IBL International GmbH
Flughafenstraße 52 a
22335 Гамбург,
Німеччина

Тел. +49 (0) 40 53 28 91-0
Факс +49 (0) 40 53 28 91-11

IBL@tecan.com
www.tecan.com/ibl

Інструкція з використання

ІФА лептин

Імуноферментний аналіз для кількісного визначення лептину людини в сироватці та плазмі крові людини.

REF **MD53001**

Σ **96**

2°C 8°C

EU: IVD CE

Уповноважений представник: ТОВ«АЙ ВІ СЕТ», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1,тел. (044) 223-83-18, info@ivset.com.ua www.ivset.ua

IBL International GmbH
Flughafenstrasse 52a
22335 Гамбург, Німеччина

ЗМІСТ

1 ПЕРЕДБАЧУВАНЕ ВИКОРИСТАННЯ 3

2 ВСТУП 3

3 ПРИНЦИП АНАЛІЗУ 4

4 ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ 4

4.1 ЗАГАЛЬНІ ПРОЦЕДУРИ НАДАННЯ ПЕРШОЇ ДОПОМОГИ: 4

5 ЗРАЗКИ 5

5.1 ТИП ЗРАЗКІВ..... 5
5.2 ЗБІР ЗРАЗКІВ……..... 5
5.3 СТАБІЛЬНІСТЬ ЗРАЗКІВ..... 5
5.4 ВПЛИВ……..... 5
5.5 ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ..... 5

6 МАТЕРІАЛИ 5

6.1 МАТЕРІАЛИ НАДАНІ..... 5
6,2 ПОТРІБНІ МАТЕРІАЛИ,АЛЕ НЕ НАДАНІ..... 6

7 ТЕХНІЧНІ ПРИМІТКИ..... 6

8 ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ 7

9 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ 8

9.1 КРИТЕРІЇ ЯКОСТІ..... 8

10 ОЦІНКА РЕЗУЛЬТАТІВ 8

10.1 ВСТАНОВЛЕННЯ СТАНДАРТНОЇ КРИВОЇ..... 8
10.2 ПРИКЛАД ТИПОВОЇ СТАНДАРТНОЇ КРИВОЇ..... 8
10.3 ЗРАЗОК РОЗРАХУНКУ КОНЦЕНТРАЦІЇ ЛЕПТИНУ..... 9
10.4 ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ..... 9
10.5 ЛІМІТАЦІЯ ПРОЦЕДУРИ..... 9

11 РЕФЕРЕНТНІ ЗНАЧЕННЯ 9

12 ЕКСПЛУАТАЦІЙНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ 15

12.1 ЧУТЛИВІСТЬ..... 15
12.2 ТОЧНІСТЬ..... 15
12.3 ЛІНІЙНІСТЬ..... 15
12.4 ВІДНОВЛЕННЯ..... 16
12.5 ВПЛИВ..... 16

13 ПОРІВНЯЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ 16

14 НАУКОВЕ ЗАСТОСУВАННЯ 17

14.1 ДЛЯ НАУКОВОГО ЗАСТОСУВАННЯ ПІДХОДИТЬ ДЛЯ НАУКОВИХ МАТЕРІАЛІВ 17
14.2 КРОСС-РЕАКТИВНІСТ ЗРАЗКІВ..... 17

15 ЛІТЕРАТУРА / ПОСИЛАННЯ 18

ІФА лептин	**96 Визначення**
Принцип тесту	Імуноферментний аналіз
Тривалість (інкубаційний період)	1.75 год
Антитіла	моноклональні антитіла
Буфер	Готовий до використання 20-кратний концентрат
Стандартний	5 окремих стандартів: 1–100 мкг/л, рекомбінантний людський лептин
Довідковий матеріал	Міжнародний стандарт WHO/NIBSC 97/594, рекомбінантний лептин
Діапазон аналізу	0,25 – 100 мкг/л
КОНТРОЛЬ	2 контролі, сублімовані
Зразок	сироватка / плазма людини
Необхідний обсяг проби	20 мкл або 40 мкл для одноразового або повторного вимірювання
Розведення зразка	нерозбавлений
Аналітична чутливість	Ø ≤ 0,25 мкг/л
Внутрішньо/міжаналізова дисперсія	Ø <15%
Еталонні значення	Blum WF, Juul A; Референтні діапазони сироваткового лептину, У: Лептин - голос жирової тканини, Blum WF et al. ред. Йоганн Ambrosius Verlag, Гейдельберг, 1997

1 ПЕРЕДБАЧУВАНЕ ВИКОРИСТАННЯ

Імуноферментний аналіз для кількісного визначення лептину людини в сироватці та плазмі крові людини.

2 ВСТУП

Лептин, продукт гена ob (1,2), є одноланцюговим протеогормоном з молекулярною масою 16 кД, який, як вважають, відіграє ключову роль у регуляції маси тіла. Його амінокислотна послідовність не демонструє серйозної гомології з іншими білками (1). Лептин виробляється майже виключно диференційованими адипоцитами (3-5). Він діє на центральну нервову систему, зокрема на гіпоталамус, тим самим пригнічуючи споживання їжі та стимулюючи витрати енергії (2, 6-9). Рецептори лептину - існують альтернативно сплайсовані форми, які відрізняються за довжиною - належать до сімейства рецепторів цитокінів класу I (10-12). Вони повсюдно зустрічаються в організмі (10, 11, 13, 14), що вказує на загальну роль лептину. Існує циркулююча форма рецептора лептину, яка діє як один із кількох білків, що зв'язують лептин (15). Окрім його метаболічних ефектів, було показано, що лептин має сильний вплив на ряд ендокринних осей. У самців мишей це притупило спричинене голодуванням помітне зниження ЛГ, тестостерону, тироксину та підвищення АКТГ і кортикостерону. У самок мишей лептин запобігав затримці овуляції, спричиненій голодуванням (16). Миші Ob/ob, які мають дефіцит лептину через мутацію гена ob, є безплідними. Цей дефект можна виправити введенням лептину, але не втратою ваги через голодування (17), що свідчить про те, що лептин є ключовим для репродуктивних функцій.

Усі ці дії можна, принаймні частково, пояснити пригнічуючим ефектом лептину на експресію та секрецію нейропептиду Y (NPY) нейронами аркуатного ядра (6, 18, 19). NPY є сильним стимулятором апетиту (20, 21) і, як відомо, бере участь у регуляції різних гормонів гіпофіза, наприклад, пригнічення GH шляхом стимуляції соматостатину (22, 23), пригнічення гонадотропінів (23) або стимуляції гіпофізарно-надниркова вісь (21).

Найважливішою змінною, яка визначає рівень циркулюючого лептину, є маса жиру в організмі (24-26). Очевидно, що за умов регулярних циклів харчування лептин відображає частку жирової тканини (27), показуючи експоненціальний зв'язок (37). Цей конститутивний синтез лептину модулюється низкою негормональних і гормональних змінних. Стимуляторами як у гризунів, так і у людини є перегодовування (28, 29), інсулін (3, 5, 30-33) і глюкокортикоїди (5, 34-36). Пригнічення було показано для голодування (27), цАМФ і агоністів бета-3-адренорецепторів (35). З цих знахідок стає зрозуміло, що лептин є невід'ємним компонентом різноманітних метаболічних та ендокринних циклів зворотного зв'язку (38).

Для клінічних цілей важливо відзначити, що рівні лептину в сироватці демонструють помірні циркадні коливання з піком вночі приблизно о 2 годині ночі (37). Значення лептину в цей час приблизно на 30-100% вищі, ніж рівні, виміряні вранці або рано вдень. Цю варіацію разом із впливом споживання їжі необхідно брати до уваги під час збору зразків крові. За досить стандартизованих умов, тобто нормальних циклів прийому їжі та забору крові вранці або рано вдень, одноразове вимірювання лептину є інформативним.

Для відповідної інтерпретації виміряних рівнів лептину необхідні контрольні діапазони. Оскільки маса жиру в організмі є основною змінною, що змінює, ці діапазони слід віднести до показників відсотка жиру в організмі, таких як індекс маси тіла (ІМТ) або відсоток жиру в організмі, визначений, наприклад, за допомогою оцінки біоелектричного опору (BIA). Рівні лептину вищі у жінок, ніж у чоловіків (38, 39), а вікова залежність виявлена у дітей та підлітків (40). Таким чином, контрольні діапазони, що стосуються показників жиру в організмі, повинні бути стратифіковані відповідно до статі та пубертатного розвитку.

Рівні лептину високі у більшості пацієнтів із ожирінням, що свідчить про наявність нечутливості до лептину (20, 26, 37, 38, 41, 42). Однак у невеликого відсотка пацієнтів рівень лептину був виявлений невідповідно низьким відносно їх жирової маси. Залишається для майбутніх досліджень, щоб довести, що ці пацієнти представляють нову патофізіологічну сутність: дефіцит лептину. Оскільки було показано, що лептин має велике значення для репродуктивних функцій, можуть бути виявлені нові патофізіологічні механізми, що пов'язують безпліддя з недостатнім виробництвом лептину.

Відкриття лептину викликало лавину досліджень, спрямованих на розуміння регуляції та дії цього гормону. Найважливіше те, що він дав ключ до кращого розуміння фізіології регуляції маси тіла та розкриття можливих патофізіологічних механізмів як при ожирінні, так і при розладах харчування. Крім того, це може дати нове розуміння певних причин безпліддя.

Цей набір для імуноферментного аналізу підходить для вимірювання людського лептину в сироватці або плазмі, а також у кондиціонованих культуральних середовищах адипоцитів для наукових і діагностичних цілей.

Вимірювання лептину у пацієнтів з анорексією або кахексією, маленьких дітей або в зразках, відмінних від сироватки, таких як сеча, спинномозкова рідина та певні середовища клітинної культури, також можливе за допомогою цього набору.

Порівняння з референсними діапазонами, пов'язаними з ІМТ, може бути корисним для виявлення станів відносного дефіциту лептину як можливої причини ожиріння або, відповідно, вказати на стійкість до лептину.

3 ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

ІФА лептин є так званим сендвіч-аналізом із використанням двох специфічних і високоафінних антитіл. Лептин у зразках зв'язується з першим антитілом, нанесеним на мікропланшет. На наступному етапі друге специфічне антитіло до лептину, у свою чергу, зв'язується з іммобілізованим лептином. Друге антитіло є біотинільованим і застосовуватиметься в суміші з кон'югатом стрептавідин-пероксидаза-фермент. У подальшій реакції субстрату зміна кольору буде кількісно каталізована залежно від рівня лептину в зразках.

4 ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Тільки для діагностики in vitro. Тільки для професійного використання.

ІФА лептин підходить лише для діагностики in vitro, а не для внутрішнього застосування у людей і тварин. Суворо дотримуйтесь протоколу тестування. Використовуйте дійсну версію вкладиша, що надається в комплекті. Будьте впевнені, що все зрозуміли. IBL International не несе відповідальності за будь-які збитки або пошкодження (за винятком випадків, передбачених законом), якими б причинами вони не були викликані внаслідок недотримання наданих інструкцій. Паспорт безпеки матеріалу надається за запитом.

Не використовуйте явно пошкоджений або мікробно забруднений або пролитий матеріал.

Увага: цей набір містить матеріал людського та/або тваринного походження. Тому всі компоненти та зразки пацієнта слід розглядати як потенційно інфекційні.

Не використовуйте явно пошкоджений або мікробно забруднений або пролитий матеріал.При зберіганні, поводженні та утилізації реагентів набору необхідно дотримуватися відповідних запобіжних заходів і належної лабораторної практики. Утилізація компонентів набору повинна здійснюватися відповідно до місцевих норм.

Людська сироватка

Наступні компоненти містять людську сироватку: CONTROL, CAL

Вихідна людська сироватка для контролів, наданих у цьому наборі, була перевірена та виявила нереактивність щодо поверхневого антигену гепатиту B (HBsAg), вірусу гепатиту C (HCV) і вірусу імунодефіциту людини 1 і 2 (ВІЛ). Жодні відомі методи не можуть забезпечити повну безпеку відсутності інфекційних агентів; тому всі компоненти та зразки пацієнта слід розглядати як потенційно інфекційні.

Реагенти CAL, ANTIBODY, DILBUF, WASHBUF

Містить як консервант суміш 5-хлор-2-метил-4-ізотіазолін-3-ону та 2-метил-4-ізотіазолін-3-ону (<0,015%)

H317	Може викликати шкірну алергічну реакцію.
P280	Одягайте захисні рукавички/ захисний одяг/ засоби захисту очей/ обличчя.
P272	Забруднений робочий одяг не можна виносити з робочого місця.
P261	Уникайте вдихання пилу/ диму/ газу/ туману/ парів/ спрею.
P333+P313	У разі подразнення шкіри або висипу: Зверніться за медичною допомогою/порадою.
P302+P352	У РАЗІ ПОТРАПЛЯННЯ НА ШКІРУ: промити великою кількістю води з милом.
P501	Утилізуйте вміст/контейнер відповідно до місцевих/регіональних/національних/міжнародних правил.

ТМБ-субстратТМБ СУБС

ТМБ-Субстрат (S) містить 3,3´,5,5´ тетраметилбенцидин (<0,05%)

H315	Викликає подразнення шкіри.
H319	Викликає серйозне подразнення очей.
H335	Може викликати подразнення дихальних шляхів.
P261	Уникайте вдихання пилу/ диму/ газу/ туману/ парів/ спрею.
P305+P351+ P338	ПРИ ПОПАДАННІ В ОЧІ: Обережно промийте водою протягом кількох хвилин. Зніміть контактні лінзи, якщо вони є і це легко зробити. Продовжуйте полоскання.

Стоп розчин ТМБ STOP

Стоп-розчин містить 0,2 M кислоту сірчану кислоту (H2TAK4)

H290	Може викликати корозію металів.
H314	Викликає серйозні опіки шкіри та пошкодження очей.
P280	Одягайте захисні рукавички/ захисний одяг/ засоби захисту очей/ обличчя.
P301+P330+ P331	ПРИ КОВТУВАННІ: прополоскати рот. НЕ викликайте блювоту.
P305+P351+ P338	ПРИ ПОПАДАННІ В ОЧІ: Обережно промийте водою протягом кількох хвилин. Зніміть контактні лінзи, якщо вони є і це легко зробити. Продовжуйте полоскання.
P309+P310	У РАЗІ контакту або поганого самопочуття: Негайно зателефонуйте в ТОКСИКОЛОГІЧНИЙ ЦЕНТР або до лікаря.

4.1 Загальні правила надання першої допомоги:

Контакт зі шкірою: промити уражену ділянку, негайно промити великою кількістю води не менше 15 хвилин. Зняти забруднений одяг і взуття.

Попадання в очі: У разі потрапляння в очі негайно промити великою кількістю води не менше 15 хвилин. Для забезпечення ефективного промивання розведіть повіки.

Проковтування: після проковтування продукту, якщо постраждала людина при свідомості, рясно прополощіть рот водою: негайно зверніться до лікаря.

5 ЗРАЗКИ

5.1 Тип зразка Сироватка і плазма

Окрім сироватки також можна використовувати зразки плазми ЕДТА та гепарину, оскільки в п’яти відповідних зразках сироватки/плазми не було виявлено різниці між концентраціями лептину >20%. Цитратну плазму також досліджували у двох зразках. Виміряна концентрація лептину становила 93 і 81% від концентрації в сироватці крові. Таким чином, жоден із протестованих антикоагулянтів не заважав вимірюванню лептину.

5.2 Колекція зразків

Зразок крові для приготування сироватки повинен бути отриманий відповідно до стандартизованої процедури венепункції.Слід уникати гемолітичних реакцій.Рівні лептину демонструють циркадні коливання з піком вночі приблизно о 2 годині ночі (37). Цю варіацію разом із впливом споживання їжі необхідно брати до уваги під час збору зразків крові. **Необхідний обсяг зразка:**20 мкл для одноразового / 40 мкл для повторного вимірювання

5.3 Стабільність зразка У флаконах зі зразками, що щільно закриваються

- Зберігання при 20-25°C: 2 доби
- Зберігання при -20°C: хв. 2 роки
- Цикли заморожування-відтавання макс. 5

Зберігання зразків протягом 2 років при -20°C не показало впливу на показання. Заморожування та розморожування зразків слід звести до мінімуму, 5 Заморожування-розморожування не виявило впливу на зразки.

5.4 Вплив

Гемоглобін, тригліцериди та білірубін у зразку не впливають на концентрацію
1 мг/мл, 100 мг/мл і 100 мкг/мл. Проте використання гемолітичних, ліпемічних або жовтяничних зразків має підтверджуватися користувачем.

5.5 Розведення зразка

- Спеціальна обробка зразків не потрібна. Зразки можна використовувати нерозведеними (20 мкл).

6.МАТЕРІАЛИ

6.1 Надані матеріали

Перерахованих нижче реагентів достатньо для 96 лунок, включаючи стандартну криву.

MTP	**Мікропланшет,**готовий до використання, покритий мишачим антитілом до лептину. Лунки відокремлюються.	**(8x12) лунок**
CAL AE **LYO**	**Стандарти** ліофілізований (рекомбінантний лептин людини), концентрації вказані на етикетках флаконів і в сертифікаті якості в нг/мл.	**5 x 750 мкл**
КОНТРОЛЬ 1 **LYO**	**Контроль 1,**ліофілізована (сироватка крові людини), концентрація вказана в сертифікаті якості в нг/мл.	**1 x 500 мкл**
КОНТРОЛЬ 2 **LYO**	**Контроль 2,**ліофілізована (сироватка крові людини), концентрація вказана в сертифікаті якості в нг/мл.	**1 x 500 мкл**
АНТИТІЛА	**Антитіло-HRP-кон'югат,**готовий до використання, мишачі анти-hLeptin-антитіла біотинільовані + стрептавідин хрін кон'югат пероксидази	**1 x 14 мл**
DILBUF	**Буфер для розведення,**готовий до використання	**1 x 25 мл**
WASHBUF **CONC**	**Промивний буфер,**20-кратно концентрований розчин	**1 x 50 мл**
TMB SUBS	**Субстрат,**готовий до використання субстрат пероксидази хрону (HRP), стабілізований тетраметилбензидин.	**1 x 14 мл**
TMB STOP	**Стоп розчин,**готовий до використання, 0,2 М сірчаної кислоти.	**1 x 14 мл**
	Ущільнювальна стрічка, для покриття мікропланшета .	**2 x**

6.2 Матеріали необхідні, але не надаються

- Дистильована або дейонізована вода для розведення промивного буфера, 950 мл.
- Прецизійні та багатоканальні піпетки з одноразовими пластиковими наконечниками
- Вихровий змішувач
- Шейкер для мікропланшетів (350 об/хв)
- Пристрій для миття мікропланшетів (рекомендовано)
- Зчитувач мікропланшетів ("ІФА-рідер") з фільтром для 450 і ≥590 нм

7 ТЕХНІЧНІ ПРИМІТКИ

Умови зберігання

Зберігайте набір при температурі 2-8°C після отримання до закінчення терміну придатності. Після розчинення ліофілізовані реагенти слід зберігати при –20 °C. Уникайте повторного розморожування та заморожування.

Термін зберігання

Гарантований термін придатності компонентів після першого відкриття становить 4 тижні. Зберігайте невикористані стріпи та лунки для мікротитрування герметично разом із осушувачем при 2–8°C у пакеті з замком, використовуйте в рамці, що входить до набору.

Відновлені компоненти (стандарти та контролі) необхідно зберігати при –20°C (макс. 4 тижні). Для подальшого використання розморозьте швидко, але обережно (уникайте підвищення температури вище кімнатної та уникайте надмірного перемішування). До 3 циклів заморожування-відтавання не вплинули на аналіз.

Промивний буфер, розведений у співвідношенні 1:20,

стабільний протягом 4 тижнів при 2-8°C.

Підготовка реагентів

Перед використанням доведіть усі реагенти до кімнатної температури (20–25°C). Перед використанням необхідно усунути можливі осади в буферах шляхом змішування та/або нагрівання. Реагенти з різними номерами партій не можна змішувати.

Відтворення

Стандарти A – E і контролі 1 і 2 відновлюються за допомогою буфера для розведення. Рекомендується витримати відновлені реагенти при кімнатній температурі протягом 15 хвилин, а потім ретельно, але обережно перемішати їх (без утворення піни) вихровим міксером.

Розведення

Необхідний об’єм промивного буфера готується шляхом розведення 1:20 20-кратного концентрату з Aqua dest.

Процедура аналізу

Під час проведення аналізу бланк, стандарти A-E, контролі 1, 2 і зразки слід піпетувати якомога швидше (наприклад, <15 хвилин). Щоб уникнути спотворень через різницю в часі інкубації, кон’югат антитіл, а також наступний розчин субстрату слід додавати на планшет у тому самому порядку та з тим самим інтервалом часу, що й зразки. Стоп розчин слід додавати на планшет у тому ж порядку, що й розчин субстрату.

Усі визначення (бланк, стандарти AE, контролі 1, 2 і зразки) слід аналізувати в двох примірниках. Для отримання оптимальних результатів рекомендується акуратне дозування та дотримання протоколу.

Інкубація

Інкубація при кімнатній температурі означає: Інкубація при 20 - 25°C.Розчин субстрату, стабілізований тетраметилбензидин, є фоточутливим – зберігання та інкубація в темряві.

струшування

Етапи інкубації слід виконувати на середній частоті обертання особливо придатного шейкера для мікропланшетів. Ми рекомендуємо від 200 до максимум 350 об/хв. Через певні технічні відмінності можуть виникнути відхилення, якщо необхідно відрегулювати частоту обертання. Недостатнє струшування може призвести до неадекватного змішування розчинів і, отже, до низької оптичної густини, великих варіацій та/або помилкових значень, надмірне струшування може призвести до високої оптичної густини та/або помилкових значень.

промивання

Належне миття має основне значення для безпечного, надійного та точного виконання тесту. Неповне промивання є поширеним явищем і негативно вплине на результат тесту. Можливими наслідками можуть бути неконтрольовані неспецифічні зміни виміряної оптичної густини, що потенційно може призвести до помилкових результатів розрахунків досліджуваних зразків. Такі ефекти, як високі фонові значення або великі коливання, можуть вказувати на проблеми з пранням.

Будь-яке промивання має виконуватися наданим промивним буфером, розведеним до концентрації використання. Об’єм промивної рідини на цикл промивки та лунку має становити щонайменше 300 мкл.

Необхідно враховувати небезпеку роботи з потенційно інфекційним матеріалом.

Використовуючи автоматичну мийну машину для мікропланшетів, необхідно ретельно дотримуватися відповідних інструкцій щодо використання.

Необхідно виконати налаштування пристрою, наприклад, для геометрії планшета та наданих параметрів миття.

Дозуючий і аспіраційний колектори не повинні подряпати внутрішню поверхню лунки. Потрібно вжити заходів, щоб об'єм рідини, що залишився, на кожному етапі аспірації був мінімізований. Після останнього етапу аспірації кожного циклу прання це можна було контролювати, а можливу рідину, що залишилася, можна було видалити, перевернувши пластину та кілька разів постукуючи нею насухо по нерозмитій вбираючій тканині.

Ручне промивання є адекватним альтернативним варіантом. Промивний буфер можна дозувати за допомогою багатошагового пристрою, багатоканальної піпетки або пляшки для спринцювання. Рідину можна видалити шляхом динамічного розгойдування мікропланшета над чашею. Якщо використовуються аспіраційні пристрої, необхідно стежити, щоб внутрішня поверхня лунки не подряпала. Після кожного окремого етапу миття залишки рідини слід видалити, перевернувши планшет та кілька разів постукавши нею насухо по вбираючій серветці, яка не розпливається.

8 ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Приготування реактивів		**Відновлення:**	**Розведення**
CAL	**Стандарти A-E**	в 750 мкл буфера для розведення	-
КОНТРОЛЬ	**Контролі 1 і 2**	в 500 мкл буфера для розведення	-
WASHBUF	**Промивний буфер**	-	**1:20** з водою дист

Розведення зразка загалом не є необхідним, використовуйте 20 мкл нерозведеного на визначення.

Перед початком аналізу довести всі реагенти до кімнатної температури 20-25°C.

Процедура аналізу при подвійному визначенні:

Піпетувати	**Реагенти**	**Позиція**
100 мкл	Буфер для розведення	**Прокапайте в усі необхідні лунки**
20 мкл	Буфер для розведення (бланк)	A1/A2
20 мкл	Стандарт A (1 нг/мл)	B1/B2
20 мкл	Стандарт B (10 нг/мл)	C1/C2
20 мкл	Стандарт C (25 нг/мл)	D1/D2
20 мкл	Стандарт D (50 нг/мл)	E1/E2
20 мкл	Стандарт E (100 нг/мл)	F1/F2
20 мкл	Контроль 1 (нерозведений)	G1/G2
20 мкл	Контроль 2 (нерозведений)	H1/H2
20 мкл	Зразок (нерозведений)	в решті лунок відповідно до вимог

Закрийте лунки герметичною стрічкою.

Інкубація зразка: 1 год при 20-25°C, 200-350 об./хв.		
5 x 300 мкл	Аспіруйте вміст лунок і промийте 5 разів 300 мкл розведеного промивного буфера кожна/лунка	У кожній лунці
100 мкл	Антитіло-POD-кон'югат	У кожній лунці

Закрийте лунки герметичною стрічкою.

Інкубація: 30 хвилин при 20-25°C, 200-350 об./хв.		
5 x 300 мкл	Аспіруйте вміст лунок і промийте 5 разів 300 мкл розведеного промивного буфера кожна/лунка	У кожній лунці
100 мкл	Розчин субстрату	У кожній лунці
Інкубація: 15 хвилин у темряві при 20-25°C		
100 мкл	Стоп Розчин	У кожній лунці

Виміряйте поглинання протягом 30 хвилин при 450 нм з ≥ 590 нм як еталонну довжину хвилі.

9 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Належна лабораторна практика вимагає, щоб контролі були включені в кожен аналіз. Необхідно проаналізувати статистично значущу кількість контролів, щоб встановити середні значення та прийнятні діапазони для забезпечення належної продуктивності. Результати тесту дійсні, лише якщо тест було виконано відповідно до інструкцій. Крім того, користувач повинен суворо дотримуватися правил GLP (належної лабораторної практики) або інших відповідних федеральних, державних або місцевих стандартів/законів. Усі стандарти та контролі набору повинні знаходитися в допустимих діапазонах, як зазначено в сертифікаті контролю якості. Якщо критерії не відповідають, прогін недійсний і його слід повторити. Кожна лабораторія повинна використовувати відомі зразки як подальший контроль.

9.1 Критерії якості

Для оцінки аналізу необхідно, щоб значення поглинання холостого зразка були нижче 0,25, а поглинання стандарту E повинна бути вище 1,00.
Зразки, які дають вищі значення поглинання, ніж стандарт E, повинні бути повторно перевірені з розведенням.

10 ОЦІНКА РЕЗУЛЬТАТІВ

10.1 Встановлення стандартної кривої

Стандартн	A	Б	C	Д	E
нг/мл	1	10	25	50	100

1) Обчисліть середнє значення поглинання для холостого зразка з повторного визначення (лунка A1/A2).

2) Відніміть середнє значення поглинання холостого зразка із середнього значення поглинання всіх інших зразків і стандартів

3) Помістіть стандартні концентрації на осі абсцис проти середнього значення поглинання стандартів на осі y.

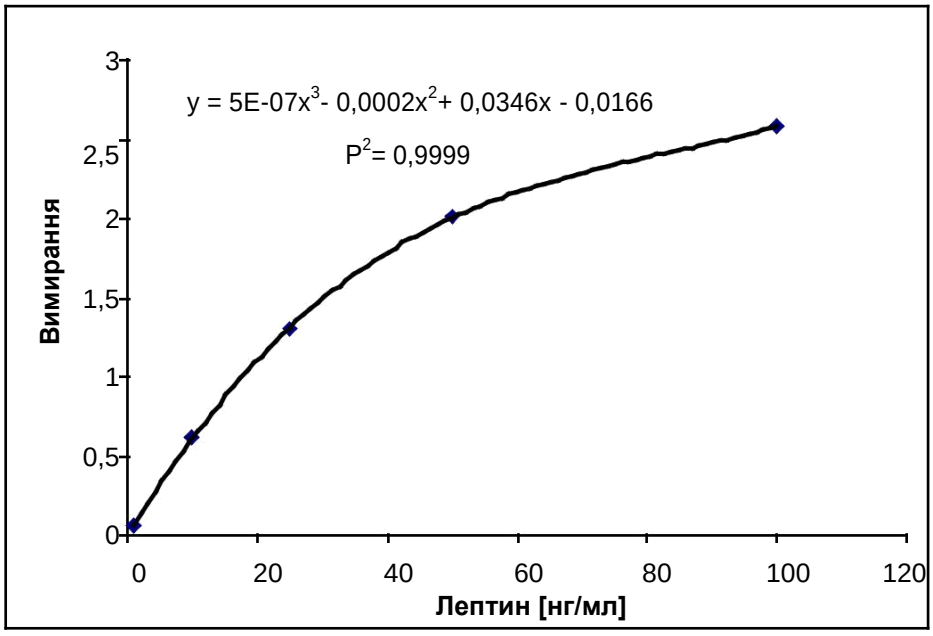
4) Рекомендація: Розрахунок стандартної кривої слід виконувати за допомогою комп'ютерної програми, оскільки крива загалом (без відповідного перетворення) не ідеально описується лінійною регресією. Для оцінки зазвичай підходить поліном вищого класу або чотирипараметрична логістична (4-PL) крива або нелінійна регресія (як це може бути сплайн або вирівнювання від точки до точки в окремих випадках).

5) Концентрація лептину в нг/мл у зразках і контролях розраховується автоматично вашою програмою.

10.2 Приклад типової стандартної кривої

Наступні дані лише для демонстрації та не можуть використовуватися замість генерації даних під час аналізу.

	Пустий	A	Б	C	Д	E
нг/мл	0,0	1	10	25	50	100
ОГ**(450-620 нм)**	0,04	0,083	0,680	1,449	2,165	2,764



Фігура 1Приклад стандартної кривої

Приклад стандартної кривої, показаної на малюнку 1, не може бути використаний для розрахунку результатів ваших тестів. Ви повинні встановити стандартну криву для кожного тесту, який ви проводите!

10.3 Приклад розрахунок концентрації лептину

Виміряна екстинкція вашого зразка	0,39
Виміряна екстинкція бланка	0,04

Ваша програма вимірювання автоматично розрахує концентрацію лептину в розведеному зразку, використовуючи для розрахунку різницю між зразком і холостим зразком. Вам потрібно лише визначити найбільш підходящу криву (тут: поліном 3rdступінь).
У цьому прикладі наступне рівняння розв'язується програмою для розрахунку концентрації лептину в зразку:

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

7,012 = x оскільки зразок нерозведений, концентрація лептину в зразку становить 7,012 нг/мл

10.4 Інтерпретація результатів

Результати тесту не повинні бути єдиною основою для прийняття терапевтичних рішень. Результати слід інтерпретувати з огляду на анамнез, подальші клінічні спостереження та результати інших діагностичних досліджень. Крім того, для кожної лабораторії рекомендується встановити контрольні та порогові значення, що відповідають відповідній групі пацієнтів.

10.5 Обмеження процедури

ПОГЛИНАННЯ на лептин базується на моноклональних антитілах. Як правило, цей метод може бути чутливим до гетерофільних антитіл або ревматичних факторів у зразку. Їхній вплив зменшується дизайном аналізу, але не може бути повністю виключений.

11 РЕФЕРЕНТНІ ЗНАЧЕННЯ

Рівні лептину в сироватці в основному визначаються масою жиру в організмі з низьким рівнем у худорлявих людей і високим у осіб із ожирінням. Крім того, існує чітка гендерна різниця з вищими рівнями у жінок при певному відсотку жиру в організмі. Крім того, на рівень лептину впливає пубертатний розвиток. Таким чином, будь-яка спроба дати діапазони очікуваних рівнів лептину повинна враховувати ці відносини.
Доступні різні методи оцінки жиру в організмі, такі як розрахунок індексу маси тіла (вага (кг), поділена на квадрат росту (м)) (ІМТ), оцінка біоелектричного опору (BIA) або рентгенівське дослідження загального тіла з подвійною енергією. абсорбціометрія (DXA). Хоча точність ІМТ щодо відображення справжньої жирової маси поступається іншим більш складним методам, таким як BIA або DXA, ІМТ забезпечує ряд переваг:

1) Це не залежить від застосованих моделей регресії.
2) Визначити його легко, потрібні тільки вимірювання ваги і зросту.
3) Ретроспективно в основному доступний.
4) Це найточніший показник під час короткочасних змін жирової маси, наприклад, під час голодування.

Таким чином, наступні очікувані діапазони рівнів лептину в сироватці крові були віднесені до ІМТ як до основної незалежної змінної, що змішує, і були стратифіковані відповідно до статі та пубертатного розвитку (45; див. малюнки 2-9 і таблиці 1-9). Після 20 років істотної вікової залежності не спостерігалося. Ці скориговані за статтю та віком діапазони очікувань можна використовувати для порівняння виміряного рівня лептину при даному ІМТ із нормальними суб'єктами для виявлення патологічних відхилень. Лінії регресії, які найкраще підходять для різних підгруп, є експоненціальними кривими форми:

$Лептин = a \cdot д^{(б \cdot ІМТ)}$

5-й і 95-й процентиль задано такими рівняннями:

$Лептин = a \cdot д^{(б \cdot ІМТ - c)}$ і $Лептин = a \cdot д^{(b \cdot ІМТ + c)}$ відповідно.

На напівлогарифмічному графіку (вісь y = логарифм лептину) ці криві дають прямі лінії. Значення для a, b і c наведено в таблиці 1 відповідно до статі та стадії статевого дозрівання, а також для дорослих. Використовуючи ці значення, очікувані діапазони рівнів лептину можна легко розширити до нижчих або вищих діапазонів ІМТ, якщо потрібно.

приклад:
50-й процентиль для хлопчиків на стадіях 3 і 4 за Таннером визначається такою кривою:
$Лептин = 0{,}0181 \cdot e^{(0{,}2067 \cdot IMT)}$
5-й процентиль визначається як: $Лептин = 0{,}0181\ e^{(0{,}2067 \cdot IMT - 1{,}1919)}$
і 95-й процентиль визначається як: $Лептин = 0{,}0181\ e^{(0{,}2067 \cdot IMT + 1{,}1919)}$

У напівлогарифмічному графіку ці лінії паралельні з однаковою відстанню до 50-го процентиля.

Розрахунок балів стандартного відхилення (SDS; Z-балів)

Зручним методом виявлення будь-якого відхилення виміряного рівня лептину від відповідного референсного діапазону є обчислення його стандартного відхилення шляхом співвіднесення рівня лептину в ІМТ пацієнта із середнім значенням лептину відповідної статі та вікової групи та виразу його відхилення через x-кратне стандартне відхилення. Цей метод можна розглядати як нормалізацію до нормальної контрольної когорти. Таким чином, значення лептину можна скоригувати відповідно до ІМТ, статі та стадії статевого дозрівання/віку (тобто вплив статі, віку та ІМТ усувається) і можна об'єднати для подальшого аналізу.

Враховуючи логарифмічний розподіл рівнів лептину, SDS лептину можна розрахувати за таким рівнянням:

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

У цьому рівнянні ln представляє натуральний логарифм (посилається на основу e). Константи a, b і d наведені в таблиці 1 відповідно до статі та пубертатного періоду/віку.

приклад:
Хлопчик 3 стадії по Таннеру, ІМТ = 25 кг/м^2, виміряна концентрація лептину = 5 нг/мл. лептин
SDS = (ln(5) - ln (0,0181) - 0,2067·25) / 0,6850 =
(1,6094 - (-4,0118) - 5,1675) / 0,6850 = 0,66

Таблиця 1 Константи a, b, c і d для розрахунку референтних діапазонів лептину та SDS лептину на основі ІМТ. Групи нормальних здорових людей були стратифіковані за статтю та стадією статевого дозрівання/віком. TS = стадія Таннера, n = кількість суб'єктів, a, b, c і d = константи, як визначено в тексті (див. розділ РЕФЕРЕНТНІ ЗНАЧЕННЯ).

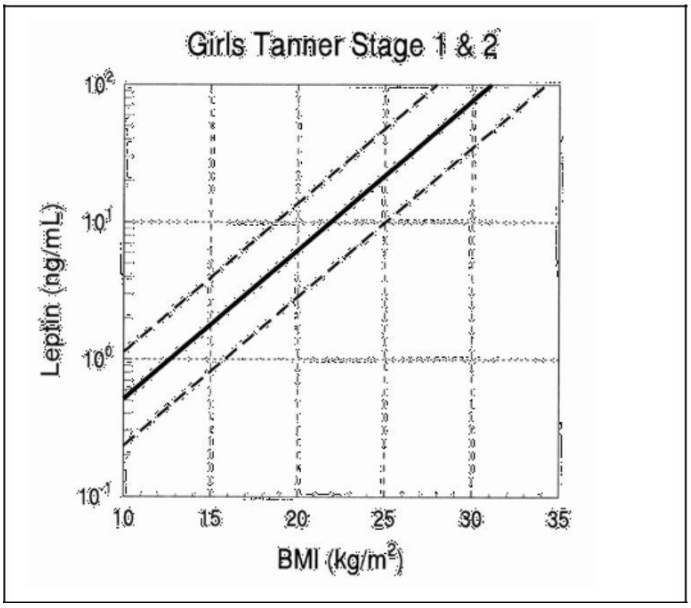
Когорта	п	a	b	в	d
Чоловіки:					
TS 1 і 2	136	0,0146	0,2706	0,8821	0,5379
TS 3 і 4	50	0,0181	0,2067	1.1919	0,6850
TS 5	112	0,0316	0,1462	1,0821	0,6558
дорослі	380	0,0130	0,2200	1,1053	0,6740
Жінки:					
TS 1 і 2	136	0,0422	0,2499	0,7849	0,4786
TS 3 і 4	43	0,0543	0,2357	0,5745	0,3379
TS 5	157	0,2550	0,1508	0,7053	0,4301
дорослі	587	0,3042	0,1467	0,8548	0,5212

Таблиця 2Дівчата Таннер етапи 1 і 2

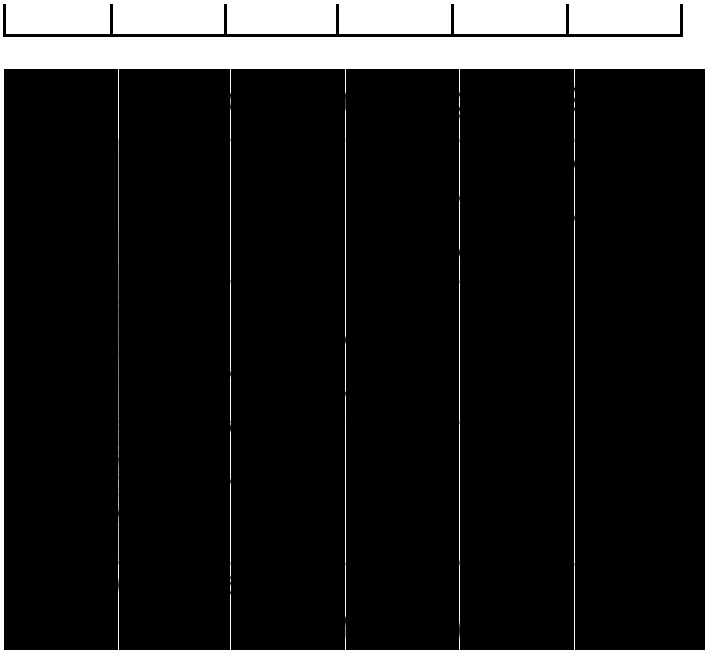
	Процентиль (мкг/л)				
ІМТ (кг/м²)	1	5	50	95	99
11	0,22	0,30	0,66	1.45	1,99
12	0,28	0,39	0,85	1,86	2.56
13	0,36	0,50	1.09	2.38	3.29
14	0,46	0,64	1.40	3.06	4.22
15	0,60	0,82	1.79	3.93	5.42
16	0,76	1.05	2.30	5.04	6.96
17	0,98	1.35	2,95	6.47	8.93
18	1.25	1.73	3.79	8.31	11.5
19	1.61	2.22	4.87	10.7	14.7
20	2.07	2,85	6.25	13.7	18.9
21	2.65	3.66	8.03	17.6	24.3
22	3.41	4.70	10.3	22.6	31.2
23	4.37	6.03	13.2	29,0	40,0
24	5.62	7,75	17.0	37.2	51.4
25	7.21	9,95	21.8	47.8	65.9
26	9.26	12.8	28,0	61.4	84.7
27	11.9	16.4	35.9	78,8	109,0
28	15.3	21.1	46.1	101,0	140,0
29	19.6	27,0	59.2	130,0	
30	15.2	34.7	76.1		
31	32.3	44.6	97.7		
32	41.5	57.2	125,0		
33	53.2	73.4			
34	68.4	94.3			
35	87,8	121,0			
36	113,0				
37	145,0				

Таблиця 3Хлопчики Таннер етапи 1 і 2

	Процентиль (мкг/л)				
ІМТ (кг/м²)	1	5	50	95	99
11	0,08	0,12	0,29	0,69	0,99
12	0,01	0,16	0,38	0,91	1.30
13	0,14	0,20	0,49	1.19	1.71
14	0,19	0,26	0,65	1.56	2.24
15	0,24	0,35	0,85	2.04	2.93
16	0,32	0,46	1.11	2.68	3,84
17	0,41	0,60	1.45	3.51	5.04
18	0,55	0,79	1.90	4.60	6.60
19	0,72	1.03	2.50	6.03	8.66
20	0,94	1.35	3.27	7,90	11.3
21	1.24	1.77	4.29	10.4	14.9
22	1.62	2.33	5.62	13.6	19.5
23	2.12	3.05	7.37	17.8	25.5
24	2.78	3,99	9,66	23.3	33.5
25	3,65	5.24	12.7	30.6	43.9
26	7,78	6.87	16.9	40.1	57.5
27	6.27	9.0	21.7	52.5	75.4
28	8.22	11.8	28.5	68.9	98,8
29	10.7	15.5	37.4	90.3	129,0
30	14.1	20.3	48.9	118,0	
31	18.5	26.6	64.2		
32	24.3	34.8	84.1		
33	31.8	45.6	110,0		
34	41.7	59.8	144,0		
35	54.6	78.4			
36	71.6	102,0			
37	93.9	134,0			
38	123,0				



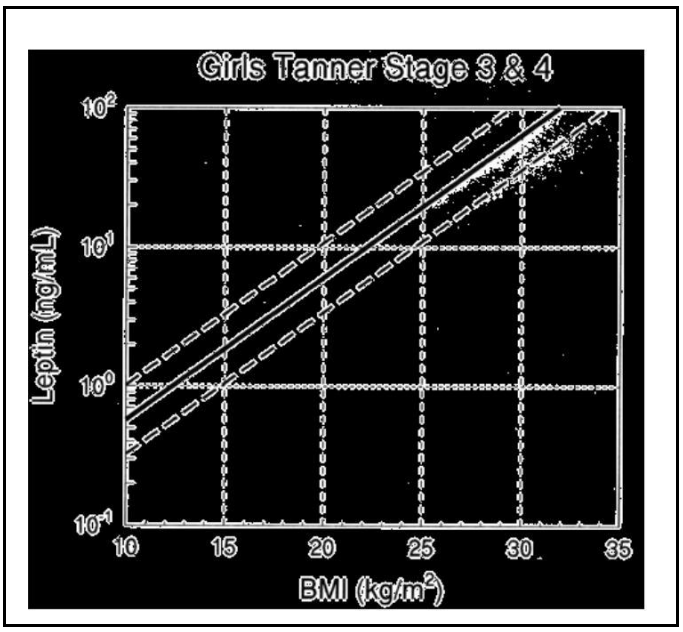
малюнок 2 Референтні діапазони рівнів сироватки крові людини щодо ІМТ: Дівчата Таннер стадії 1 і 2 (див. текст для деталей)



малюнок 3 Референтні діапазони рівнів сироватки крові людини, що стосуються ІМТ: хлопчики Таннер стадії 1 і 2 (див. текст для деталей)

Таблиця 4 Дівчата Таннер етапи 3 і 4

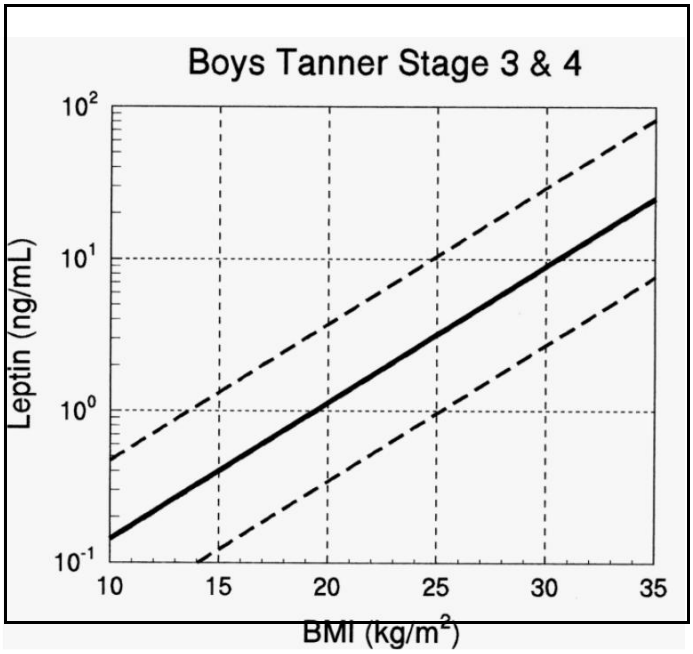
	Процентиль (мкг/л)				
ІМТ (кг/м²)	1	5	50	95	99
11	0,32	0,41	0,73	1,29	1,63
12	0,41	0,52	0,92	1,63	2,06
13	0,52	0,66	1,16	2,07	2,61
14	0,65	0,83	1,47	2,61	3,31
15	0,83	1,05	1,87	3,31	4,19
16	1,05	1,33	2,36	4,19	5,30
17	1,33	1,68	2,99	5,30	6,71
18	1,68	2,13	3,78	6,71	8,49
19	2,13	2,69	4,79	8,5	10,8
20	2,69	3,41	6,06	10,7	13,6
21	3,41	4,31	7,67	13,61	17,2
22	4,32	5,46	9,71	17,2	21,8
23	5,46	6,91	12,3	21,8	27,6
24	6,91	8,75	15,6	27,6	34,9
25	8,75	11,1	19,7	34,9	44,2
26	11,1	14,0	24,9	44,2	56,0
27	14,0	17,7	31,6	56,0	70,9
28	17,8	22,5	39,9	70,9	89,7
29	22,5	28,4	50,5	89,7	114,0
30	28,4	36,0	63,9	114,0	144,0
31	36,0	45,6	80,9	144,0	
32	45,6	57,7	80,2	144,0	
33	57,7	73,0	102,0		
34	73,0	92,4	130,0		
35	92,4	117,0			
36	117,0	148,0			
37	148,0				



малюнок 4Референтні діапазони рівнів сироватки крові людини щодо ІМТ: Дівчата Таннер стадії 3 і 4 (див. текст для деталей).

Таблиця 5 Хлопчики Таннер етапи 3 і 4

	Процентиль (мкг/л)				
ІМТ (кг/м²)	1	5	50	95	99
11	0,03	0,05	0,18	0,58	0,94
12	0,04	0,07	0,22	0,71	1.16
13	0,49	0,08	0,27	0,88	1.43
14	0,06	0,10	0,33	1.08	1.75
15	0,07	0,12	0,40	1.32	2.16
16	0,09	0,15	0,49	1.63	2.65
17	0,11	0,18	0,61	2.00	3.26
18	0,14	0,23	0,75	2.46	4.01
19	0,17	0,28	0,92	3.03	4.93
20	0,21	0,34	1.13	3.72	6.06
21	0,26	0,42	1.39	4.58	7.46
22	0,32	0,52	1.71	5.63	9.17
23	0,39	0,64	2.10	6.92	11.3
24	0,48	0,78	2.58	8.51	13.9
25	0,59	0,96	3.18	10.5	17.0
26	0,73	1.19	3.91	12.9	21.0
27	0,89	1.46	4.80	15.8	25.8
28	1.10	1.79	5.90	19.4	31.7
29	1.35	2.20	7.26	23.9	39,0
30	1.66	2.71	8.93	29.4	48,0
31	2.05	3.33	11.0	36.2	58.9
32	2.51	4.09	13.5	44.5	72.4
33	3.09	5.04	16.6	54.7	89.1
34	3,80	6.20	20.4	67.2	109,0
35	4.68	7.62	25.1	82.6	134,0
36	5.75	9.37	30.9	101,0	
37	7.07	11.5	37.9	124,0	
38	8.7	14.2	46.7		
39	10.7	17.4	57.4		
40	13.1	21.4	70.5		



малюнок 5Референтні діапазони рівнів сироватки крові людини, що стосуються ІМТ: хлопчики Таннер стадії 3 і 4 (див. текст для деталей).

Таблиця 6 Дівчата Таннер етап 5

	Процентиль (мкг/л)				
ІМТ (кг/м²)	1	5	50	95	99
11	0,50	0,66	1.34	2.71	3.62
12	0,58	0,77	1.56	3.15	4.21
13	0,67	0,89	1.81	3.67	4,89
14	0,78	1.04	2.11	4.26	5.69
15	0,91	1.21	2.45	4,96	6.62
16	1.05	1.41	2,85	5.76	7.70
17	1.22	1.64	3.31	6.70	8,95
18	1.42	1.90	3,85	7,79	10.4
19	1.66	2.21	4.48	9.06	12.1
20	1.93	2.57	5.20	10.5	14.1
21	2.24	2,99	6.05	12.3	16.4
22	2.60	3.48	7.03	14.2	19.0
23	3.03	4.04	8.18	16.6	22.1
24	3.52	4.70	9.51	19.3	25.7
25	4.09	5.46	11.0	22.4	29.9
26	4.76	6.35	12.9	26,0	34.8
27	5.53	7.39	15,0	30.3	40.4
28	6.43	8.59	17.39	35.2	47,0
29	7.48	9,99	20.2	40.9	54.7
30	8.70	11.6	23.5	47.6	63.5
31	10.1	13.5	27.3	55.3	73.9
32	11.8	15.7	31.8	64.4	85.9
33	13.7	18.3	37,0	74.9	99,9
34	15.9	21.2	43,0	87,0	116,0
35	18.5	24.7	50,0	101,0	135,0
36	21.5	28.7	58.1	118,0	
37	25,0	33.4	67.6	137,0	
38	29.1	38.8	78.6		
39	33.8	45.1	91.4		
40	39.4	52.5	106,0		

Таблиця 7 Хлопчики Таннер етап 5

	Процентиль (мкг/л)				
ІМТ (кг/м²)	1	5	50	95	99
11	0,03	0,05	0,16	0,47	0,73
12	0,04	0,06	0,18	0,54	0,84
13	0,05	0,07	0,21	0,62	0,97
14	0,05	0,08	0,24	0,72	1.12
15	0,06	0,10	0,28	0,84	1.30
16	0,07	0,11	0,33	0,97	1.51
17	0,08	0,13	0,38	1.12	1.74
18	0,1	0,15	0,44	1.3	2.02
19	0,11	0,17	0,51	1.50	2.34
20	0,13	0,2	0,59	1.74	2.7
21	0,15	0,23	0,68	2.01	3.13
22	0,17	0,27	0,79	2.33	3.62
23	0,20	0,31	0,91	2.69	4.19
24	0,23	0,36	1.05	3.12	4,85
25	0,27	0,41	1.22	3.61	5.62
26	0,31	0,48	1.41	4.17	6.5
27	0,36	0,55	1.63	4.83	7.52
28	0,41	0,64	1,89	5.59	8.71
29	0,48	0,74	2.19	6.47	10.1
30	0,55	0,86	2.54	7.49	11.7
31	0,64	1,00	2.94	8,67	13.5
32	0,74	1.15	3.4	10,0	15.6
33	0,86	1.33	3.94	11.6	18.1
34	0,99	1.54	4.55	13.4	20.9
35	1.15	1.79	5.27	15.6	24.2
36	1.33	2.07	6.10	18.0	28.1
37	1.54	2.39	7.06	20.8	32.5
38	1.78	2.77	8.17	24.1	37.6
39	2.06	3.21	9.46	27.9	43.5
40	2.38	3.71	10.9	32.3	50.3

Малюнок 6 Референтні діапазони рівнів сироватки крові людини, що стосуються ІМТ: Дівчата Таннер стадія 5 (див. текст для деталей)

Редакція 003/12.2022 (01)

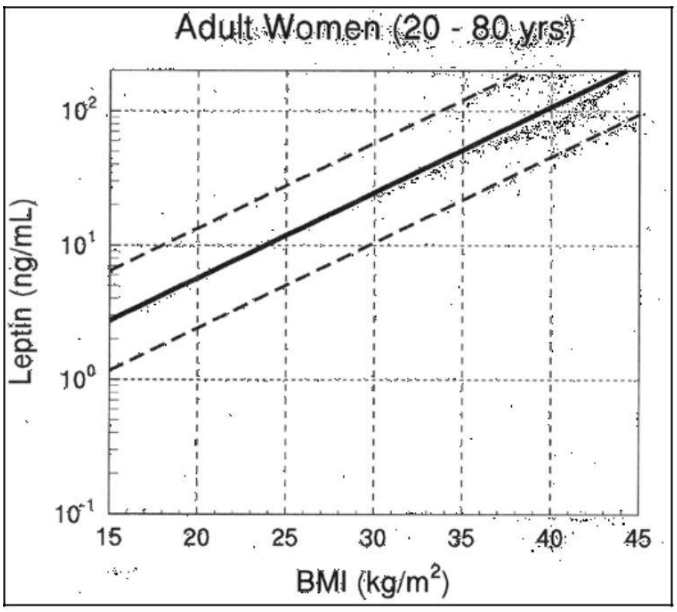
Малюнок 7 Референтні діапазони рівнів сироватки крові людини, що стосуються ІМТ: хлопчики, стадія Таннера 5 (детальніше дивіться в тексті).

Таблиця 8 Дорослі жінки

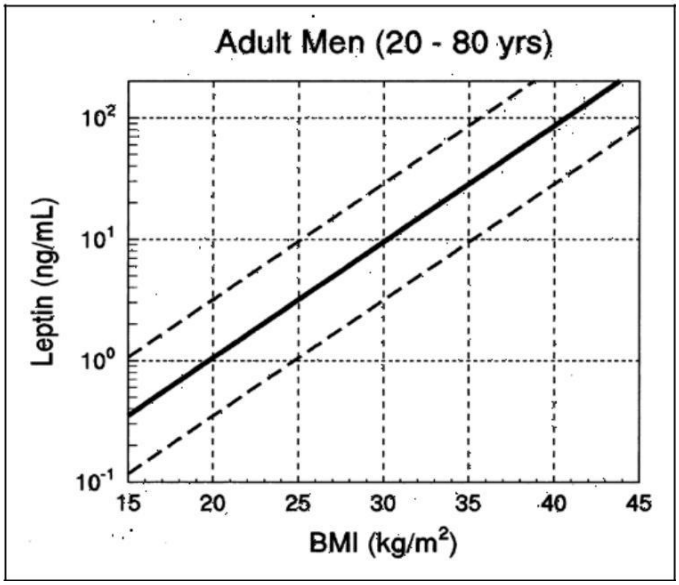
	Процентиль (мкг/л)				
ІМТ (кг/м²)	1	5	50	95	99
11	0,46	0,65	1.53	3.59	5.10
12	0,53	0,75	1.77	4.16	5.90
13	0,61	0,87	2.05	4.82	6.83
14	0,71	1.01	2.37	5.58	7.91
15	7,82	1.17	2.75	6.46	9.17
16	0,95	1.35	3.18	7.48	10.61
17	1.10	1.57	3.68	8.66	12.3
18	1.28	1.81	4.27	10,0	14.2
19	1.48	2.10	4.94	11.6	16.5
20	1.71	2.43	5.72	13.4	19.1
21	1,99	2.82	6.62	15.6	22.1
22	2.30	3.26	7,67	18.0	25.6
23	2.66	3.78	8,88	20.9	29.3
24	3.08	4.38	10.3	24.2	34.3
25	3.57	5.07	11.9	28,0	39.7
26	4.13	5.87	13.8	32.4	46,0
27	4.79	6.79	16.0	37.5	53.3
28	5.54	7,87	18.5	43.5	61.7
29	6.42	9.11	21.4	50.4	71.5
30	7.43	10.6	24.8	58.3	82.8
31	8.61	12.2	28.7	67.5	95.8
32	9,97	14.1	33.3	78.2	111,0
33	11.5	16.4	38.5	90,5	129,0
34	13.4	19.0	44.6	105,0	149,0
35	15.5	22.0	51.6	121,0	
36	17.9	25.4	59.8	141,0	
37	20.8	29.5	69.3		
38	24,0	34.1	80.2		
39	27.8	39.5	92.9		
40	32.2	45.7	108,0		

Таблиця 9 Дорослі чоловіки

	Процентиль (мкг/л)				
ІМТ (кг/м²)	1	5	50	95	99
11	0,03	0,05	0,15	0,44	0,69
12	0,04	0,06	0,18	0,55	0,87
13	0,05	0,08	0,23	0,69	1.08
14	0,06	0,09	0,28	0,85	1.34
15	0,07	0,12	0,35	1.06	1.67
16	0,09	0,15	0,44	1.33	2.09
17	0,12	0,18	0,55	1,65	2.60
18	0,14	0,23	0,68	2.06	3.24
19	0,18	0,28	0,85	2.57	4.04
20	0,22	0,35	1.06	3.20	5.03
21	0,23	0,44	1.32	3,98	6.27
22	0,35	0,54	1.64	4,97	7.81
23	0,43	0,78	2.05	6.19	9.73
24	0,54	0,85	2.55	7.71	12.1
25	0,67	1.05	3.18	9.61	15.1
26	0,83	1.31	3,96	12.0	18.8
27	1.04	1.64	4.94	14.9	23.5
28	1.30	2.04	6.15	18.6	29.2
29	1.61	2.54	7,67	23.2	36.4
30	2.01	3.16	9.56	28.9	45.4
31	2.51	3.94	11.9	36,0	56.6
32	3.12	4.91	14.8	44.9	70.5
33	3,89	6.12	18.5	55.8	87,8
34	4,85	7.63	23.0	69.6	109,0
35	6.04	9.51	28.7	86.7	136,0
36	7.53	11.8	35.8	108,0	
37	9.38	14.8	44.6	135,0	
38	11.7	18.4	55.5		
39	14.6	22.9	69.2		
40	18.2	28.6	86.2		



Малюнок 8 Референтні діапазони рівнів сироватки крові людини щодо ІМТ: дорослі жінки (докладніше див. у тексті)



Малюнок 9 Орієнтовні діапазони рівнів сироватки людини щодо ІМТ: дорослі чоловіки (детальніше див. текст).

12 ТЕХНІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

12.1 Чутливість

Межу виявлення/аналітичну чутливість оцінювали шляхом вимірювання холостого зразка та розрахунку теоретичної концентрації холостого зразка + 2SD. Аналітична чутливість ІФА становить <0,25 нг/мл (різні визначення з діапазоном від 0,012 до 0,24 нг/мл; із середнім значенням 0,095 нг/мл). На основі нерозведеного зразка межа кількісного визначення становить 1 нг/мл.

12.2 Точність

Дисперсія та точність внутрішнього аналізу

Два зразки вимірювали вісім разів у трьох різних аналізах. Зразкові результати наведені в таблиці 10, тут відхилення від цільового значення становить 6,3 і 7%. Виміряний коефіцієнт варіації (CV) у середньому становить 4,26% (n = 6).

Таблиця 10: Варіації всередині аналізу

	Цільове значення [нг/мл]	[n]	Середнє [нг/мл]	Стандартне відхилення [нг/мл]	CV [%]
Зразок 1	85	8	90,36	4.68	5.18
Зразок 2	6	8	6.42	0,3	4.71

Відхилення та точність між аналізами

Точність оцінювали шляхом вимірювання вмісту лептину в тих самих зразках сироватки кілька разів у незалежних аналізах. У середньому коефіцієнт варіації становив 12% (стандартне відхилення 3,5), а відхилення від цільового значення становило менше 20% у 90% перевірених зразків. Результати зведені в таблицю 11.

Таблиця 11 Варіабельність між аналізами і точність. Результати базуються на 835 вимірюваннях протягом 10 років, проведених з 15 різними партіями.

Зразок	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Середнє [нг/мл]	11.11	5.64	37.06	2.38	6.18	7.21	4.65	4.35	2.45	36.08	5.93	25.12	17.54
СВ [нг/мл]	0,92	0,57	3.26	0,43	0,64	0,57	0,49	0,61	0,47	3.68	0,75	2.63	1.66
Число [n]	121	99	28	182	86	86	79	23	27	25	22	26	31
CV [%]	8.33	10.10	8.81	17.97	10.35	7,88	10.57	14.04	19.21	10.19	12.57	10.45	9.46

12.3 Лінійність

Зразки зазвичай використовують нерозведеними. Розведення від 1:2 до 1:20 було протестовано з двома зразками сироватки, і перерахована кількість виміряного лептину істотно не відрізнялася від кількості в нерозведеному зразку. Однак, здається, це залежить від зразка. Два інших зразки були розведені до 1:80 і показали недостатню лінійність (таблиця 12), тому розведення більше 1:10 не рекомендується.

Таблиця 12 Лінійність розведення зразка. Тут показано перераховані концентрації лептину в різних розведених зразках сироватки крові людини. Розведення обробляли як зразки, і ІФА на лептин проводили, як описано в інструкції до упаковки.

	Розведення	Зразок 1 [мкг/л]	Зразок 2 [мкг/л]	Розведення	Зразок 3 [мкг/л]	Зразок 4 [мкг/л]
	нерозбавлений	35.2	17.8	нерозбавлений	36.8	10.5
	1:2	35,0	17.3	1:2	41.3	12.7
	1:5	38.6	18.0	1:4	41.4	14.1
	1:10	35.5	17.7	1:10	39.9	15.7
	1:20	40.6	15.9	1:30	54.5	18.6
	-	-	-	1:60	57.1	26.1
	-	-	-	1:80	55.6	28.5
Середнє [мкг/л]		36,96	17.4	-	46,67	18.01
Стандартне відхилення [мкг/л]		2.5	0,86	-	8,65	6.86
Коефіцієнт варіації [%]		6.8	4,97	-	18.54	38.06

12.4 Відновлення

Рекомбінантний лептин у буфері для розведення використовувався для збагачення зразків сироватки крові людини. Було виміряно вміст лептину в збагачених таким чином зразках і розраховано вихід у порівнянні з теоретичною кількістю лептину. Результати наведені в таблиці 13 і демонструють, що два типові зразки не містять речовин, які заважають вимірюванню лептину.

Таблиця 13 Відновлення рекомбінантного лептину людини у зразках буфера та сироватки

		рекомбінантний лептин		Відновлення [%]	
	без лептину	5 мкг/л	10 мкг/л	5 мкг/л	10 мкг/л
Буфер	-	5.79	11.78	116	118
Зразок 1	5.74	10.72	15.36	100	98
Зразок 2	4.38	9,67	14.63	103	102

Результати, наведені в таблиці 13, демонструють, що два досліджувані зразки не містили речовин, які заважають вимірюванню лептину. Крім того, було оцінено відповідність тест-системи міжнародному стандарту WHO/NIBSC 97/594. Тому стандарт NIBSC розбавляли до 10, 20 і 40 нг/мл і використовували як зразок. Відновлення на основі номінального вмісту лептину за стандартами NIBSC становило 106, 113 і 102% відповідно.

12.5 Вплив

Вплив білірубіну, гемоглобіну та тригліцеридів перевіряли шляхом додавання різних кількостей цих речовин до сироватки крові людини, що містить лептин. Для порівняння до сироватки також додавали таку ж кількість буфера без жодної речовини. Таблиця 14 демонструє, що ні білірубін, ні тригліцериди, ні гемоглобін не впливають на вимірювання лептину в сироватці крові людини.

Таблиця 14 Інтерференція фізіологічних речовин

	Тригліцериди 100 мг/мл	**Білірубін 100 мкг/мл**	**Гемоглобін 1 мг/мл**
Сироватка 1	95	101	94
Сироватка 2	107	105	105
Сироватка 3	111	101	101

13 ПОРІВНЯЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Тут ІФА на лептин порівнюється з трьома різними комерційно доступними тест-системами, демонструючи хорошу кореляцію між обома аналізами (рис. 10).

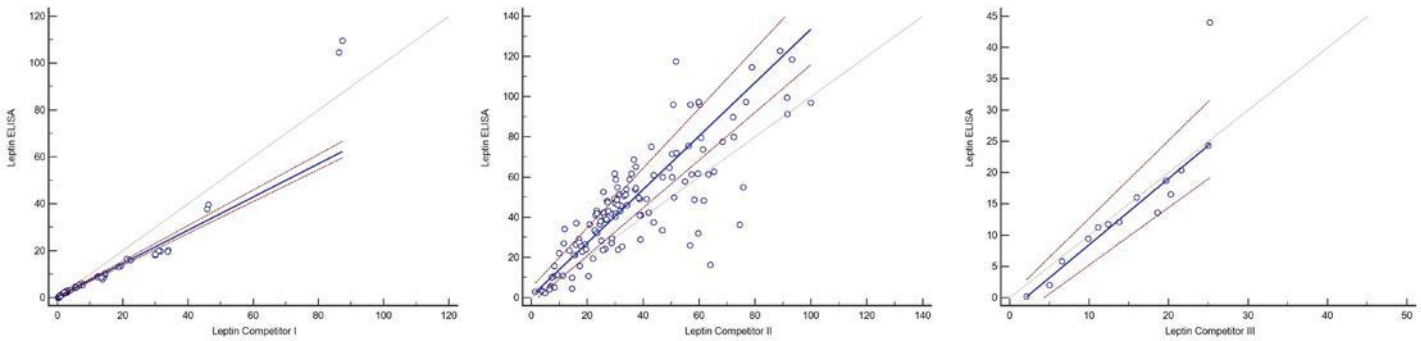


Рисунок 10 Порівняння аналізів. Лептин [нг/мл] різних панелей зразків (n=80/127/14) оцінювали трьома різними комерційно доступними імуноаналізами та методом ІФА на лептин. Результати були проаналізовані Перехідний-Баблок регресія.
Значне відхилення від лінійності (тест Кусума) спостерігається у конкурента I.
Аналіз виявив наступні лінійні рівняння та залишкові стандартні відхилення:

Рисунок 10 Порівняння аналізів. Було оцінено лептин [нг/мл] різних панелей зразків (n=80/127/14).
Конкурент I y = 0,359 + 0,709x (6,013)
Конкурент II y = 0,713 + 1,329x (10,372)
Конкурент III y = -2,067 + 1,057x (4,0173)

Інструкція з використання для наукового застосування

14 НАУКОВЕ ЗАСТОСУВАННЯ

Окрім зразків сироватки та плазми, лептин можна визначати в інших рідинах організму людини та в супернатантах клітинних культур клітинних ліній людини для дослідницьких цілей.

14.1 Зразки, придатні для наукового застосування

Сироватка, плазма, слина, сеча та супернатант культури клітин людини

Зразки сироватки та плазми рекомендується використовувати нерозведеними.
В інших зразках рівні лептину можуть значно відрізнятися, оптимальне розведення має визначити клієнт.

Таблиця 15 Результати зразкових тестів матриці. До відповідних розведених зразків додавали лептин. Збагачені зразки вимірювали без подальшого розведення. Показано відносне відновлення доданого лептину значення, виміряного у збагаченому буфері для аналізу.

Розведення	Зразок	[нг/мл]	Відновлення [%]
-	Буфер для розведення + рекомбінантний лептин	4,342	--
-	Слина	0,247	--
1:2	Слина + рек. Лептин	4,738	103
1:5	Слина + рек. Лептин	4,354	95
1:10	Слина + рек. Лептин	4,408	96
1:20	Слина + рек. Лептин	4,343	95
-	сеча	0,203	--
1:2	Сеча + рек. Лептин	4,486	99
1:5	Сеча + рек. Лептин	5.101	112
1:10	Сеча + рек. Лептин	5,316	117
1:20	Сеча + рек. Лептин	4,492	99
-	Середовище для культивування клітин	0,003	--
1:2	Середовище для культури клітин + рек. Лептин	3,922	90
1:5	Середовище для культури клітин + рек. Лептин	5,571	128
1:10	Середовище для культури клітин + рек. Лептин	5.112	118
1:20	Середовище для культури клітин + рек. Лептин	3.63	84
без додавання лептину			
Розведення	**Зразок**	**[нг/мл]**	**Відновлення [%]**
1:1	Амніотична рідина	21,981	100
1:2	Амніотична рідина	21,812	99
1:4	Амніотична рідина	19,236	88
1:8	Амніотична рідина	18,537	84
1:16	Амніотична рідина	17,876	81

14.2 Перехресна реактивність видів

Сироватку зазначених видів розбавляли та використовували як зразок у цій системі аналізу.

Сигнал не виявлено в сироватці наступних видів:
Кінь, Корова, Курка, Кролик, Собака, Морська свинка, Вівця, Миша, Коза, Осел, Щур, Кіт, Свиня.

15 ЛІТЕРАТУРА / ПОСИЛАННЯ

1. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994 Позиційне клонування гена ожиріння миші та його людського гомолога. природа 372:425-432.
2. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M та ін. 1995 Ефекти зниження ваги білка плазми, кодованого геном ожиріння. Наука. 269:543-546.
3. MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. 1995 Регульована експресія продукту гена ожиріння (лептину) у білій жировій тканині та адипоцитах 3T3-L1. Proc Natl Acad Sci US A. 92:9034-9037.
4. Rentsch J, Chiesi M. 1996 Регуляція рівнів мРНК гена ob у культивованих адипоцитах. FEBS Lett. 379:55-59.
5. Wabitsch M, Jensen PB, Blum WF та ін. 1996 Інсулін і кортизол сприяють виробленню лептину в культивованих жирових клітинах людини. Цукровий діабет. 45:1435-1438.
6. Stephens TW, Basinski M, Bristow PK та ін. 1995 Роль нейропептиду Y у дії генного продукту ожиріння проти ожиріння. природа 377:530-532.
7. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. 1995 Рекомбінантний білок OB миші: доказ периферичного сигналу, що зв'язує ожиріння та центральні нейронні мережі. Наука. 269:546-549.
8. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB та ін. 1995 Вплив продукту гена ожиріння на регуляцію маси тіла у ob/ob мишей. Наука. 269:540-543.
9. Levin N, Nelson C, Gurney A, Vandlen R, de-Sauvage F. 1996 Зменшення споживання їжі не повністю пояснює зменшення ожиріння після інфузії протеїну. Proc Natl Acad Sci US A. 93:1726-1730.
10. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X та ін. 1995 Ідентифікація та клонування експресії рецептора лептину, OB-R. Стільниковий. 83:1263-1271.
11. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA та ін. 1996 Докази того, що ген діабету кодує рецептор лептину: виявлення мутації в гені рецептора лептину у мишей db/db. Стільниковий. 84:491-495.
12. Lee GH, Proenca R, Montez JM та ін. 1996 Аномальний сплайсинг рецептора лептину у діабетичних мишей. природа 379:632-635.
13. Лінн Р.Б., Као Г.Й., Консідайн Р.В., Гайд Т.М., Каро Дж.Ф. 1996 Авторадіографічна локалізація зв'язування лептину в судинному сплетінні мишей ob/ob і db/db. Biochem Biophys Res Commun. 219:884-889.
14. Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Hyde TM, Caro JF. 1996 Гіпоталамічний рецептор лептину у людини: ідентифікація випадкових поліморфізмів послідовності та відсутність мутацій db/db миші та fa/fa щура. Цукровий діабет. 45:992-994.
15. Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, et al. 1996 Доказ вільного та зв'язаного лептину в кровообігу людини. J Clin Invest. 98:1277-1282.
16. Ахіма Р.С., Прабакаран Д., Манцорос С. та ін. 1996 Роль лептину в нейроендокринній відповіді на голодування. природа 382:250-252.
17. Chehab FF, Lim ME, Lu R. 1996 Корекція дефекту стерильності у гомозиготних самок мишей із ожирінням шляхом лікування рекомбінантним лептином людини. Нат Генет. 12:318-320.
18. Шварц М.В., Баскін Д.Г., Буковскі Т.Р. та ін. 1996 Специфіка дії лептину на підвищений рівень глюкози в крові та експресію гена нейропептиду Y гіпоталамуса у ob/ob мишей. Цукровий діабет. 45:531-535.
19. Шварц М.В., Сілі Р.Дж., Кемпфілд Л.А., Берн П., Баскін Д.Г. 1996 Ідентифікація мішеней дії лептину в гіпоталамусі щурів. J Clin Invest. 98:1101-1106.
20. Кемпфілд Л.А., Сміт Ф.Дж., Берн П. 1996 Шлях білка OB (лептину) - зв'язок між масою жирової тканини та центральними нейронними мережами. Horm Metab Res. 28:619-632.
21. Rohner-Jeanrenaud F, Cusin I, Sainsbury A, Zakrzewska KE, Jeanrenaud B. 1996 Система петлі між нейропептидом Y і лептином у нормальних гризунів і гризунів із ожирінням. Horm Metab Res. 28:642-648.
22. Чан Ю.Й., Штайнер Р.А., Кліфтон Д.К. 1996 Регуляція гіпоталамічних нейропептидів-Y нейронів гормоном росту у щурів. ендокринол. 137:1319-1325.
23. Pierroz DD, Catzeflis C, Aebi AC, Rivier JE, Aubert ML. 1996 Хронічне введення нейропептиду Y у бічний шлуночок пригнічує як вісь гіпофіз-яєчка, так і секрецію гормону росту та інсуліноподібного фактора росту I у інтактних дорослих самців щурів. ендокринол. 137:3-12.
24. Фредеріх Р.К., Хаманн А., Андерсон С., Лоллманн Б., Лоуелл Б.Б., Флієр Дж.С. 1995 Рівні лептину відображають вміст ліпідів в організмі мишей: докази спричиненої дієтою стійкості до дії лептину. Nat Med. 1:1311-1314.
25. Maffei M, Halaas J, Ravussin E та ін. 1995 р. Рівні лептину в організмі людини та гризунів: вимірювання лептину в плазмі крові та ob РНК у людей із ожирінням та зниженою вагою. Nat Med. 1:1155-1161.

26. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML та ін. 1996 Концентрації імунореактивного лептину в сироватці крові у людей із нормальною вагою та ожирінням. N Engl J Med. 334:292-295.
27. Kolaczynski JW, Considine RV, Ohannesian J, et al. 1996 Реакція лептину на короткочасне голодування та повторне харчування у людей: зв'язок із кетогенезом, але не з самими кетонами. Цукровий діабет. 45:1511-1515.
28. Харріс Р.Б., Рамзі Т.Г., Сміт С.Р., Брух Р.Ц. 1996 Рання та пізня стимуляція експресії мРНК ob у щурів, яких годували їжею та перегодовували. J Clin Invest. 97:2020-2026.
29. Колачинський JW, Ohannesian J, Considine RV, Marco C, Caro JF. 1996 Реакція лептину на короткочасне та тривале перегодовування у людей. J Clin Endocrinol Metab. 91:4162-4165.
30. Саладін Р., Де-Вос П., Герре-Мілло М. та ін. 1995 Тимчасове збільшення експресії генів ожиріння після прийому їжі або введення інсуліну. природа 377:527-529.
31. Cusin I, Sainsbury A, Doyle P, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. 1995 Ген ob та інсулін. Взаємозв'язок, що веде до підказок до розуміння ожиріння. Цукровий діабет. 44:1467-1470.
32. Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV та ін. 1996 Гострий і хронічний вплив інсуліну на вироблення лептину у людей: дослідження in vivo та in vitro. Цукровий діабет. 45:699-701.
33. Malström R, Taskinen MR, Karonen SL, Yki-Järvinen H. 1996 Інсулін підвищує концентрацію лептину в плазмі у здорових суб'єктів і пацієнтів з NIDDM. Діабетологія. 39:993-996.
34. De-Vos P, Saladin R, Auwerx J, Staels B. 1995. Індукція експресії гена ob кортикостероїдами супроводжується втратою маси тіла та зменшенням споживання їжі. J Biol Chem. 270:15958-15961.
35. Slieker LJ, Sloop KW, Surface PL та ін. 1996 Регуляція експресії ob мРНК і білка глюкокортикоїдами і цАМФ. J Biol Chem. 271:5301-5304.
36. Miell JP, Englaro P, Blum WF. 1996 Дексаметазон викликає гостре та тривале підвищення рівня циркулюючого лептину у здорових людей. Horm Metab Res. 28:704-707.
37. Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML та ін. 1996 Нічне підвищення рівня лептину у худих, страждаючих ожирінням і інсулінонезалежним цукровим діабетом. J Clin Invest. 97:1344-1347.
38. Havel PJ, Kasim-Karakas S, Dubuc GR, Mueller W, Phinney SD. 1996 Статеві відмінності в концентрації лептину в плазмі. Nature Med. 2:949-950.
39. Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J та ін. 1996 Вплив статі, будови тіла та менопаузи на концентрацію лептину в плазмі. J Clin Endocrinol Metab. 81:3424-3427.
40. Hassink SG, Sheslow DV, de Lancey E, Opentanova I, Considine RV, Caro JF 1996 Сироватковий лептин у дітей з ожирінням: зв'язок зі статтю та розвитком. Педіатрія. 98:201-203.
41. Scholz GH, Englaro P, Thiele I та ін. 1996 Дисоціація концентрації лептину в сироватці крові та вмісту жиру в організмі під час тривалого дієтичного втручання в осіб із ожирінням. Horm Metab Res. 28:718-723.
42. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR та ін. 1996 Зниження співвідношення спинномозкової рідини/сироваткового лептину при ожирінні: можливий механізм стійкості до лептину. Ланцет. 348:159-161.
43. Робінсон CJ, Gaines-Das R, Woollacott D та ін. 2001 Перший міжнародний стандарт людського лептину та перший міжнародний стандарт мишачого лептину: порівняння препаратів-кандидатів за допомогою біотестів in vitro та імуноаналізів. J Молекулярний ендокринол. 27: 69-76.
44. Адреса NIBSC: Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Great Britain.
45. Blum WF, Juul A; Референтні діапазони лептину сироватки,с.318-326. У: Лептин - голос жирової тканини, Blum WF та інші, ред., Johann Ambrosius Verlag, Heidelberg, 1997.