaggio), 1 flacone, 30 mL (concentrata 40X);
vedi „preparazione dei reagenti“.
10. **Instructions for Use** (Istruzioni per l'uso)
11. **Certificate of Analysis (CoA)**, (Certificato di analisi)

4.2 Materiali necessari ma non forniti

- Lettore di piastre per microtitolazione calibrato (450 nm, con lunghezza d'onda di riferimento a 620 nm a 630 nm)
- Micropipette di precisione, di volume variabile, calibrate
- Lavatore, manuale o automatico, di piastre per microtitolazione
- Carta assorbente
- Acqua distillata
- Timer
- Carta millimetrata o software per il calcolo dei dati

4.3 Magazzinaggio e stabilità del kit

Se conservati da 2 °C a 8 °C i reagenti non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza.

Non usare reagenti oltre questa data.

Conservare tutti i reagenti aperti tra 2 °C e 8 °C.

Nelle condizioni di conservazione descritte, i kit aperti mantengono la loro reattività per 8 settimane.

La piastra di microtitolazione contiene strisce separabili. Non aprire la busta dei pozzetti finché non raggiunge la temperatura ambiente.

Conservare i pozzetti inutilizzati tra 2 °C e 8 °C nella busta sigillata, assieme all'essiccante, e utilizzarli con il supporto fornito. Una volta aperta la busta, accertarsi di richiuderla ermeticamente.

4.4 Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente (20 °C - 26 °C).

Standards

Ricostituire il contenuto liofilizzato di ogni flacone con 0,5 mL acqua distillata e lasciare per almeno 10 minuti a temperatura ambiente. Mescolare alcune volte prima dell'uso.

Nota: *Gli standard ricostituiti sono stabili per 6 settimane a 2 °C a 8 °C.
Per una conservazione più lunga i standard ricostituiti devono essere aliquotati e congelati a -20 °C.*

Control

Ricostituire il contenuto liofilizzato di ogni flacone con 0,5 mL acqua distillata e lasciare per almeno 10 minuti a temperatura ambiente. Mescolare alcune volte prima dell'uso.

Nota: *I controlli ricostituiti sono stabili per 6 settimane a 2 °C a 8 °C.
Per una conservazione più lunga i controlli ricostituiti devono essere aliquotati e congelati a -20 °C.*

Wash Solution (Soluzione di lavaggio)

Diluire 30 mL di Soluzione di Lavaggio concentrata (*Wash Solution*) con 1170 mL di acqua distillata fino ad un volume finale di 1200 mL.

La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 1 settimana a temperatura ambiente.

4.5 Smaltimento del kit

Effettuare lo smaltimento del kit e di tutti i materiali/reagenti usati secondo le normative nazionali. Informazioni specifiche su questo prodotto sono riportate nella Scheda di Sicurezza, sezione 13.

4.6 Kit danneggiati

In caso di danni al kit o ai suoi componenti, informare DRG per iscritto, al più tardi una settimana dopo aver ricevuto il kit. Non usare i singoli componenti danneggiati per il saggio. Conservare questi finché non venga trovato un rimedio finale. Dopo, smaltire questi componenti secondo i regolamenti ufficiali.

5 RACCOLTA, CONSERVAZIONE E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Il seguente materiale campione può essere utilizzato in questo test:

Siero o plasma umano (plasma litio eparina)

Non utilizzare campioni contenenti sodio azide per questo test.

In generale si dovrebbe evitare l'uso di campioni emolitici, itterici o lipemici. Per ulteriori informazioni consultare il capitolo "Sostanze interferenti".

5.1 Collezione dei campioni

Siero: Prelevare il sangue mediante venipuntura (p.es. Sarstedt Monovette per il siero), far coagulare e separare il siero centrifugando a temperatura ambiente. Non centrifugare prima che la coagulazione sia completata. Campioni di pazienti in terapia anticoagulante possono richiedere più tempo per la coagulazione.

Plasma: Prelevare il sangue in provette da centrifuga contenenti un anticoagulante (p. es. Sarstedt Monovette con un'adeguata preparazione per il plasma) e centrifugare subito dopo il prelievo.

5.2 Conservazione dei campioni

Conservare i campioni tappati fino a 2 mesi tra 2 °C e 8 °C prima di essere analizzati.

Congelare solo una volta a -20 °C i campioni conservati per un periodo più lungo (fino a 24 mesi) prima dell'analisi. Mescolare per inversione alcune volte i campioni scongelati prima dell'analisi.

5.3 Diluizione dei campioni

Se in un'analisi iniziale si rileva che un campione contiene più analita rispetto allo standard più elevato, il campione può essere diluito con lo *Standard 0* e riesaminato come descritto in "Procedura dell'analisi".

Per il calcolo della concentrazione, considerare questo fattore di diluizione.

Esempio:

- a) diluizione 1:10: 10 µL campione + 90 µL *Standard 0*; Agitare bene.
- b) diluizione 1:100: 10 µL della diluizione a) + 90 µL *Standard 0*; Agitare bene.

6 PROCEDURA DELL'ANALISI

6.1 Indicazioni generali

- Portare tutti i reagenti e i campioni a temperatura ambiente (tra 20 °C e 26 °C) prima dell'uso.
- Miscelare tutti i reagenti senza formare schiuma.
- Non scambiare tra loro i tappi dei flaconi dei reagenti per evitare contaminazioni incrociate.
- Per ogni componente, standard, controllo o campione è necessario utilizzare un nuovo puntale monouso per evitare effetti di trascinarsi.
- Mescolare accuratamente il contenuto dei pozzetti della micropiastra al fine di garantire buoni risultati del test.
- Non lasciare asciugare i pozzetti durante l'analisi; aggiungere i reagenti subito dopo aver completato le fasi di risciacquo.
- Una volta avviato il test, completare tutti i passaggi senza interruzioni e seguendo lo stesso ordine per ogni passaggio.
- La reazione enzimatica è linearmente proporzionale al tempo e alla temperatura.
- La densità ottica è una funzione del tempo di incubazione e della temperatura. Rispettare i tempi e le temperature di incubazione come indicato nel capitolo "Procedura dell'analisi".
- Prima di iniziare l'analisi, si raccomanda che tutti i reagenti siano pronti, i tappi rimossi, tutti i pozzetti necessari fissati nel supporto, ecc. Questo garantirà un tempo trascorso identico per ogni fase di pipettamento senza interruzioni.
- **Nota importante per la procedura di lavaggio:**
Il lavaggio è fondamentale. I pozzetti lavati in modo improprio daranno risultati errati. La sensibilità e la precisione di questo dosaggio sono notevolmente influenzate dalla corretta esecuzione della procedura di lavaggio!
- **Prestazioni analitiche utilizzando dispositivi di analisi completamente automatizzati:**
È possibile eseguire test automatizzati utilizzando dispositivi di analisi a sistema aperto completamente automatizzati. Tuttavia, la combinazione deve essere convalidata dall'utente.

6.2 Esecuzione dell'analisi

Prevedere una curva standard in ogni analisi.

I controlli servono come controlli interni per la valutazione dell'affidabilità della procedura di analisi. Analizzarli in ogni seduta analitica.

La procedura di analisi indicata descrive l'elaborazione manuale.

1. Fissare i pozzetti necessari sul supporto.
2. Pipettare **15 µL** ciascuno di **Standard, Control** e **campione** nei pozzetti appropriati, cambiando ogni volta la punta monouso.
3. Pipettare **100 µL Assay Buffer** in ogni pozzetto.
Agitare bene per 10 secondi. È molto importante raggiungere un completo mescolamento.
4. Incubare per **120 minuti** a temperatura ambiente.
5. Lavare i pozzetti come segue:
Nel caso in cui la fase di lavaggio venisse eseguita manualmente:
Scuotere energicamente il contenuto dei pozzetti.
Sciacquare i pozzetti **3 volte** con **300 µL** per pozzetto di soluzione di lavaggio diluita.
Nel caso venisse utilizzato un lavatore di micropiastre automatizzato:
Lavare i pozzetti **3 volte** con **400 µL** per pozzetto di soluzione di lavaggio diluita.
Al termine della fase di lavaggio, battere sempre energicamente i pozzetti su carta assorbente per rimuovere le goccioline residue.
6. Aggiungere **100 µL** della **Antiserum** ad ogni pozzetto.
7. Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente.
8. Lavare come descritto al punto 5.
9. Aggiungere **100 µL** della **Enzyme Complex** ad ogni pozzetto.
10. Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente.
11. Lavare come descritto al punto 5.
12. Aggiungere **100 µL** della **Substrate Solution** ad ogni pozzetto.
13. Incubare per **15 minuti** a temperatura ambiente.
14. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **50 µL** della **Stop Solution** ad ogni pozzetto.
15. Misurare la densità ottica della soluzione in tutti i pozzetti **a 450 nm (lettura) e tra 620 nm e 630 nm (sottrazione del fondo, consigliata)** con un lettore di micropiastre.
Si consiglia di leggere i pozzetti **entro 10 minuti** dopo l'aggiunta della **Stop Solution**.

6.3 Calcolo dei risultati

1. Calcolare i valori medi di densità ottica (DO) per ogni set di standard, controlli e campioni dei pazienti.
2. In un grafico lineare su carta millimetrata, costruire una curva standard tracciando la DO (media) ottenuta da ogni standard contro la sua concentrazione con il valore di DO sull'asse verticale (Y) e la concentrazione sull'asse orizzontale (X).
3. Determinare la concentrazione del campione corrispondente dalla curva standard utilizzando il valore DO (medio) per ciascun campione.
4. Metodo automatico:
I risultati nelle Istruzioni per l'uso sono stati calcolati automaticamente utilizzando un adattamento della curva a 4 parametri. (4 Parametri Rodbard o 4 Parametri Marquardt sono i metodi preferiti). Altre funzioni di riduzione dei dati possono dare risultati leggermente diversi.
5. Leggere la concentrazione dei campioni direttamente da questa curva standard. Diluire ulteriormente i campioni con concentrazione superiore a quella dello standard più elevato o referarli come > 100 ng/mL
Considerare questo fattore di diluizione per il calcolo delle concentrazioni.
6. Per le determinazioni in duplicato, prendere la media dei due valori. Se i due valori si discostassero notevolmente l'uno dall'altro, DRG consiglia di ritestare i campioni.

6.3.1 Esempio di una curva standard tipica

I seguenti dati sono a scopo soltanto dimostrativo e **non possono** sostituire i dati generati dall'esecuzione dell'analisi.

Standard	Densità ottiche (450 nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	0,02
Standard 1 (2 ng/mL)	0,07
Standard 2 (5 ng/mL)	0,16
Standard 3 (25 ng/mL)	0,74
Standard 4 (50 ng /ml)	1,41
Standard 5 (100 ng/mL)	2,30

7 VALORI DI RIFERIMENTO

È consigliabile che ogni laboratorio determini i propri valori normali e patologici.

In uno studio condotto con soggetti apparentemente sani, usando il DRG Leptin Sandwich ELISA, i seguenti valori sono stati trovati:

IMC (BMI)	Uomini e donne adulti			Bambini (1 - 10 anni) non determinato
	18,5 – 24,9	25 – 30	> 30	
n	18	12	9	51
2,5. - 97,5. percentile (ng/mL)	< 0,7 – 8,3	1,5 – 19,3	4,0 – 32,0	< 0,7 – 7,0
Media (ng/mL)	3,4	7,4	14,1	2,8
Mediana (ng/mL)	2,3	5,6	7,1	2,6
Intervallo (min. - max.) (ng/mL)	< 0,7 – 9,1	1,3 – 21,2	3,4 – 32,1	< 0,7 – 11,7

I risultati da soli non dovrebbero essere l'unico motivo per eventuali conseguenze terapeutiche. Correlare i risultati ad altre osservazioni cliniche e test diagnostici.

8 CONTROLLO QUALITÀ

Le regole di buona pratica di laboratorio richiede che i controlli vengano misurati assieme ad ogni curva di calibrazione. Analizzare un numero statisticamente significativo di controlli per stabilire valori medi e intervalli accettabili al fine di garantire prestazioni adeguate.

Si consiglia di utilizzare controlli secondo le normative statali e federali. Si consiglia l'uso di controlli per garantire la validità quotidiana dei risultati. Si consiglia l'uso di controlli sia a livello normale che patologico.

I controlli ed i corrispondenti risultati del Laboratorio Controllo Qualità sono riportati nel Certificato di Analisi (CoA) inserito nel kit. I valori e gli intervalli indicati sul Certificato di analisi si riferiscono sempre al lotto del kit corrente e devono essere utilizzati per il confronto diretto dei risultati.

Se disponibili, si consiglia inoltre di utilizzare programmi di valutazione della qualità nazionali o internazionali al fine di garantire l'accuratezza dei risultati.

Impiegare metodi statistici appropriati per analizzare i valori e gli andamenti dei controlli. Se i risultati del test non si adattano agli intervalli di riferimento stabiliti per i controlli, i risultati dei pazienti non possono essere considerati validi.

In tal caso, verificare le seguenti aree tecniche: Dispositivi di pipettamento e temporizzazione; fotometro, date di scadenza dei reagenti, condizioni di conservazione e incubazione, metodi di aspirazione e lavaggio.

Dopo aver verificato le voci sopra indicate senza riscontrare alcun errore, contattare il proprio distributore o direttamente DRG.

9 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

9.1 Intervallo di misurazione

L'intervallo di misurazione è compreso tra 0,7 ng/mL - 100 ng/mL.

9.2 Specificità degli anticorpi (reazioni incrociate)

Per informazioni sulla sostanza analizzata, si prega di far riferimento alle istruzioni per l'uso dettagliate in inglese.

9.3 Sensibilità

La sensibilità analitica [$DO_{media(Standard\ 0)} + 2 \times SD, n = 20$] è stata calcolata a 0,7 ng/mL.

Per i dati dettagliati su

9.4 Riproducibilità

9.5 Recupero

9.6 Linearità

si prega di far riferimento alle istruzioni per l'uso dettagliate in inglese.

10 LIMITAZIONI D'USO

Si otterranno risultati affidabili e riproducibili quando la procedura del test viene eseguita con una comprensione completa delle istruzioni riportate nel foglietto illustrativo e con l'adesione alle regole di buona pratica di laboratorio.

Qualsiasi manipolazione impropria dei campioni o modifica di questo test potrebbe influenzare i risultati.

10.1 Sostanze interferenti

Emoglobina (fino a 4 mg/mL), bilirubina (fino a 0,5 mg/mL) e trigliceridi (fino a 30 mg/mL) non influenzano i risultati di questo test.

La biotina fino a 1200 ng/mL in un campione non influisce sui risultati di questo test.

10.2 Droghe interferenti

Fino ad oggi nessuna sostanza (farmaco) è conosciuta a noi che abbia influenzato la determinazione di leptina nel campione.

10.3 Effetto Hook (Gancio) ad alto dosaggio

Nessun effetto Hook (gancio) è stato osservato in questo prodotto fino a 5000 ng/mL di leptina.

11 ASPETTI LEGALI

11.1 Affidabilità dei risultati

Eseguire il test seguendo esattamente le istruzioni per l'uso del produttore. Inoltre, l'utilizzatore deve attenersi rigorosamente alle regole della GLP (Buona Pratica di Laboratorio) o ad altri standard e/o leggi nazionali applicabili. Ciò è particolarmente rilevante per l'uso di reagenti di controllo. È importante includere sempre, all'interno della procedura dell'analisi, un numero sufficiente di controlli per convalidare l'accuratezza e la precisione del test.

I risultati dell'analisi sono validi solo se tutti i controlli rientrano negli intervalli specificati e se anche tutti gli altri parametri dell'analisi rientrano nelle specifiche fornite. In caso di dubbi o preoccupazioni si prega di contattare DRG.

11.2 Conseguenze terapeutiche

Le conseguenze terapeutiche non dovrebbero mai basarsi solo sui risultati di laboratorio, anche se tutti i risultati dei test sono in accordo con gli elementi indicati al punto 11.1. Qualsiasi risultato di laboratorio costituisce solo una parte del quadro clinico totale di un paziente.

Solo nei casi in cui i risultati di laboratorio sono in accordo accettabile con il quadro clinico complessivo del paziente potrebbero essere decise conseguenze terapeutiche. Il risultato dell'analisi stessa non dovrebbe mai essere l'unico determinante per decidere eventuali conseguenze terapeutiche.

11.3 Responsabilità legali

Qualsiasi modifica del kit e/o scambio o miscela di componenti di lotti diversi da un kit all'altro potrebbe influire negativamente sui risultati previsti e sulla validità complessiva del test. Tali modifiche e/o sostituzioni invalidano qualsiasi richiesta di sostituzione.

Anche i reclami presentati a causa di un'interpretazione errata da parte del cliente dei risultati di laboratorio, soggetti al punto 11.2, non sono validi.

Indipendentemente da ciò, in caso di reclamo, la responsabilità del produttore non deve superare il valore del kit.

Eventuali danni causati al kit durante il trasporto non sono soggetti alla responsabilità del produttore.

11.4 Segnalazione di incidenti gravi

Tutti gli incidenti gravi relativi a questo prodotto devono essere notificati al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro in cui l'utilizzatore e/o il paziente sono stabiliti.

1 FINALIDAD PREVISTA

El kit **Leptin Sandwich ELISA** de DRG es un inmunoensayo enzimático manual para la medición **cuantitativa** de leptina en suero o plasma humano (heparina de litio).

Para uso en diagnóstico *in vitro*. Para uso profesional en laboratorio.

2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El Kit DRG Leptin Sandwich ELISA es un ensayo en fase sólida de inmuoadsorción unido a enzimas (ELISA), basado en el **principio del sándwich**.

Los pocillos de las placas están recubiertos con un anticuerpo monoclonal dirigido contra un único foci antigénico de la molécula de leptina.

Durante la primera incubación, la leptina de la muestra añadida se une al anticuerpo inmovilizado.

El material de la muestra que no se ha unido se lava.

En una segunda incubación, el antisuero añadido, que contiene anticuerpo antileptina biotinilado, forma un complejo tipo sándwich con la leptina unida en los pocillos del microtítulo.

Después, el antisuero no unido se lava y se añade el complejo de peroxidasa de estreptavidina (complejo enzimático) para la detección de las moléculas de biotina.

Después de un paso de lavado para eliminar todas las sustancias no ligadas, la fase sólida se incuba con la solución de sustrato. La reacción colorimétrica se detiene mediante la adición de la solución de parada, y se mide la densidad óptica (OD) del producto amarillo resultante. La intensidad del color es proporcional a la concentración del analito en la muestra.

Se construye una curva estándar trazando los valores de DO frente a las concentraciones de los estándares, y las concentraciones de las muestras desconocidas se determinan utilizando esta curva estándar.

3 ADVERTENCIA Y PRECAUCIONES

- Este kit es sólo para uso en diagnóstico *in vitro*. Sólo para uso profesional en laboratorio.
- Antes de empezar el ensayo, lea las instrucciones de uso completa y cuidadosa. Use la versión válida de las instrucciones de uso suministrada con el kit. Asegúrese de que ha comprendido todo el contenido.
- No mezclar o usar componentes de kits con distinto número de lote. Se recomienda no intercambiar pocillos de distintas placas incluso si son del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviados o almacenados en diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar ligeramente diferentes
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad que aparece en las etiquetas del kit.
- No reutilice los pocillos de la microplaca.
- No se deben usar reactivos de otros fabricantes junto con los reactivos de este kit.
- Todos los reactivos en este kit son líquidos claros, la solución de sustrato es clara e incolora. Los cambios en su apariencia podrían afectar al rendimiento del test. En ese caso, contacte con DRG.
- La contaminación microbiana de los reactivos o muestras podría dar falsos resultados.
- Deje que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (20 °C a 26 °C) antes de empezar la prueba. La temperatura afectará a la densidad óptica de las lecturas del ensayo.
- Todos los volúmenes indicados han de ser realizados de acuerdo con el protocolo. Los resultados óptimos del ensayo se obtienen solo cuando se utilizan pipetas y lectores de microplacas calibrados.
- Usar recipientes sólo para un único reactivo. Esto se aplica especialmente para los recipientes para sustrato. Usar un recipiente para dispensar una solución de sustrato que se haya usado previamente para la solución de conjugado podría dar color a esta solución. No verter reactivos de nuevo en los viales originales, debido al riesgo de contaminación.

Precauciones generales

- Seguir prácticas de laboratorio adecuadas y las normas de seguridad.
- Nunca pipetear con la boca y evitar el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y con membranas mucosas.
- No fumar, comer, beber o usar cosméticos en áreas donde las muestras o los reactivos del kit están siendo usados.
- Usar batas de laboratorio y guantes de látex desechables cuando se utilicen las muestras y los reactivos, y gafas de seguridad cuando sea necesario.

Información acerca del riesgo biológico

- Todos los reactivos en este kit de ensayo que contienen suero o plasma humano han sido analizados, y se han confirmado como negativos a HIV I/II, HBsAg y HCV mediante procedimientos aprobados por la FDA. Sin embargo, ningún método de análisis conocido puede ofrecer completa seguridad de que no haya agente infeccioso presente.
- Este ensayo contiene material de origen animal, certificado como aparentemente libre de infecciones o enfermedades contagiosas y parásitos dañinos.
- Los componentes bovinos provienen de países donde no se han reportado casos de EEB.
- Todos los materiales y muestras de origen humano o animal deben ser tratadas como si pudieran transmitir enfermedades infecciosas.
- El manejo debe realizarse de acuerdo a los procedimientos definidos por las apropiadas directrices o regulaciones nacionales de riesgo biológico y seguridad. Los residuos deben ser desechados de acuerdo a las regulaciones locales.

Información acerca del riesgo químico y clasificación de riesgos

- Algunos reactivos contienen ProClin 300®, BND o MIT como conservantes en concentraciones no declarables. De todos modos, debe enjuagarse inmediatamente con agua en caso de contacto con los ojos o la piel.
- La solución de sustrato contiene un ingrediente en concentraciones no declarables que causa irritación ocular severa. En caso de contacto con los ojos, enjuague inmediatamente, con cuidado y concienzudamente los ojos con agua o lavador de ojos. En caso de contacto con la piel, lávese con abundante agua. Quítese la ropa contaminada y lávela antes de volver a utilizarla.
- Evitar contacto con la Solución de parada, que contiene H₂SO₄ 0,5 M. Puede provocar irritación y quemaduras en la piel.
- Los productos químicos y los reactivos preparados o usados deben ser tratados como un desecho peligroso de acuerdo a las directrices o regulaciones de seguridad nacionales.
- Este producto no contiene sustancias que tengan propiedades cancerígenas, mutagénicas o tóxicas para la reproducción (CMR).

NINGUNO de los reactivos de este kit contienen sustancias peligrosas en concentraciones que deban ser declarados, por lo que la clasificación y etiquetado no son necesarias.

Para obtener información detallada, puede revisar la Ficha de Datos de Seguridad, que puede obtener pidiéndola directamente a DRG.

4 MATERIALES

4.1 Materiales suministrados en el kit

1. **Microtiterwells** (Placas multipocillo), 12 x 8 tiras, 96 pocillos (individualmente separables); Pocillos recubiertos con anticuerpo anti-leptina (monoclonal).
2. **Standard (Standard 0 - 5)**, (Estándar), 6 viales, 0,5 mL cada, liofilizados; Concentraciones: 0 – 2 – 5 – 25 – 50 – 100 ng/mL
Los estándares están calibrado contra el siguiente material de referencia: WHO International Standard Leptin, human; NIBSC Code 97/594
Ver “Preparación de los Reactivos”.
Contiene conservante sin mercurio.
3. **Control Low & High** (Control), 2 viales, 0,5 mL cada, liofilizados;
Para los valores y rangos de control, por favor consulte la etiqueta del frasco o el Certificado de Análisis.
Ver “Preparación de los Reactivos”.
Contiene conservante sin mercurio.
4. **Assay Buffer** (Tampón de ensayo), 1 vial, 11 mL, listo para usar;
Contiene conservante sin mercurio.
5. **Antiserum** (Antisuero), 1 vial, 11 mL, listo para usar;
Anticuerpo anti-leptina monoclonal, biotinilado
Contiene conservante sin mercurio.
6. **Enzyme Complex** (Complejo enzimático), 1 vial, 11 mL, listo para usar;
Estreptavidina conjugado con la peroxidasa de rábano;
Contiene conservante sin mercurio.
7. **Substrate Solution** (Solución de sustrato), 1 vial, 14 mL, listo para usar;
Contiene 3,3',5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB).
Mantener alejado de la luz solar directa.
8. **Stop Solution** (Solución de parada), 1 vial, 14 mL, listo para usar;
Contiene 0.5 M H₂SO₄.
Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en al piel.
9. **Wash Solution** (Solución de lavado), 1 vial, 30 mL (concentrado 40X);
Ver “Preparación de los Reactivos”.
10. **Instructions for Use** (Instrucciones de uso)
11. **Certificate of Analysis (CoA)** Certificado de análisis

4.2 Materiales necesarios pero no suministrados

- Lector de microplacas calibrado (450 nm, con longitud de onda de referencia a 620 nm a 630 nm)
- Micropipetas de precisión variable calibradas
- Equipo manual o automático para el lavado de placas de microtitulación
- Papel absorbente
- Agua destilada
- Temporizador
- Papel cuadriculado o software para el cálculo de datos

4.3 Almacenamiento y estabilidad del kit

Cuando se almacena a 2 °C a 8 °C, los reactivos sin abrir mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad.

No utilizar los reactivos más allá de esta fecha.

Los reactivos abiertos han de almacenarse de 2 °C a 8 °C.

Los kits abiertos conservan su actividad durante 8 semanas si se almacenan como se ha descrito arriba.

La placa microtituladora contiene tiras desprendibles. No abra la funda de los pocillos hasta que alcancen la temperatura ambiente. Los pocillos sin usar deben almacenarse entre 2 °C y 8 °C en una funda de aluminio sellada, incluyendo el desecante, y deben usarse en el soporte provisto. Cuando la funda de aluminio se haya abierto, se debe procurar cerrarla nuevamente de forma ajustada.

4.4 Preparación de los reactivos

Dejar que todos los reactivos y el número requerido de tiras alcancen la temperatura ambiente (20 °C a 26 °C) antes de usarse.

Standards

Reconstituya el contenido liofilizado de cada tubo con 0,5 mL de agua destilada y espere al menos 10 minutos a temperatura ambiente. Mezcle varias veces antes de usar.

Nota: *Los estándares reconstituidos son estables durante 6 semanas a 2 °C a 8 °C.
Para un almacenamiento más largo, los estándares reconstituidos deben ser alicuotados y congelados a -20 °C.*

Control

Reconstituya el contenido liofilizado de cada tubo con 0,5 mL de agua destilada y espere al menos 10 minutos a temperatura ambiente. Mezcle varias veces antes de usar.

Nota: *El control reconstituido es estable durante 6 semanas a 2 °C a 8 °C.
Para un almacenamiento más largo, los controles reconstituidos deben alicuotarse y congelarse a -20 °C.*

Wash Solution

Mezclar 30 mL de *Wash Solution* concentrada con 1170 mL de agua destilada hasta un volumen final de 1200 mL.
La solución del lavado diluida es estable durante 1 semana a temperatura ambiente.

4.5 Eliminación del Kit

El desecho del kit y de los materiales/reactivos usados ha de realizarse conforme a la regulación nacional en vigor. Información adicional sobre este producto se ofrece en las hojas de datos de seguridad (Safety Data Sheet), sección 13).

4.6 Kits de ensayo dañados

En caso de cualquier daño severo en el kit o en sus componentes, DRG ha de ser informada por escrito una semana después de recibir el kit como fecha límite. Componentes individuales que hayan sufrido daños importantes no deberían usarse para realizar el test. Han de ser almacenados hasta que se haya encontrado una solución final al problema. Después de encontrarse una solución, pueden ser desechados en concordancia con las reglas oficiales en vigor.

5 TOMA DE LA MUESTRA, ALMACENAMIENTO Y PREPARACIÓN

En este ensayo pueden ser usados los tipos de muestra detallados a continuación:

Suero o plasma humanos (heparina de litio)

No deben usarse muestras que contengan acida sódica.

En general, se debe evitar el uso de muestras hemolíticas, ictericas o lipémicas. Para más información consulte el capítulo "*Sustancias que pueden interferir*".

5.1 Toma de muestras

Suero: Recoger la sangre por punción en la vena (ej. Sarstedt Monovette para el suero), permitir coagulación, y separar el suero por centrifugación a temperatura ambiente. No centrifugar antes de la coagulación completa. Las muestras de pacientes que reciben terapia anticoagulante requieren más tiempo para coagular.

Plasma: Toda la sangre ha de recogerse en tubos de centrifuga que contengan anticoagulante (Ej. Sarstedt Monovette con una preparación adecuada para el plasma) y centrifugar inmediatamente tras la recogida.

5.2 Almacenamiento de las muestras

Las muestras deben ser tapadas y pueden ser almacenadas hasta 2 meses a 2 °C a 8 °C antes del ensayo.

Las muestras almacenadas por un período de tiempo mas largo (hasta 24 meses) han de congelarse sólo una vez a -20 °C antes del ensayo. Las muestras descongeladas deben invertirse varias veces antes del ensayo.

5.3 Dilución de las muestras

Si en un ensayo inicial, se encuentra una muestra que presenta valores mayores que el estándar mas concentrado, ha de diluirse con *Standard 0* y volver a ensayarse como se describe en el "Procedimiento de Ensayo".

Para el cálculo de las concentraciones habrá que tener en cuenta el factor de dilución.

Ejemplo:

- a) dilución 1:10: 10 µL muestra + 90 µL *Standard 0* (mezclar totalmente)
- b) dilución 1:100: 10 µL dilución a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (mezclar totalmente).

6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 Notas acerca del procedimiento

- Todos los reactivos y muestras han de estar a temperatura ambiente (20 °C a 26 °C) antes de su uso.
- Todos los reactivos deben mezclarse sin formar espuma.
- No intercambiar los tapones de los viales de reactivo para evitar contaminación cruzada.
- Utilizar puntas de pipeta de plástico nuevas y desechables para cada estándar, control o muestra para evitar el arrastre (carry-over).
- Mezclar los contenidos de los pocillos de la microplaca cuidadosamente para asegurar buenos resultados en el test.
- No dejar que los pocillos se sequen durante el ensayo; añadir los reactivos inmediatamente después de completar los pasos de enjuagado.
- Una vez se ha comenzado el ensayo deben completarse todos los pasos sin interrupción y en la misma secuencia para cada paso.
- La reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y a la temperatura.
- La densidad óptica es función del tiempo de incubación y la temperatura. Respetar los tiempos de incubación y temperaturas, tal y como están indicadas en el capítulo "Procedimiento del ensayo".
- Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén preparados, tapas removidas, todos los pocillos que se necesiten asegurados en recipiente, etc. Esto asegurará un tiempo similar para cada paso de pipeteo sin que haya interrupciones.
- **Nota importante al procedimiento de lavado:**
El lavado es crítico. Los pocillos lavados incorrectamente darán resultados erróneos. La sensibilidad y la precisión de este ensayo se ve marcadamente influenciada por la realización correcta del proceso de lavado!
- **Rendimiento del ensayo usando instrumentos de análisis completamente automatizados:**
Es posible realizar este ensayo usando instrumentos de análisis abiertos y completamente automatizados. Sin embargo, la combinación debe ser validada por el usuario.

6.2 Procedimiento del ensayo

Cada uno debe incluir una curva de estándares.

Los controles sirven como controles internos para la fiabilidad del procedimiento del ensayo. Estos deben ser incluidos en cada montaje.

El procedimiento del ensayo provisto describe el procesamiento manual.

1. Asegurar el número deseado de pocillos en el recipiente.
2. Dispensar **15 µL** de cada **Standard, Control** y **muestras** con puntas nuevas en los pocillos adecuados.
3. Dispensar **100 µL** de **Assay Buffer** a cada pocillo.
Mezclar totalmente durante 10 segundos. Es importante mezclar completamente en este paso.
4. Incubar durante **120 minutos** a temperatura ambiente.
5. Lavar los pocillos como se indica
Si se realiza un lavado manual:
Agitar energéticamente los contenidos de los pocillos.
Lavar los pocillos **3 veces** con **300 µL Wash Solution** diluida por pocillo.
Si se utiliza un lavador de placas automatizado:
Lavar los pocillos **3 veces** con **400 µL Wash Solution** diluida por pocillo.
Al final del paso lavado, siempre dar un golpe seco en los pocillos sobre papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
6. Dispensar **100 µL** de **Antiserum** a cada pocillo.
7. Incubar durante **30 minutos** a temperatura ambiente.
8. Lavar como se describe en el paso 5.
9. Dispensar **100 µL** de **Enzyme Complex** a cada pocillo.
10. Incubar durante **30 minutos** a temperatura ambiente.
11. Lavar como se describe en el paso 5.
12. Adicionar **100 µL** de **Substrate Solution** a cada pocillo.
13. Incubar durante **15 minutos** a temperatura ambiente.
14. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **50 µL** de **Stop Solution** a cada pocillo.
15. Determinar la densidad óptica (DO) de la solución en cada pocillo a **450 nm (lectura) y a 620 nm a 630 nm (se recomienda la sustracción de fondo)** con un lector de microplacas. Se recomienda que los pocillos se lean dentro de los **10 minutos** siguientes a la adición de la solución de parada (*Stop Solution*).

6.3 Cálculo de los Resultados

1. Calcular los valores de densidad óptica (DO) promedio para cada conjunto de estándares, controles y muestras de pacientes.
2. Usando papel cuadriculado lineal, construir una curva estándar mediante la representación de la densidad óptica media obtenida para cada estándar frente a su concentración con el valor de DO en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Determinar la concentración correspondiente a partir de la curva estándar utilizando el valor (medio) de DO para cada muestra.
4. Método automatizado:
Los resultados en las instrucciones de uso se han calculado automáticamente usando una curva de regresión 4 Parámetros. (4 Parámetros Rodbard o 4 Parámetros Marquardt son los métodos preferidos.) Otras funciones de regresión darán lugar a resultados sensiblemente diferentes.
5. La concentración de las muestras puede leerse directamente de la curva de estándares. Las muestras con concentraciones superiores al mayor estándar pueden diluirse de nuevo, o reportarse como > 100 ng/mL. Para el cálculo de las concentraciones hay que tener en cuenta el factor de dilución.
6. En caso de duplicar las muestras, se debe medir la media de ambos valores. Si los dos valores presentan una desviación sustancial entre ellos, DRG recomienda volver a analizar las muestras.

6.3.1 Ejemplo de una Curva Estándar Típica

Los siguientes datos son solamente para la explicación y **no** pueden ser utilizados en lugar de los datos generados en el momento del ensayo.

Estándar	Densidad óptica (450 nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	0,02
Standard 1 (2 ng/mL)	0,07
Standard 2 (5 ng/mL)	0,16
Standard 3 (25 ng/mL)	0,74
Standard 4 (50 ng /ml)	1,41
Standard 5 (100 ng/mL)	2,30

7 VALORES DE REFERENCIA

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio determine sus valores normales e inusuales.

En un estudio llevado a cabo con individuos aparentemente sanos, usando el DRG Leptin Sandwich ELISA, se obtuvieron los siguientes valores:

	Mujeres y hombres adultos			Niños (1 - 10 años)
	18,5 – 24,9	25 – 30	> 30	No determinado
IMC (BMI)				
n	18	12	9	51
Percentil 2,5 - 97,5 (ng/mL)	< 0,7 – 8,3	1,5 – 19,3	4,0 – 32,0	< 0,7 – 7,0
Media (ng/mL)	3,4	7,4	14,1	2,8
Mediana (ng/mL)	2,3	5,6	7,1	2,6
Rango (min. - max.) (ng/mL)	< 0,7 – 9,1	1,3 – 21,2	3,4 – 32,1	< 0,7 – 11,7

Los resultados obtenidos no deberían ser el único motivo para una intervención terapéutica. Los resultados han de correlacionarse con otras observaciones clínicas y tests de diagnóstico.

8 CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda usar muestras control de acuerdo con las leyes estatales y federales. El uso de muestras control se recomienda para asegurar la validez diaria de los resultados. Usar controles tanto a niveles normal como patológico.

Los controles y los correspondientes resultados del Laboratorio de control de calidad están fijados en el certificado de control de calidad que acompañan al kit. Los valores y los rangos fijados en la hoja del control de calidad se refieren siempre al kit actual y deben usarse para la comparación directa de los resultados.

Si está disponible, también se recomienda hacer uso de programas de Aseguramiento de la Calidad nacionales o internacionales para asegurar la exactitud de los resultados.

Utilizar métodos estadísticos apropiados para el análisis de los valores y tendencia de los controles. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos aceptables establecidos en los controles, los resultados obtenidos de los pacientes han de considerarse inválidos.

En este caso, por favor comprobar las siguientes áreas técnicas: Pipeteo y tiempo empleado, fotómetro, fecha de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado.

Después de comprobar los asuntos arriba mencionado sin encontrar ningún error, contactar con su distribuidor o con DRG directamente.

9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

9.1 Rango dinámico del ensayo

El rango del ensayo se encuentra entre 0,7 ng/mL - 100 ng/mL.

9.2 Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)

Para obtener más información acerca de las sustancias analizadas, puede revisar la versión en inglés de las Instrucciones de uso.

9.3 Sensibilidad

La sensibilidad analítica [DO media(Standard 0) + 2 × SD, n = 20] se calculó en 0,7 ng/mL.

Para información sobre

9.4 Repetibilidad

9.5 Recuperación

9.6 Linealidad

por favor consulte la versión detallada en inglés de las Instrucciones de Uso.

10 LIMITACIONES DE USO

Únicamente se obtendrán resultados fiables y reproducibles, cuando el procedimiento del ensayo se realice entendiendo las instrucciones de uso correctamente y desarrollando buenas prácticas de laboratorio.

Cualquier manejo impropio de las muestras o modificación del test puede influenciar los resultados.

10.1 Sustancias que pueden interferir

Hemoglobina (hasta 4 mg/mL), Bilirrubina (hasta 0,5 mg/mL) y Triglicéridos (hasta 30 mg/mL) no influyen los resultados del ensayo.

Una concentración de biotina de hasta 1200 ng/mL en una muestra no tiene influencia en los resultados de la prueba.

10.2 Interferencias con medicamentos

Hasta ahora no se han encontrado sustancias (drogas) conocidas por nosotros, que tengan influencia en la medida de leptina en una muestra.

10.3 Efecto de Alta Concentración (Gancho)

No se ha observado efecto gancho en este ensayo hasta 5000 ng/mL de leptina.

11 ASPECTOS LEGALES

11.1 Fiabilidad de los Resultados

El ensayo debe realizarse exactamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Mas aún, el usuario debe ajustarse estrictamente a las reglas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) o a otros estándares y/o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de ensayo, un número suficiente de controles para validar la exactitud y la precisión del ensayo.

Los resultados del ensayo son válidos sólo si todos los controles se encuentran dentro de los rangos especificados y si todos los otros parámetros del ensayo se encuentran dentro de las especificaciones dadas para el ensayo. En caso de alguna duda o inquietud, por favor, contactar con DRG.

11.2 Consecuencias Terapéuticas

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse sólo en los resultados de laboratorio incluso si todos los resultados del ensayo están de acuerdo con los asuntos fijados en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico de un paciente.

Solamente en los casos donde los resultados de laboratorio están en acuerdo con todo el cuadro clínico de un paciente, se pueden derivar consecuencias terapéuticas.

Nunca deben derivarse consecuencias terapéuticas a partir de solamente el resultado obtenido en el ensayo

11.3 Responsabilidad

Cualquier modificación del kit y/o cambio o mezcla de cualquier componente procedentes de kits de lotes diferentes puede afectar negativamente a los resultados esperados y en la validez de todo el test. Esas modificaciones y/o cambios invalidan cualquier reclamación de reposición.

Las reclamaciones emitidas debidas a una mala interpretación de los resultados de laboratorio por parte del comprador referidos al punto 11.2 son también inválidas. A pesar de todo, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no excede el valor del kit. Cualquier daño provocado al kit durante su transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.













11.4 Información de incidentes graves

Cualquier incidente grave relacionado con el producto deberá comunicarse al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que estén establecidos el usuario y/o el paciente.

12 REFERENCES / LITERATURE

1. Londraville RL, et al. Comparative endocrinology of leptin: assessing function in a phylogenetic context. *Gen Comp Endocrinol* (2014) 203:146–57.
2. Bjorbaek C, Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* (2004) 59:305–32.
3. Arora S. Leptin and its metabolic interactions – an update. *Diabetes Obes Metab* (2008) 10(11): 973–93.
4. Elias CF et al. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* (1999) 23(4):775–86.
5. Elmquist JK. Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioral effects of leptin. *Physiol Behav* (2001) 74(4):703–8.
6. Brennan AM, Mantzoros CS. Drug Insight: the role of leptin in human physiology and pathophysiology--emerging clinical applications". *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* (2006) 2 (6): 318–27.
7. Considine RV et al. "Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans". *N Engl J Med.* (1996). 334 (5): 292–5.
8. Pan H, Guo J, Su Z "Advances in understanding the interrelations between leptin resistance and obesity". *Physiology & Behavior.* (2014) 130: 157–169.
9. Ahima RS, Qi Y, Singhal NS, Jackson MB, Scherer PE. Brain adipocytokine action and metabolic regulation. *Diabetes.* (2006) 55(Suppl 2):145–54.
10. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* (2000) 11(8): 327–32.
11. Weigle DS et al. Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse. *J Clin Invest.* (1995) 96(4):2065
12. Farooqi IS et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest.* (2002) 110(8):1093–103.
13. Ma Z, et al. Radioimmunoassays of leptin in human plasma *Clin Chem.* (1996); 42 (6 Pt 1): 942-6
14. Wallace AM. Measurement of Leptin and Leptin binding in the human circulation *Ann of Clin Biochem.* (2000), 37: 244-52
15. Meier et al. Endocrine regulation of energy metabolism: a review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin *Clin Chem.* (2004); 50 (9): 1511-25

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico in vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence
	Batch code *	Fertigungslosnummer, Charge *	Lotto no	Número de lote	No. de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Biological risks *	Biologische Risiken *	Rischi biologici	Riesgos biológicos	Risques biologiques
	Caution *	Achtung *	Attenzione	Precaución	Attention
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen / Anzahl	Volume / Quantità	Volumen / Número	Volume / Quantité
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Micropozzetti	Placas multipocillo	Microplaques
<i>Antiserum</i>	Antiserum	Antiserum	Antisiero	Antisuero	Antisérum
<i>Enzyme Conjugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Tracciante enzimatico	Conjugado enzimático	Conjugué enzymatique
<i>Enzyme Complex</i>	Enzyme Complex	Enzymkomplex	Complesso enzimatico	Complejo enzimático	Complexe enzymatique
<i>Substrate Solution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Soluzione di substrato	Solución de sustrato	Solution substrat
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stopplösung	Soluzione d'arresto	Solución de parada	Solution d'arrêt
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Standard zero	Estándar cero	Zero Standard
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Estándar	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Controllo	Control	Contrôle
<i>Assay Buffer</i>	Assay Buffer	Assaypuffer	Tampone del test	Tampón de ensayo	Tampon d'essai
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Soluzione di lavaggio	Solución de lavado	Solution de lavage
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH (idrossido di sodio 1N)	1N NaOH	1N NaOH
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl		1 N HCl	1N HCl
<i>Sample Diluent</i>	Sample Diluent	Probenverdünnungsmedium	Diluyente dei campioni	Solución para dilución de la muestra	Solution pour dilution de l'échantillon
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungsmedium	Diluyente del tracciante	Solución para dilución del conjugado	Solution pour dilution du conjugué