



User's Manual



Leptin (Sandwich) ELISA

IVD

REF EIA-2395

 96 Wells

05/05

 Legal Manufacturer:

DRG 

DRG Instruments GmbH, Germany
Division of DRG International, Inc
Frauenbergstr. 18, D-35039 Marburg
Telefon: +49 (0)6421-17000 Fax: +49-(0)6421-1700 50
Internet: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:



Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
D - 64625 Bensheim
Tel.: +49 (0) 62 51/7 01 90 - 0
Fax: +49 (0) 62 51/84 94 30
www.immundiagnostik.com
E-mail: info@immundiagnostik.com





User's Manual



Legal Manufacturer:



DRG Instruments GmbH, Germany

Division of DRG International, Inc

Frauenbergstr. 18, D-35039 Marburg

Telefon: +49 (0)6421-17000 Fax: +49-(0)6421-1700 50

Internet: www.drg-diagnostics.de

E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:



Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a

D - 64625 Bensheim

Tel.: +49 (0) 62 51/7 01 90 - 0

Fax: +49 (0) 62 51/84 94 30

www.immundiagnostik.com

E-mail: info@immundiagnostik.com



Contents / Inhaltsverzeichnis / Contenuti

1	INTRODUCTION	2
2	PRINCIPLE OF THE TEST	2
3	PRECAUTIONS.....	2
4	KIT COMPONENTS	3
5	SPECIMEN.....	4
6	TEST PROCEDURE.....	4
7	EXPECTED VALUES	6
8	ASSAY CHARACTERISTICS.....	6
9	LIMITATIONS OF USE.....	7
10	LEGAL ASPECTS	7
11	REFERENCES	7

1	EINLEITUNG	8
2	TESTPRINZIP	8
3	VORSICHTSMAßNAHMEN.....	8
4	BESTANDTEILE DES KITS	9
5	PROBENVORBEREITUNG.....	10
6	TESTDURCHFÜHRUNG.....	10
7	ERWARTETE WERTE	12
8	ASSAY CHARACTERISTIKA	12
9	GRENZEN DES TESTS	13
10	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	13
11	REFERENZEN	13

1	INTRODUZIONE	14
2	PRINCIPIO DEL TEST	14
3	PRECAUZIONI	14
4	COMPONENTI DEL KIT.....	15
5	CAMPIONI.....	16
6	ATTUAZIONE DEL TEST	16
7	VALORI NORMALI	18
8	CARATTERISTICHE DEL TEST	18
9	LIMITAZIONE DEL TEST	19
10	ASPETTI LEGALI	19
11	BIBLIOGRAFIA.....	19

	SYMBOLS USED WITH DRG ELISA'S	20
--	-------------------------------------	----

1 INTRODUCTION

The **DRG Leptin Enzyme Immunoassay Kit** provides materials for the quantitative determination of Leptin in serum and plasma.

This assay is intended for in vitro diagnostic use only.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The DRG Leptin ELISA Kit 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 on a Leptin molecule.

An aliquot of patient sample containing endogenous Leptin is incubated in the coated well with a specific rabbit anti Leptin antibody. A sandwich complex is formed. After incubation the unbound material is washed off and an anti rabbit peroxidase conjugate is added for detection of the bound Leptin.

Having added the substrate solution, the intensity of colour developed is proportional to the concentration of Leptin in the patient sample.

3 PRECAUTIONS

- This kit is for in vitro diagnostic use only.
- For information on hazardous substances included in the kit please refer to Material Safety Data Sheets.
- 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. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
- Avoid contact with Stop Solution containing 0.5 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
- Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
- Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
- Handling should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
- Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
- 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.
- Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according the national biohazard safety guideline or regulation.
- Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DRG Instruments GmbH.
- The Safety Data Sheets fit the demands of: EU-Guideline 91/155 EC.

4 KIT COMPONENTS

4.1 Contents of the Kit

1. **Microtiter wells**, 12x8 (break apart) strips, 96 wells;
Wells coated with anti-Leptin antibody (monoclonal).
2. **Standard (Standard 0-5)**, 6 vials, 200 µl, ready to use;
Concentrations: 0, 2, 5, 25, 50 and 100 ng/ml
contain 0.3% Proclin as a preservative.
3. **Control**, 2 vials, 200 µl, ready to use;
2 levels (low and high). For control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet.
Contain 0.3% Proclin as a preservative.
4. **Assay Buffer**, 1 vial, 11 ml, ready to use,
contains 0.3% Proclin as a preservative.
5. **Antiserum**, 1 vial, 11 ml, ready to use,
polyclonal Leptin antiserum;
contains 0.3% Proclin as a preservative
6. **Enzyme Complex**, 1 vial, 11 ml, ready to use,
Anti-rabbit complex conjugated to horseradish Peroxidase;
contains < 0.3% Proclin as a preservative.
7. **Substrate Solution**, 1 vial, 11 ml, ready to use,
TMB.
8. **Stop Solution**, 1 vial, 6 ml, ready to use,
contains 0.5M H₂SO₄,
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
9. **Wash Solution**, 1 vial, 30 ml (40X concentrated),
see „Preparation of Reagents“.

Note: Additional *Standard 0* for sample dilution is available on request.

4.1.1 Equipment and material required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450±10 nm)(e.g. the DRG Instruments Microtiter Plate Reader).
- Calibrated variable precision micropipettes.
- Absorbent paper.
- Aqua dest.

4.2 Storage and stability of the Kit

When stored at 2-8°C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2-8°C. Microtiter wells must be stored at 2-8°C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

4.3 Preparation of Reagents

Allow all reagents and required number of strips to reach room temperature prior to use.

Wash Solution

Dilute 30 ml of concentrated Wash Solution with 1170 ml deionized water to a final volume of 1200 ml.
The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature.

4.4 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheets (see chapter 13).

4.5 Damaged Test Kits

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

5 SPECIMEN

Serum or plasma can be used in this assay.

Do not use haemolytic, icteric or lipaemic specimens.

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

5.1 Specimen Collection

Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), 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 anti coagulant and centrifuged immediately after collection.

(E.g. for EDTA plasma Sarstedt Monovette – red cap - # 02.166.001; for Heparin plasma Sarstedt Monovette – orange cap - # 02.165.001; for Citrat plasma Sarstedt Monovette – green cap - # 02.167.001.)

5.2 Specimen Storage

Specimens should be capped and may be stored for up to 24 hours at 2-8°C prior to assaying.

Specimens held for a longer time should be frozen only once at -20°C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the specimens can be diluted with *Standard 0* and reassayed as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example:

- a) dilution 1:10: 10 µl Serum + 90 µl Standard 0 (mix thoroughly)
- b) dilution 1:100: 10 µl dilution a) 1:10 + 90 µl Standard 0 (mix thoroughly).

6 TEST PROCEDURE

6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. 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.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

6.2 Assay Procedure

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the holder.
2. Dispense **15 µl** of each Standard, controls and samples with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **100 µl** Assay Buffer into each well.
4. Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
5. Incubate for **120 minutes** at room temperature (without covering the plate).
6. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells 3 times with diluted Wash Solution (300 µl per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
Important note:
The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
7. Add **100 µl** Antiserum to each well
8. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
9. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells 3 times with diluted Wash Solution (300 µl per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
10. Dispense **100 µl** Enzyme Complex into each well.
11. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
12. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells 3 times with diluted Wash Solution (300 µl per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
13. Add **100 µl** of Substrate Solution to each well.
14. Incubate for **15 minutes** at room temperature.
15. Stop the enzymatic reaction by adding **50 µl** of Stop Solution to each well.
16. Read the OD at **450±10 nm** with a microtiter plate reader **within 10 minutes** after adding the Stop Solution.

6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical(Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the IFU have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 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 have to be further diluted. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Below is listed a typical example of a standard curve with the Leptin ELISA.

Standard	Optical Units (450 nm)
Standard 0 (0 ng/ml)	0.08
Standard 1 (2 ng/ml)	0.25
Standard 2 (5 ng/ml)	0.50
Standard 3 (25 ng/ml)	1.31
Standard 4 (50 ng /ml)	1.67
Standard 5 (100 ng/ml)	1.93

7 EXPECTED VALUES

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

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the DRG Leptin ELISA the following values are observed:

Population	ng/ml
Males	3.84 ± 1.79
Females	7.36 ± 3.73

8 ASSAY CHARACTERISTICS

8.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0 – 100 ng/ml.

8.2 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

8.3 Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity was calculated from the mean plus two standard deviations of twenty (20) replicate analyses of *Standard 0* and was found to be 1.0 ng/ml.

8.4 Precision

8.4.1 Intra Assay Variation

The within assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (ng/ml)	CV (%)
1	10	3.15	5.95
2	10	24.62	6.91

8.4.2 Inter Assay Variation

The between assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (ng/ml)	CV (%)
1	12	2.71	11.55
2	12	26.15	8.66

8.5 Accuracy

8.5.1 Quality Control

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 QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

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 analysing 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 LIMITATIONS OF USE

9.1 Interfering Substances

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

9.2 Drug Interferences

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

10 LEGAL ASPECTS

10.1 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.

10.2 Therapeutical Consequences

Therapeutical consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 10.1. 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 therapeutical consequences be derived.

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

10.3 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 10.2. 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 REFERENCES

1. Considine, R.V., Sinha, M.K. a.o., Serum Immunoreactive- Leptin Concentrations in Normal Weight and Obese Humans, The New England Journal of Medicine, Feb. 1996.
2. Guillaume, M., Björntorp, P., Obesity in Children, Environmental and Genetic Aspects, Horm. Metab. Res. 28, 1996, p.573-581.
3. Guillaume, M., Björntorp, P., Obesity in Children, Environmental and Genetic Aspects, Horm. Metab. Res. 28, 1996, p.573-581.

1 EINLEITUNG

Der **DRG Leptin ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von Leptin in Serum und Plasma eingesetzt.

Nur für In-vitro Diagnostik.

2 TESTPRINZIP

Der DRG Leptin 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.

Die Proben inkubieren in den beschichteten Wells. Eine zweite Inkubation mit einem spezifischen Kaninchen-Anti-Leptin Antikörper folgt. Es wird ein Sandwichkomplex gebildet. Nicht gebundenes Material wird durch Waschen entfernt. Es folgt die Inkubation mit einem Anti-Kaninchen-Peroxidase Enzymkomplex. Der nicht gebundene Enzymkomplex wird durch Waschen der Wells entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist proportional der Leptin-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Materialsicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der Stop Solution sollte vermieden werden, da sie 0.5 M H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Materialsicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma DRG Instruments GmbH erhältlich. Die Materialsicherheitsdatenblätter entsprechen den Verordnungen der EU-Richtlinie 91/155 EC.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12x8 Wells (einzeln brechbar);
Mit anti-Leptin-Antikörper (monoklonal) beschichtet.
2. **Standard (Standard 0-5)**, 6 Fläschchen, je 200 µl, gebrauchsfertig;
Konzentrationen: 0, 2, 5, 25, 50 and 100 ng/ml
Enthält 0,3% Proclin als Konservierungsstoff.
3. **Control** (Kontrolle), 2 Fläschchen, je 200 µl, gebrauchsfertig;
2 Level (low und high),
Kontrollwerte und –bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt.
Enthält 0,3% Proclin als Konservierungsstoff.
4. **Assay Buffer** (Assaypuffer), 1 Fläschchen, 11 ml, gebrauchsfertig;
Enthält 0,3% Proclin als Konservierungsstoff.
5. **Antiserum**, 1 Fläschchen, 11 ml, gebrauchsfertig;
polyclonales Leptin Antiserum
Enthält 0,3% Proclin als Konservierungsstoff
6. **Enzyme Complex** (Enzymkomplex), 1 Fläschchen, 11 ml, gebrauchsfertig;
Anti-Kaninchen-Komplex mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
Enthält 0,3% Proclin als Konservierungsstoff.
7. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 11 ml, gebrauchsfertig;
Substratlösung TMB.
8. **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 6 ml, gebrauchsfertig;
enthält 0,5M 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“.

Anmerkung: Zusätzlicher *Standard 0* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

4.1.1 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450±10 nm Filter), (z.B. das DRG Instruments Mikrotiterplattenlesegerät)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Saugfähiges Papier
- Aqua dest.

4.2 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

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

Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2-8°C gelagert werden.

Die Mikrotiterwells sollten bei 2-8°C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

4.3 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

Wash Solution

Die 40-fach konzentrierte Waschlösung (30 ml) mit 1170 ml destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 ml verdünnen.

Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 2 Wochen stabil.

4.4 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Material Sicherheitsdatenblatt, Kapitel 13.

4.5 Beschädigte Testkits

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

5 PROBENVORBEREITUNG

Serum oder Plasma kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

Lipämische, ikterische und/oder stark hämolysierte Proben sollten nicht verwendet werden.

Achtung: Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

5.1 Probenentnahme

Serum:

Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette # 02.1388.001), 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 Antikoagulans enthalten. Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

(z.B für EDTA-Plasma Sarstedt Monovette – roter Deckel - # 02.166.001;

für Heparinplasma Sarstedt Monovette – oranger Deckel - # 02.165.001;

für Zitratplasma Sarstedt Monovette – grüner Deckel - # 02.167.001.)

5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 24 Stunden bei 2-8°C gelagert werden.

Für eine längere Aufbewahrung sollten die Proben eingefroren bei -20°C 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 bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, 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 Serum + 90 µl Standard 0 gründlich mischen)

b) Verdünnung 1:100: 10 µl Verdünnung a) 1:10 + 90 µl Standard 0 (gründlich mischen).

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchgemischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.

Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.

Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Kreuzreaktionen zu vermeiden.

Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, 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. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.

Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.

6.2 Testdurchführung

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 15 µl** Standards, Controls und Proben mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells geben.
3. **100 µl** Assay Buffer in jedes Well geben.
4. Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
5. **120 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells 3mal mit verdünnter Waschlösung waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
Achtung: Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
7. **100 µl** Antiserum in jedes Well geben.
8. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
9. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells 3mal mit verdünnter Waschlösung waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
10. **100 µl** Enzyme Complex in jedes Well geben.
11. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
12. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells 3mal mit verdünnter Waschlösung waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
13. **100 µl** Substrate Solution in jedes Well geben.
14. **15 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
15. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **50 µl** Stop Solution in jedes Well abstoppen.
16. Die Optische Dichte bei **450±10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der Stopplösung bestimmen.

6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Arbeitsanleitung ermittelten Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter Gleichung (4PL, 4 Parameter Logistics, 4 Parameter Rodbard) bestimmt. Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem Leptin ELISA gezeigt:

Standard	Optische Dichte (450nm)
Standard 0 (0 ng/ml)	0,08
Standard 1 (2 ng/ml)	0,25
Standard 2 (5 ng/ml)	0,50
Standard 3 (25 ng/ml)	1,31
Standard 4 (50 ng /ml)	1,67
Standard 5 (100 ng/ml)	1,93

7 ERWARTETE WERTE

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

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

Population	ng/ml
Männer	3,84 ± 1,79
Frauen	7,36 ± 3,73

8 ASSAY CHARACTERISTIKA

8.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0 – 100 ng/ml.

8.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Folgende Substanzen wurden auf mögliche Kreuzreaktion im Leptin ELISA geprüft:

Komponente	Kreuzreaktion
Humanes Leptin	100 %
Ratten-Leptin	<0.2 %
Maus-Leptin	<0.2 %
Humanes Insulin	N.N.
Humanes Proinsulin	N.N.
Ratteninsulin	N.N.
Humanes C-Peptide	N.N.
Glucagon	N.N.
IGF-I	N.N.

N.N. : nicht nachweisbar.

8.3 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert plus der zweifachen Standardabweichung des Standards 0 (n = 20), beträgt 1,0 ng/ml.

8.4 Präzision

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

8.5 Testgenauigkeit

8.5.1 Qualitäts-Kontrolle

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 QC-Zertifikat, 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.

Es 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 ungünstig 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.

Die Daten zu:

8.5.2 Wiederfindung

8.5.3 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

9 GRENZEN DES TESTS

9.1 Interferenzen

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

9.2 Beeinflussung durch Medikamente

Uns sind bislang keine Stoffe (Medikamente) bekannt geworden, deren Einnahme die Messung des Leptin-Gehaltes der Probe beeinflussen würde.

10 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

10.1 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.

10.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 10.1. 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.

10.3 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 10.2. 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 REFERENZEN

Angaben zu den Referenzen entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

1 INTRODUZIONE

Il test immuno-enzimatico DRG Leptin contiene materiale per la determinazione quantitativa di Leptina in siero e plasma.

Questo test kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico.

2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test kit DRG Leptin 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 Leptina.

Un'aliquota di un campione di paziente contenente Leptina endogena viene incubato nel pozzetto ricoperto con un anticorpo di coniglio specifico contro la leptina. Si forma un complesso a sandwich.

Dopo l'incubazione il componente non legato è eliminato attraverso lavaggi.

Un coniugato tra la perossidasi e l'anticorpo di coniglio e' aggiunto per la determinazione della leptina legata. Dopo l'aggiunta della soluzione substrato l'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di Leptina nel campione del paziente.

3 PRECAUZIONI

- Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro.
- Informazioni su sostanze pericolose contenute nel kit sono riportate nel regolamento di sicurezza.
- Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA. Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
- Il contatto con la soluzione stop dovrebbe essere evitato perché contiene 0.5 M H₂SO₄. L'acido solforico può provocare irritazioni cutanee e ustioni.
- Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto con componenti del kit con la pelle o con le mucose.
- Nelle aree in cui il test viene utilizzato non fumare, mangiare, bere o fare uso di prodotti cosmetici.
- Nella manutenzione dei campioni o reagenti del kit portare guanti di latex monouso. La contaminazione dei reagenti o dei campioni con microbi può dare risultati falsi.
- L'utilizzo dovrebbe avvenire secondo regole che seguono le rispettive norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- Non utilizzare i reagenti dopo la scadenza indicata sul kit.
- Ogni indicazione sulla quantità indicata del protocollo del kit deve essere accuratamente seguito. Risultati ottimali possono essere ottenuti soltanto con l'uso di pipette calibrate e spettrofotometro calibrato.
- Componenti del kit con numeri di lotto diversi non devono essere combinati. È consigliabile di non utilizzare pozzetti di piastre diversi, anche se si tratta dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati magazzinati o spediti a condizioni diverse, cosicché le caratteristiche di legame potrebbero divergere leggermente.
- I componenti chimici e reagenti preparati o già utilizzati devono essere trattati e smaltiti secondo le norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- I regolamenti di sicurezza di questo prodotto possono essere richiesti direttamente dalla ditta DRG Instruments GmbH. I regolamenti di sicurezza corrispondono alle norme EU 91/155 EC.

4 COMPONENTI DEL KIT

4.1 Contenuto del kit

1. **Microtiterwells** (Micropozzetti), 12x8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti; Pozzetti ricoperti con l'anti-Leptina anticorpo (monoclinale)
2. **Standard (Standard 0-5)**, 6 flaconi, 200 µl, pronto all'uso
Concentrazioni: 0, 2, 5, 25, 50 and 100 ng/ml
Contiene 0.3% proclina come conservante.
3. **Control** (Controllo), 2 flaconi, 200 µl, pronto all'uso
2 livelli (basso e alto). I valori dei controlli sono indicati sull'etichetta dei flaconi o sulla descrizione QC.
Contiene 0.3% proclina come conservante.
4. **Assay Buffer** (tampone del test), 1 flacone, 11 ml, pronto all'uso
Contiene 0.3% proclina come conservante.
5. **Antiserum** (antisiero), 1 flacone, 11 ml, pronto all'uso
leptina antisiero, policlonale.
Contiene 0.3% proclina come conservante
6. **Enzyme Complex** (Complesso enzimatico), 1 flacone, 11 ml, pronto all'uso
Anti-coniglio complesso coniugato alla perossidasi di rafano
Contiene 0.3% proclina come conservante.
7. **Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 11 ml, pronto all'uso;
TMB (benzidine tetrametilico).
8. **Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 6 ml, pronto all'uso;
contiene 0.5M 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“.

Nota: Ulteriore *Standard 0* per la diluizione dei campioni può essere richiesto alla ditta.

4.1.1 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Uno spettrofotometro calibrato per micropozzetti (450±10 nm)(p.es. il DRG Instruments Microtiterplate Reader).
- Micropipette calibrate di precisione a volume variabile.
- Carta assorbente.
- Acqua distillata.

4.2 Magazzinaggio e stabilità del kit

A 2-8°C i reagenti non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza indicata. Non usare reagenti oltre questa data.

Tutti i reagenti aperti devono essere magazzinati a 2-8°C. I micropozzetti devono essere magazzinati a 2-8°C. Una volta aperti i pacchi, questi devono essere richiusi accuratamente.

4.3 Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente.

Wash Solution

Diluire 30 ml della soluzione di lavaggio concentrata con 1170 ml di acqua deionizzata fino ad un volume finale di 1200 ml.

La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 2 settimane a temperatura ambiente.

4.4 Smaltimento del kit

Lo smaltimento del kit deve avvenire secondo le regole a norma di legge. Informazioni particolareggiate per questo prodotto si trovano nel regolamento di sicurezza, capitolo 13.

4.5 Test kits danneggiati

Nel caso di gravi danneggiamenti del kit o dei suoi componenti deve avvenire una dichiarazione scritta alla ditta DRG, al più tardi una settimana dopo il ricevimento del kit. Componenti danneggiati non dovrebbero essere utilizzati per il test. Questi componenti devono essere magazzinati fino alla soluzione del problema. Dopo di che essi devono essere smaltiti secondo le norme ufficiali.

5 CAMPIONI

Siero o plasma può essere usato per questo test.

Non usare campioni emolitici, itterici o lipemici.

Attenzione: Se i campioni contengono sodio azide non devono essere utilizzati per questo test.

5.1 Collezione dei campioni

Siero:

Collezionare sangue tramite puntura venale (p.es. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), far coagulare e separare il siero centrifugando a temperatura ambiente.

Non centrifugare prima che la coagulazione sia completata. Campioni di pazienti con una terapia anticoagulante possono richiedere più tempo per la coagulazione.

Plasma:

Il sangue dovrebbe essere collezionato in tubetti da centrifuga contenenti un anticoagulante e centrifugando immediatamente dopo la puntura.

(P.es. per EDTA plasma Sarstedt Monovette – red cap - # 02.166.001; per eparina plasma Sarstedt Monovette – orange cap - # 02.165.001; per citrate plasma Sarstedt Monovette – green cap - # 02.167.001.)

5.2 Magazzinaggio dei campioni

I campioni dovrebbero essere magazzinati ben chiusi fino a 24 ore a 2-8°C.

Campioni magazzinati per un periodo più lungo dovrebbero essere congelati solo una volta a -20°C prima dell'analisi. Congelare soltanto una volta. Invertire campioni scongelati alcune volte prima dell'uso.

5.3 Diluizione dei campioni

Se in un campione di siero viene trovata una concentrazione oltre lo standard più alto, questo campione può essere diluito con lo Standard 0 e nuovamente determinato.

Della diluizione deve essere però tenuto conto.

Esempio:

- a) diluizione 1:10: 10 µl siero + 90 µl *Standard 0* (agitare bene)
- b) diluizione 1:100: 10 µl della diluizione a) + 90 µl *Standard 0* (agitare bene).

6 ATTUAZIONE DEL TEST

6.1 Indicazioni generali

- Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente e ben mescolati prima dell'uso. Evitare la formazione di schiume.
- Una volta iniziato il procedimento del test, questo deve essere portato alla fine senza interruzione.
- Per ogni componente, standard, controllo o campione è necessario utilizzare una nuova punta monouso per evitare reazioni incrociate.
- La densità ottica dipende dal tempo d'incubazione e dalla temperatura. Perciò si rende necessario di preparare tutti i reagenti, di aprire i tappi dei flaconi e di appostare tutti i pozzetti nelle appropriate posizioni. Soltanto una tale preparazione garantisce gli stessi tempi per ogni processo di pipettamento.
- Come regola generale vale che la reazione enzimatica si svolge linearmente proporzionale con il tempo e con la temperatura.

6.2 Esecuzione del test

1. Fissare i pozzetti necessari sul supporto.
2. Pipettare **15 µl** di ogni Standard, controllo e campione nei pozzetti, cambiando ogni volta la punta monouso.
3. Pipettare **100 µl** Assay Buffer in ogni pozzetto.
4. Agitare bene per 10 secondi. È molto importante raggiungere un completo mescolamento.
5. Incubare per **120 minuti** a temperatura ambiente (senza coptire la piastra).
6. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti 3 volte con soluzione di lavaggio diluita (300 µl in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
Importante:
La sensibilità e la precisazione di questo kit sono fortemente influenzate dal corretto esecimento del lavaggio!
7. Aggiungere **100 µl** Antiserum ad ogni pozzetto.
8. Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente.
9. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti 3 volte con soluzione di lavaggio diluita (300 µl in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
10. Pipettare **100 µl** Enzyme Complex in ogni pozzetto.
11. Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente.
12. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti 3 volte con soluzione di lavaggio diluita (300 µl in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente
13. Aggiungere **100 µl** Substrate Solution ad ogni pozzetto.
14. Incubare per **15 minuti** a temperatura ambiente.
15. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **50 µl** Stop Solution ad ogni pozzetto.
16. Determinare la densità ottica a **450 ± 10 nm** con un fotometro per microtiter-piastre **entro 10 minuti** dopo l'aggiunta della Stop Solution.

6.3 Rilevamento dei risultati

1. Determinare i valori medi della densità ottica per ogni set di standard, controlli e campioni.
2. Costruire una curva standard: riportare i valori medi della densità ottica (OD) di ogni standard contro la rispettiva concentrazione dove i valori delle OD si devono trovare sull'asse verticale (Y) e le concentrazioni sull'asse orizzontale (X).
3. Utilizzando il valore medio delle OD per ogni campione si determina la rispettiva concentrazione dalla curva standard.
4. Metodo automatico: I risultati in IFU sono stati calcolati automaticamente usando un (fitting) avvicinamento con il 4 PL (4 Parameter Logistics). Altri funzioni usati per l'elaborazioni dei dati possono dare risultati leggermente differenti.
5. La concentrazione dei campioni può essere determinata direttamente dalla curva standard. Campioni con una concentrazione più elevata dello standard più concentrato devono essere diluiti. Di questo fattore di diluizione deve essere tenuto conto per il calcolo della concentrazione.

In seguito è riportato un esempio di una curva standard con Leptin ELISA.

Standard	Densità ottiche (450 nm)
Standard 0 (0 ng/ml)	0,08
Standard 1 (2 ng/ml)	0,25
Standard 2 (5 ng/ml)	0,50
Standard 3 (25 ng/ml)	1,31
Standard 4 (50 ng /ml)	1,67
Standard 5 (100 ng/ml)	1,93

7 VALORI NORMALI

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

In uno studio condotto su persone apparentemente sane usando il test DRG Leptin ELISA i seguenti valori sono stati ottenuti:

Popolazione	ng/ml
Uomini	3.84 ± 1.79
Donne	7.36 ± 3.73

8 CARATTERISTICHE DEL TEST

8.1 Assay Dynamic Range

Le concentrazioni determinabili con questo test stanno tra 0 – 100 ng/ml.

8.2 Specificità degli anticorpi (reazioni ad incrocio)

I seguenti reagenti sono stati testati per la loro capacità di dare reazioni incrociate con questo test:

Componente	reattività ad incrocio
Leptina umana	100 %
Leptina di ratto	<0.2 %
Leptina di topo	<0.2 %
Insulina umana	N.R.
Proinsulina umana	N.R.
Insulina di ratto	N.R.
Peptide C umana	N.R.
Glucagon	N.R.
IGF-I	N.R.

N.R.: Non rilevabile

8.3 Sensitività analitica

La sensitività analitica è stata calcolata dai valori medi più due deviazioni standard di venti (20) repliche dello *Standard 0* ed erano 1,0 ng/ml.

8.4 Precisione

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

8.5 Esattezza

8.5.1 Controllo qualità

È consigliabile utilizzare i campioni controllo secondo le norme di legge. Attraverso l'utilizzo dei campioni controllo si può raggiungere una verifica dei risultati giorno per giorno. Dovrebbero essere adoperati campioni controllo sia con un livello normale sia con uno patologico.

Le referenze con i rispettivi risultati del laboratorio QC sono elencati nel QC certificato, che è allegato al kit. I valori riportati nel QC certificato si riferiscono al lotto del kit attuale e dovrebbero essere utilizzati per un raffronto dei risultati. È altresì consigliabile di partecipare a programmi di sicurezza sulla qualità nazionali o internazionali, per assicurarsi dell'esattezza dei risultati. Appropriati metodi statistici per l'analisi dei valori controllo e delle rappresentazioni grafici dovrebbero essere adoperati. Nel caso che i risultati del test non combaciano con il campo di accettazione indicato dal materiale di controllo, i risultati dei pazienti devono essere considerati invalidi. In questo caso si prega di controllare i seguenti fattori d'errore: pipette, cronometri, fotometro, data di scadenza dei reagenti, condizione di magazzinaggio e d'incubazione, metodi di aspirazione e di lavaggio.

Se dopo il controllo dei suddetti fattori non è rilevabile alcun errore, si prega di contattare il fornitore o direttamente la ditta DRG.

8.5.2 Ritrovato

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

8.5.3 Linearità

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9 LIMITAZIONE DEL TEST

9.1 Sostanze interferenti

Ogni manutenzione impropria dei campioni o modificazione del protocollo può influenzare i risultati.

9.2 Droghe interferenti

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

10 ASPETTI LEGALI

10.1 Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo il protocollo dato dal produttore. Inoltre l'utente deve seguire le regole del GLP (Good Laboratory Practice) o eventualmente altre regole comportamentali o disposizioni legali. Questo vale soprattutto per l'uso delle referenze. È molto importante utilizzare un numero appropriato di referenze in parallelo ai campioni test per poter controllare l'esattezza e la precisione del test. I risultati del test sono validi soltanto se tutte le referenze cadono nei margini prestabiliti e se tutti gli altri parametri del test soddisfano la specificazione per questo test. Se esistono dubbi o domande su questi risultati, si prega di contattare la ditta DRG.

10.2 Conseguenze terapeutiche

Soltanto sulla base dei risultati dei laboratori non dovrebbero essere intraprese delle conseguenze terapeutiche di alcun tipo, anche se i risultati del test sono d'accordo con gli aspetti articolati nel punto 10.1. Ogni risultato di laboratorio è soltanto una parte di un quadro clinico completo di un paziente. Soltanto in casi in cui i risultati di un test del laboratorio si accordano con il quadro clinico dell'ammalato, si possono intraprendere delle conseguenze terapeutiche. Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

10.3 Responsabilità legali










Ogni cambiamento del protocollo del test e/o lo scambio o il mescolamento di componenti provenienti da cariche diverse possono influenzare negativamente i risultati e compromettere la validità del test. Questi cambiamenti e/o scambi annullano ogni diritto al risarcimento.










Si respingano inoltre tutti i richiami risultanti da interpretazioni sbagliate da parte dell'utente secondo il paragrafo 10.2. Nel caso di reclamazione, la garanzia del produttore è limitato al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.

11 BIBLIOGRAFIA

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

SYMBOLS USED WITH DRG ELISA'S

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic	In-vitro-Diagnostikum	Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostica in vitro
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	No de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No.	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Distributeur	Distributeur	Distribuidor	Distributore
	User's Manual	Arbeitsanleitung	Mode d'emploi	Instrucciones de empleo	Istruzioni d'uso
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità
Microtiterwells	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Barrettes de microtitration	Pocillos de la Microplaca	Micropozzetti
Antiserum	Antiserum	Antiserum	Antisérum	Antisuero	Antisiero
Enzyme Conjugate	Enzyme Conjugate	Enzym Konjugat	Conjugué enzymatique	Conjugado enzimático	Tracciante enzimatico
Enzyme Complex	Enzyme Complex	Enzym Komplex	Complex enzymatique	Complex enzimático	Complesso enzimatico
Substrate Solution	Substrate Solution	Substrat Lösung	Solution substrat	Solución de sustrato	Soluzione di substrato
Stop Solution	Stop Solution	Stopplösung	Solution d'arrêt	Solución de paro	Soluzione d'arresto
Zero Standard	Zero Standard	Nullstandard	Standard 0	Standard 0	Standard zero
Standard	Standard	Standard	Standard	Calibrador	Standard
Control	Control	Kontrolle	Controle	Control	Controllo
Assay Buffer	Assay Buffer	Assay Puffer	Tampon d'essai	Tampón de ensayo	Tampone del test
Wash Solution	Wash Solution	Waschlösung	Solution de lavage	Solución de lavado	Soluzione di lavaggio
1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH (idrossido di sodio 1N)
Sample Diluent	Sample Diluent	Probenverdünnungsmedium			Diluyente dei campioni
Conjugate Diluent	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungsmedium			Diluyente del tracciante

Symbol	Portugues	Dansk	Svenska	Ελληνικά
	Conformidade com as normas europeias	Europaeisk overensstemmelse	Europeisk överensstämmelse	Ευρωπαϊκή Συμμόρφωση
	Diagnóstico in vitro	In vitro diagnostik	Diagnostik in vitro	in vitro διαγνωστικό
	Catálogo n.º	Katalognummer	Katalog nummer	Αριθμός καταλόγου
	No do lote	Lot nummer	Batch-nummer	Αριθμός Παρτίδος
		Indeholder tilstrækkeligt til "n" test	Innehåller tillräckligt till "n" tester	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις
	Temperatura de conservação	Opbevaringstemperatur	Förvaringstemperatur	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Prazo de validade	Udløbsdato	Bäst före datum	Ημερομηνία λήξης
	Fabricante	Producent	Tillverkare	Κατασκευαστής
Distributed by				
	Instruções de uso	Brugermanual	Användar manual	Εγχειρίδιο χρήστη
Content	Conteúdo	Indhold	Innehåll	Περιεχόμενο
Volume/No.	Volume/Número	Volumen/antal	Volym/antal	Όγκος/αριθ..
Microtiterwells	Alvéolos de microtitulação	Mikrotiterbrønde	Brunnar i Mikrotiterplatta	Πηγαδάκια Μικροπιλοδοτήσεως
Antiserum	Anti-soro	Antiserum	Antiserum	Αντιορός
Enzyme Conjugate	Conjugado enzimático	Enzymkonjugat	Enzymkonjugat	Συζευγμένο ενζυμο
Enzyme Complex	Complexo enzimático	Enzymkompleks	Enzymkomplex	Σύμπλοκο ενζύμου
Substrate Solution	Solução de substrato	Substratopløsning	Substratlösning	Διάλυμα υποστρώματος
Stop Solution	Solução de paragem	Stopopløsning	Stopp lösning	Διάλυμα τερματισμού
Zero Standard	Padrão zero	Standard 0	Standard 0	Πρότυπο Μηδέν
Standard	Calibrador	Standard	Standard	Πρότυπα
Control	Controlo	Kontrol	Kontroll	Έλεγχος
Assay Buffer	Tampão de teste	Assay buffer	Assay Buffer	Ρυθμιστικό Διάλυμα Εξέτασης
Wash Solution	Solução de lavagem	Vaskebuffer	Tvätt lösning	Διάλυμα πλύσεως
1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH
Sample Diluent				
Conjugate Diluent				