

# **TECO**® *Leptine*

## **Dosage de la Leptine Humaine par méthode ELISA**

Mode d'Emploi  
Français

CE

Catalogue No. TE1015

*always your partner*

## Symbol Description



Consulter le Mode d'Emploi



Numéro de Lot



Date de Péréemption



Diagnostic In Vitro



CE Déclaration de Conformité  
H-CH/CA01/IVD/21125



Température de Stockage



Fabriqué par



Attention



TE 1015



Attention: caustique



Intérêt



Tests

### **TECO**medical AG

Siège du groupe **TECO**medical

Gewerbestrasse 10  
4450 Sissach  
Suisse

phone +41(0)61 985 81 00  
fax +41(0)61 985 81 09

mail [info@tecomedical.com](mailto:info@tecomedical.com)  
web [www.tecomedical.com](http://www.tecomedical.com)



---


#### Services techniques:

Allemagne 0800 985 99 99  
France 0 800 100 437  
Benelux +31(0)33 4951 473  
USA/Canada 1-800-524-6318

Ou contactez votre représentant local.

# TECO® Dosage de la Leptine Humaine par méthode ELISA

## **CONT** Matériel fourni:

Symboles	Description	Format
<b>1</b>	<b>Microplaque recouverte d'Anticorps</b> 12 barrettes sécables de 8 puits (12 x 8 au total), sur un support, prêtes à l'emploi	1 plaque
<b>A</b>	<b>Standard A</b> 1 ng/ml - lyophilisé	1 x 0,75 ml
<b>B</b>	<b>Standard B</b> 10 ng/ml - lyophilisé	1 x 0,75 ml
<b>C</b>	<b>Standard C</b> 25 ng/ml - lyophilisé	1 x 0,75 ml
<b>D</b>	<b>Standard D</b> 50 ng/ml - lyophilisé	1 x 0,75 ml
<b>E</b>	<b>Standard E</b> 100 ng/ml - lyophilisé	1 x 0,75 ml
<b>L</b>	<b>Contrôle 1</b> lyophilisé, Valeur indiquée sur la fiche de contrôle	1 x 0,5 ml
<b>H</b>	<b>Contrôle 2</b> lyophilisé, Valeur indiquée sur la fiche de contrôle	1 x 0,5 ml
<b>2</b>	<b>Diluant</b> Prêt à l'emploi	1 x 25 ml
<b>3</b>	<b>Conjugué- HRP</b> Prêt à l'emploi	1 x 12 ml
<b>4</b>	<b>Substrat TMB</b> Prêt à l'emploi	1 x 12 ml
<b>5</b>	<b>Solution de Lavage</b> Concentrée 20 fois	1 x 50 ml
<b>6</b>	<b>Solution d'Arrêt – 0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b> Acide sulfurique 0,2 M, prête à l'emploi	1 x 12 ml
<b>7</b>	<b>Couvercle pour microplaque, adhésif</b>	2 pièces
	<b>Mode d'Emploi</b>	1 x



## **Stockage**

Conserver le kit à 2–8 °C. Ne pas congeler. Conserver les réactifs inutilisés à 2–8 °C.

## **Intérêt du dosage**

Le kit TECO® de dosage de la Leptine Humaine est un dosage in vitro ELISA sensible de type sandwich, qui permet de faire le dosage quantitatif de la Leptine dans le plasma et le sérum humains.

## **Intérêt clinique**

La leptine, produite par le gène ob [1, 2], est une hormone de découverte récente (1994). C'est une hormone protéique formée d'une seule chaîne, de poids moléculaire 16 kD, dont on pense qu'elle joue un rôle clef dans la régulation du poids corporel. Sa séquence d'acides aminés ne présente pas d'homologie majeure avec les autres protéines [1]. La leptine est presque exclusivement produite par des adipocytes différenciés [3–5]. Elle agit sur le Système Nerveux Central, en particulier sur l'hypothalamus, en diminuant la prise alimentaire et en augmentant la dépense d'énergie [2, 6–9]. Les récepteurs de la leptine – il en existe plusieurs qui diffèrent par leur longueur – appartiennent à la famille des récepteurs des cytokines de classe I [10–12]. On les trouve dans tout le corps [10, 11, 13, 14] ce qui indique un rôle général de la leptine, rôle qui n'est pas complètement élucidé à l'heure actuelle.

Il existe une forme circulante de récepteur de la leptine qui agit comme l'une des protéines de liaison de la leptine [15]. A côté de ses effets métaboliques, on a montré que la leptine a une influence importante sur un certain nombre d'axes endocriniens. Chez les souris mâles, elle atténue la diminution de la LH, de la testostérone et de la thyroxine, ainsi que l'augmentation de l'ACTH et de la corticostérone induites par le jeûne. Chez les souris femelles, la leptine prévient le délai ovulatoire induit par le jeûne [16]. Les souris Ob/ob, qui sont déficientes en leptine en raison de la mutation du gène ob, sont infertiles. Ce défaut peut être corrigé par l'administration de leptine, mais pas par la perte de poids consécutive au jeûne [17], ce qui suggère que la leptine est le pivot de la fonction reproductrice.

Toutes ces actions peuvent, du moins en partie, s'expliquer par l'action suppressive de la leptine sur l'expression et la sécrétion du neuropeptide Y (NPY) par les neurones du noyau arqué [6, 18, 19]. Le NPY est un puissant stimulateur de l'appétit [20, 21] et l'on sait qu'il est impliqué dans la régulation de plusieurs hormones pituitaires: suppression de la GH par la stimulation de la somatostatine [22,23], suppression des gonadotrophines [23] ou stimulation de l'axe hypophysio-surrénalien [21]. La variable la plus importante, qui détermine le taux de leptine circulante, est la masse de graisse corporelle [24-26]. Apparemment, sous réserve de cycles alimentaires réguliers, la leptine reflète la proportion de tissu adipeux [27] avec une relation exponentielle [37]. Cette synthèse constitutive de la leptine est modulée par un certain nombre de variables hormonales et non hormonales. Les facteurs de stimulation chez les rongeurs et chez l'homme sont l'excès alimentaire [28, 29], l'insuline [3, 5, 30–33] et les glucocorticoïdes [5, 34–36]. Les facteurs de suppression sont le jeûne [27], les agonistes du cAMP et de l'adrénorécepteur beta-3 [35]. A partir de ces découvertes, il est évident que la leptine fait partie intégrale de différents cycles de feedback métaboliques et endocrines [38].

Du point de vue clinique, il est important de noter que les taux de leptine sérique montrent une variation circadienne modérée avec un pic pendant la nuit vers 2 heures du matin [37]. Les taux

de leptine à ce moment là sont de 30 à 100 % supérieurs aux taux mesurés le matin ou en début d'après midi. Il faudra tenir compte de cette variation ainsi que de l'influence de l'alimentation, lors du recueil de l'échantillon sanguin.

Dans des conditions standard (cycles alimentaires normaux, et recueil du sang le matin ou en début d'après-midi) un seul dosage de leptine suffit à donner des informations.

Pour faire une bonne interprétation de la mesure des taux de leptine, il est nécessaire de disposer de valeurs de référence. Puisque la masse de graisse corporelle représente la principale variable, ces valeurs doivent se référer à la mesure du pourcentage de graisse corporelle comme l'Indice de Masse Corporelle (IMC) ou au pourcentage de graisse corporelle mesurée par l'impédance bioélectrique (BIA). Les taux de leptine sont plus élevés chez la femme que chez l'homme [38, 39] et on a mis en évidence une influence de l'âge chez les enfants et les adolescents [40]. Il faudra donc répartir les valeurs de référence correspondant à la mesure de la graisse corporelle en fonction du sexe et du développement pubertaire.

Les taux de leptine sont élevés chez la plupart des patients obèses, ce qui suggère une insensibilité à la leptine [20, 26, 37, 38, 41, 42]. Chez un petit pourcentage de ces patients toutefois, on a trouvé des taux de leptine trop bas si l'on se réfère à leur masse grasseuse. Lors de futures études, il faudra démontrer que ces patients représentent une nouvelle entité pathophysiologique: la déficience en leptine. Dans la mesure où on a montré également que la leptine a une grande importance pour la fonction reproductrice, on pourra découvrir de nouveaux mécanismes reliant l'infertilité à une production de leptine insuffisante.

La découverte de la leptine a engendré une avalanche de projets de recherche cherchant à comprendre la régulation et l'action de cette nouvelle hormone. Mais surtout, elle a apporté la clef d'une meilleure compréhension de la physiologie de la régulation du poids corporel et la possibilité de mettre en évidence de possibles mécanismes patho-physiologiques de l'obésité et des troubles de la nutrition. Elle pourrait également fournir de nouvelles idées quand à la cause de certaines infertilités.

La leptine est un paramètre intéressant pour les médecins, tels que les **diabétologues, endocrinologues, gynécologues ou andrologues**, qui traitent **syndromes métaboliques, obésité, cachexie** et autres **désordres nutritionnels**, ainsi que pour les **psychiatres** qui traitent des patients atteints de **désordres nutritionnels**.

La comparaison avec des valeurs de référence rapportées à l'IMC peut se révéler utile pour détecter des conditions de **déficience relative en leptine** comme possible cause de l'obésité, ou pour donner une indication de **résistance à la leptine**.

En raison de sa forte corrélation avec la masse de graisse corporelle, la mesure de la leptine dans les conditions standard représente un test simple permettant d'évaluer la **graisse corporelle**.

## Références

- [1] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. **Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.** Nature. 1994; 372:425-432.
- [2] Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, et al. **Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene.** Science. 1995; 269:543-546.
- [3] MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. **Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92:9034-9037.
- [4] Rentsch J, Chiesi M. **Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes.** FEBS Lett. 1996; 379:55-59.
- [5] Wabitsch M, Jensen PB, Blum WF, et al. **Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells.** Diabetes. 1996; 45:1435-1438.
- [6] Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, et al. **The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product.** Nature. 1995; 377:530-532.
- [7] Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. **Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks.** Science. 1995; 269:546-549.
- [8] Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, et al. **Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice.** Science. 1995; 269:540-543.
- [9] Levin N, Nelson C, Gurney A, Vandlen R, de-Sauvage F. **Decreased food intake does not completely account for adiposity reduction after ob protein infusion.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; 93:1726-1730.
- [10] Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, et al. **Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R.** Cell. 1995; 83:1263-1271.
- [11] Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, et al. **Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice.** Cell. 1996; 84:491-495.
- [12] Lee GH, Proenca R, Montez JM, et al. **Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice.** Nature. 1996; 379:632-635.
- [13] Lynn RB, Cao GY, Considine RV, Hyde TM, Caro JF. **Autoradiographic localization of leptin binding in the choroid plexus of ob/ob and db/db mice.** Biochem Biophys Res Commun. 1996; 219:884-889.

## Références

- [14] Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Hyde TM, Caro JF.  
**The hypothalamic leptin receptor in humans: identification of incidental sequence polymorphisms and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations.**  
Diabetes. 1996; 45:992-994.
- [15] Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, et al.  
**Evidence of free and bound leptin in human circulation.**  
J Clin Invest. 1996; 98:1277-1282.
- [16] Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, et al.  
**Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting.**  
Nature. 1996; 382:250-252.
- [17] Chehab FF, Lim ME, Lu R.  
**Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin.**  
Nat Genet. 1996; 12:318-320.
- [18] Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, et al.  
**Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice.**  
Diabetes. 1996; 45:531-535.
- [19] Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG.  
**Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus.**  
J Clin Invest. 1996; 98:1101-1106.
- [20] Campfield LA, Smith FJ, Burn P.  
**The OB protein (leptin) pathway – a link between adipose tissue mass and central neural networks.**  
Horm Metab Res. 1996; 28:619-632.
- [21] Rohner-Jeanrenaud F, Cusin I, Sainsbury A, Zakrzewska KE, Jeanrenaud B.  
**The loop system between neuropeptide Y and leptin in normal and obese rodents.**  
Horm Metab Res. 1996; 28:642-648.
- [22] Chan YY, Steiner RA, Clifton DK.  
**Regulation of hypothalamic neuropeptide-Y neurons by growth hormone in the rat.**  
Endocrinol. 1996; 137:1319-1325.
- [23] Pierroz DD, Catzeflis C, Aebi AC, Rivier JE, Aubert ML.  
**Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle inhibits both the pituitary-testicular axis and growth hormone and insulinlike growth factor I secretion in intact adult male rats.**  
Endocrinol. 1996; 137:3-12.
- [24] Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS.  
**Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action.**  
Nat Med. 1996; 1:1311-1314.
- [25] Maffei M, Halaas J, Ravussin E, et al.  
**Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects.**  
Nat Med. 1995; 1:1155-1161.

## Références

- [26] Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, et al.  
**Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans.**  
N Engl J Med. 1996; 334:292-295.
- [27] Kolaczynski JW, Considine RV, Ohannesian J, et al.  
**Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: A link with keto-genesis but not ketones themselves.**  
Diabetes. 1996; 45:1511-1515.
- [28] Harris RB, Ramsay TG, Smith SR, Bruch RC.  
**Early and late stimulation of ob mRNA expression in meal-fed and overfed rats.**  
J Clin Invest. 1996; 97:2020-2026.
- [29] Kolaczynski JW, Ohannesian J, Considine RV, Marco C, Caro JF.  
**Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans.**  
J Clin Endocrinol Metab. 1996; 91:4162-4165.
- [30] Saladin R, De-Vos P, Guerre-Millo M, et al.  
**Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration.**  
Nature. 1995; 377:527-529.
- [31] Cusin I, Sainsbury A, Doyle P, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B.  
**The ob gene and insulin. A relationship leading to clues to the understanding of obesity.**  
Diabetes. 1995; 44:1467-1470.
- [32] Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV, et al.  
**Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: studies in vivo and in vitro.**  
Diabetes. 1996; 45:699-701.
- [33] Malström R, Taskinen M-R, Karonen S-L, Yki-Järvinen H.  
**Insulin increases plasma leptin concentrations in normal subjects and patients with NIDDM.**  
Diabetologia. 1996; 39:993-996.
- [34] De-Vos P, Saladin R, Auwerx J, Staels B.  
**Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake.**  
J Biol Chem. 1995; 270:15958-15961.
- [35] Slieker LJ, Sloop KW, Surface PL, et al.  
**Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP.**  
J Biol Chem. 1996; 271:5301-5304.
- [36] Miell JP, Englaro P, Blum WF.  
**Dexamethasone induces an acute and sustained rise in circulating leptin levels in normal human subjects.**  
Horm Metab Res. 1996; 28:704-707.
- [37] Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, et al.  
**Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin- dependent diabetes mellitus subjects.**  
J Clin Invest. 1996; 97:1344-1347.

## Références

- [38] Havel PJ, Kasim-Karakas S, Dubuc GR, Mueller W, Phinney SD.  
**Gender difference in plasma leptin concentrations.**  
Nature Med. 1996; 2:949-950.
- [39] Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J, et al.  
**Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin.**  
J Clin Endocrinol Metab. 1996; 81: 3424-3427.
- [40] Hassink SG, Sheslow DV, de Lancey E, Opentanova I, Considine RV, Caro JF.  
**Serum leptin in children with obesity: relationship to gender and development.**  
Pediatrics. 1996; 98:201-203.
- [41] Scholz GH, Englaro P, Thiele I, et al.  
**Dissociation of serum leptin concentration and body fat content during long term dietary intervention in obese individuals.**  
Horm Metab Res. 1996; 28:718-723.
- [42] Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, et al.  
**Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance.**  
Lancet. 1996; 348:159-161.
- [43] Robinson CJ, Gaines-Das R, Woollacott D, et al.  
**The first international standard for human leptin and the first international standard for mouse leptin: comparison of candidate preparations by in vitro bioassays and immunoassays.**  
J Molecular Endocrinol. 2001; 27: 69-76.
- [44] Adresse NIBSC:  
**Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Great Britain.**
- [45] Blum WF, Juul A;  
**Reference ranges of serum leptin.**  
In: Leptin – the voice of adipose tissue, Blum WF et al, eds., Johann Ambrosius Verlag, Heidelberg, 1997,s.318-326.

## Principe du Dosage

Le dosage de Leptine TECO® TE1015 est un dosage de type sandwich qui utilise deux anticorps monoclonaux spécifiques et de forte affinité. La Leptine présente dans les échantillons se lie d'abord au premier anticorps fixé sur la microplaque. Lors de l'étape suivante, le deuxième anticorps spécifique de la leptine se lie à son tour à la Leptine immobilisée. Le second anticorps est biotinylé et sera incubé avec le conjugué enzymatique Streptavidine-Péroxydase. Lors de la réaction avec le substrat, le changement de couleur est catalysé de façon quantitative, en fonction de la quantité de Leptine présente dans les échantillons.

## Matériel nécessaire mais non fourni

- Pipettes pouvant distribuer 20 µl, 100 µl, 350 µl, 500 µl et 750 µl
- Récipients pour reconstituer ou diluer les réactifs
- Système d'aspiration manuelle ou multipette, ou Laveur automatique
- Eau distillée
- Vortex
- Lecteur de microplaques ELISA 96 puits, capable de mesurer à 450 nm (Référence: 590–650 nm).
- Agitateur de plaques ELISA ( $\geq 350$  tr/min) (agitation orbitale)
- Logiciel de traitement des données

## Précautions d'Emploi

Ce kit est destiné exclusivement à un usage in vitro.

### **Suivre avec attention le Mode d'Emploi.**

Les réactifs sont stables jusqu'aux dates de péremption mentionnées sur les étiquettes, sous réserve des conditions de stockage. Suivre les recommandations pour le stockage des réactifs reconstitués. Se reporter à la Fiche de Sécurité pour plus de détails concernant les précautions d'utilisation.

On a testé du matériel d'origine humaine pour la préparation de certains réactifs. Bien que ce matériel soit négatif pour HIV-1 et HIV-2 ainsi que pour les anticorps HCV et l'HbsAg, on doit le manipuler comme s'il était potentiellement infectieux.

TECOmedical AG ne peut être tenu pour responsable en cas de perte ou de problème faisant suite à un non respect du protocole.

1. Pour utilisation in vitro.
2. Traiter tous les échantillons à tester comme potentiellement infectieux. Appliquer les précautions requises et les bonnes pratiques de laboratoire lors de la manipulation du kit et des échantillons de patients.
3. Eliminer les réactifs en respectant la législation en vigueur.
4. Utiliser ensemble les réactifs du kit avant la date de péremption qui figure sur l'étiquette externe.
5. Conserver les réactifs comme indiqué dans le mode d'emploi.
6. Ne pas utiliser les barrettes de puits recouverts si le sachet est détérioré.
7. Tester chaque échantillon en double.
8. L'utilisation de multipettes ou de distributeur automatique est recommandée afin d'assurer une bonne distribution des réactifs.
9. a) L'acide sulfurique 0.2 M peut causer des brûlures sévères.  
b) Manipuler le TMB avec précautions.  
Ne pas ingérer. Eviter tout contact avec la peau, les yeux ou les vêtements. En cas de contact, rincer immédiatement à l'eau. En cas d'ingestion, appeler un médecin.
10. On utilise comme conservateur le 2-Méthyl-4-isothiazoline-3-one (0.01%) et le 5-chloro-2-méthyl-2H-isothiazol-3-one / 2-méthyl-2H-isothiazol-3-one (0.01%) pour l'Anticorps, le Diluant et la Solution de Lavage. Ne pas ingérer. Eviter tout contact avec la peau, les yeux ou les vêtements. En cas de contact, rincer immédiatement à l'eau. En cas d'ingestion, appeler un médecin.

## Préparation des Réactifs

### **1** **Plaque de Microtitration recouverte d'un anticorps anti-Leptine humaine**

12 barrettes sécables de 8 puits (96 au total) sur un support et dans un sachet d'aluminium scellé. Fixer les barrettes fermement sur le support. Après ouverture, conserver les barrettes inutilisées dans le sachet d'origine en aluminium et fermer celui-ci. Conserver à 2-8 °C jusqu'à la date de péremption.

### **A** **à** **E** **Standards**

5 flacons de Standard lyophilisé contenant de la leptine recombinante (1, 10, 25, 50 et 100 ng/ml). Reconstituer chaque Standard à l'aide de 750 µl de Diluant. Attendre 15 minutes à température ambiante après reconstitution, et mélanger doucement au Vortex sans faire de mousse. Après reconstitution, stables 2 mois à -20 °C. Trois cycles seulement de congélation/décongélation ou aliquoter. Conserver sous forme lyophilisée à 2-8 °C.

### **L** **Contrôle 1**

1 flacon de contrôle lyophilisé (sérum humain). Reconstituer à l'aide de 500 µl de Diluant. Attendre 15 minutes à température ambiante après reconstitution, et mélanger doucement au Vortex sans faire de mousse. Après reconstitution, le sérum de contrôle est stable 2 mois à -20 °C. Trois cycles de congélation/décongélation, ou aliquoter. Valeur indiquée sur la fiche de contrôle. Conserver sous forme lyophilisée à 2-8 °C.

### **H** **Contrôle 2**

1 flacon de contrôle lyophilisé (sérum humain). Reconstituer à l'aide de 500 µl de Diluant. Attendre 15 minutes à température ambiante après reconstitution, et mélanger doucement au Vortex sans faire de mousse. Après reconstitution, le sérum de contrôle est stable 2 mois à -20 °C. Trois cycles de congélation/décongélation, ou aliquoter. Valeur indiquée sur la fiche de contrôle. Conserver sous forme lyophilisée à 2-8 °C.

### **2** **Diluant**

1 flacon de 25 ml, prêt à l'emploi. On peut observer une précipitation qui disparaîtra avant utilisation par mélange et/ou chauffage. Conserver à 2-8 °C jusqu'à la date de péremption.

### **3** **Conjugué Anticorps-HRP**

1 flacon de 12 ml, prêt à l'emploi. Anticorps anti-leptine humaine conjugué à de la peroxydase de raifort (HRP). Conserver à 2-8 °C jusqu'à la date de péremption.

### **4** **Substrat TMB**

1 flacon de 12 ml d'un mélange H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Tétraméthylbenzidine stabilisé. Prêt à l'emploi. Conserver à 2-8 °C jusqu'à la date de péremption.

### **5** **Solution de Lavage**

1 flacon de 50 ml. On peut observer une précipitation qui disparaîtra avant utilisation par mélange et/ou chauffage. Compléter à 1000 ml avec de l'eau distillée avant utilisation. La solution diluée est stable 4 semaines à 2-8 °C. Conserver non diluée à 2-8 °C jusqu'à la date de péremption.

**6****Solution d'Arrêt – 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

1 flacon de 12 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2 M, prête à l'emploi. Conserver à 2–8 °C jusqu'à la date de péremption.

**7****Couvercle pour Microplaque**

2 pièces, adhésives.

## Préparation et Stabilité des échantillons de sérum

### Type d'échantillon

On peut utiliser du **Sérum** ou du **Plasma** (on n'a pas trouvé de discordances entre des résultats obtenus sur des échantillons de Sérum, Plasma hépariné ou EDTA) des Cultures cellulaires, de l'Urine et ou de la Salive.

### Stabilité

- Maximum 2 jours à température ambiante
- Maximum 2 ans à -20 °C
- Maximum 5 cycles de congélation/décongélation

### Remarque

La plupart du temps, on pourra doser les échantillons purs (20 µl par puits). Chez des patients dont l'IMC est supérieur à 30, les taux de leptine seront supérieurs à 100 ng/ml: il faudra alors diluer par exemple 1:2 à l'aide du Diluant.

Les concentrations de leptine peuvent être complètement différentes dans des liquides biologiques d'origine humaine, autres que le sérum et les cultures cellulaires.

## Dosage

Tous les dosages (Standards, Contrôles dilués et Echantillons dilués) doivent être faits en duplicatas. On doit les pipeter aussi rapidement que possible (<15 minutes).

Afin d'éviter les interférences dues à des différences de temps d'incubation, le Conjugué HRP, la Solution de Substrat et la Solution d'Arrêt doivent être ajoutés dans les puits de la microplaque dans le même ordre et avec le même intervalle de temps que les échantillons.

Laisser tous les réactifs à température ambiante (20–25 °C) pendant un minimum de 30 minutes.

1. Préparer le support et le nombre nécessaire de barrettes de puits **1**.
2. Identifier les puits de la microplaque pour les Standards, Contrôles et Echantillons.
3. Pipeter 100 µl de Diluant **2** dans tous les puits.
4. Ajouter 20 µl de Diluant en double (Blanc).
5. Pipeter 20 µl de chaque Standard ( **A** à **E** ), Contrôles ( **L** et **H** ) et Echantillons dans les puits correspondants.
6. Couvrir les puits à l'aide d'adhésif et incuber la microplaque 1 heure à température ambiante (20–25 °C) sur un agitateur de plaque (≥350 tr/min).
7. Après incubation, aspirer le contenu des puits, laver à 3 reprises à l'aide de 350 µl de Solution de Lavage (en laissant incuber 15 secondes par cycle) et décanter les puits sur du papier absorbant.
8. Pipeter 100µl de Conjugué Anticorps HRP **3** dans chaque puits.
9. Couvrir les puits à l'aide d'adhésif et incuber la microplaque 30 minutes à température ambiante (20–25 °C) sur un agitateur (≥350 tr/min).
10. Après incubation, laver les puits à 3 reprises à l'aide de la Solution de Lavage, comme indiqué à l'étape 7.
11. Pipeter 100 µl de Solution de Substrat TMB **4** dans chaque puits.
12. Incuber la microplaque dans l'obscurité pendant 15 minutes, à température ambiante (20–25 °C).
13. Ajouter 100 µl de Solution d'Arrêt **6** dans chaque puits.
14. Mesurer la réaction colorée dans les 30 minutes qui suivent à 450 nm (filtre de référence: 590–650 nm).

**Des protocoles sont disponibles pour différents automatés.**

## Calcul des Résultats

La mesure de l'absorption du Blanc doit être inférieure à 0.25 et celle du Standard **E** doit être supérieure à 1.0. Les échantillons pour lesquels on obtient des absorptions supérieures à celle du Standard **E** doivent être re-testés avec une dilution supérieure.

On peut établir une courbe standard en reportant la concentration des standards sur l'axe des x (échelle linéaire) en fonction de leur absorption sur l'axe des y (échelle linéaire). On lira à partir de la courbe standard la concentration de leptine présente dans les échantillons de sérums. Pour le traitement des données, utiliser de préférence un système à 4 paramètres.

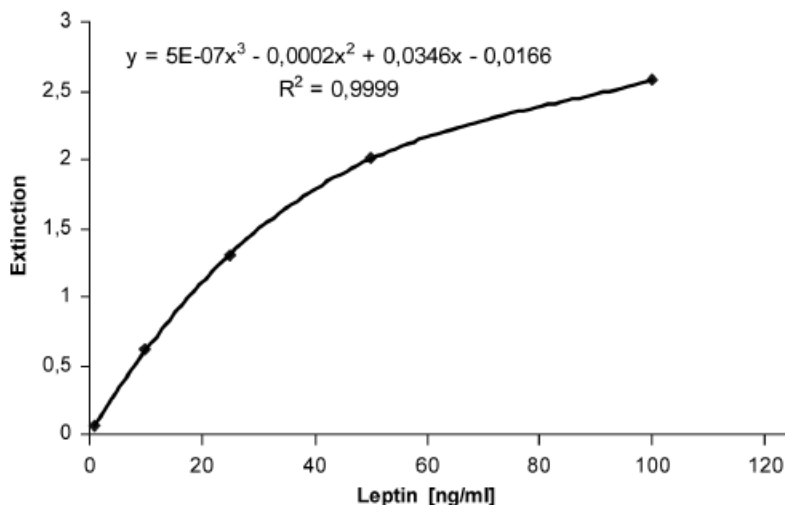
### Exemple de résultats

(Ces données ne sont données qu'à titre d'exemple. Ne pas les utiliser pour le calcul des résultats.)

Standards	Absorption à 450 nm	ng/ml
A	0.083	1
B	0.680	10
C	1.449	25
D	2.165	50
E	2.763	100
L-Contrôle 1	0.875	13.21
H-Contrôle 2	1.551	28.00

Pour chaque dosage, les résultats obtenus pour les contrôles doivent se situer dans la fourchette correspondant à chaque lot.

La fiche de QC donnant les valeurs cibles est fournie dans le kit. Si les valeurs obtenues pour les contrôles ne se trouvent pas dans la fourchette indiquée, les résultats doivent être considérés comme douteux et les échantillons re-dosés.



## Valeurs de Référence

Les taux de leptine sérique sont principalement déterminés par la masse de graisse corporelle, avec des taux bas chez les individus minces, et des taux élevés chez les obèses. De plus, on observe une différence en fonction du sexe, avec un taux plus élevé chez la femme pour un taux de graisse corporelle identique. En outre les taux de leptine sont influencés par le développement pubertaire. On devra donc tenir compte de ces éléments pour donner des valeurs de référence pour la leptine.

Différentes méthodes d'estimation de la graisse corporelle sont disponibles, telles que le calcul de l'Indice de Masse Corporelle [poids (kg) divisé par le carré de la taille (m)] (IMC), la mesure de l'impédance bioélectrique (BIA) ou encore l'absorptiométrie biphotonique à rayons X (DXA). Bien que l'IMC reflète moins la masse de graisse réelle que les autres méthodes plus sophistiquées, telles que le BIA ou le DXA, l'IMC possède un certain nombre d'avantages:

- Il est indépendant des modèles de régression appliqués.
- Il est facile à déterminer, on a seulement besoin de mesurer le poids et la taille.
- Il est disponible la plupart du temps rétrospectivement.
- C'est la mesure la plus précise lors de changement de masse grasseuse à court terme, par exemple durant un jeûne.

C'est pourquoi, les fourchettes suivantes de valeurs attendues ont été rapportées à l'IMC, en tant que variable indépendante majeure, et stratifiées en fonction du sexe et du développement pubertaire (45; voir figures 1–8 et tables 1–9). Après 20 ans, on n'observe pas de relation significative en fonction de l'âge. On peut utiliser ces valeurs attendues ajustées pour le sexe et l'âge pour comparer un taux de leptine mesuré avec un certain IMC à des sujets normaux afin de détecter des déviations pathologiques. Les meilleures équations de régression pour les différents sous-groupes sont des courbes exponentielles de la forme:

$$\text{Leptine} = a \cdot e^{(b \cdot \text{IMC})}$$

Les 5<sup>ème</sup> and 95<sup>ème</sup> percentiles sont donnés par les équations suivantes:

$$\text{Leptine} = a \cdot e^{(b \cdot \text{IMC} - c)}$$

et

$$\text{Leptine} = a \cdot e^{(b \cdot \text{IMC} + c)} \text{ respectivement.}$$

Sur un papier semi-logarithmique (axe y = log leptine), ces courbes donnent des droites. Les valeurs de a, b et c sont données dans la table 1 en fonction du sexe et du stade pubertaire ainsi que pour les adultes. En utilisant ces valeurs, on peut facilement étendre les fourchettes attendues des taux de leptine à des fourchettes d'IMC plus basses ou plus élevées si nécessaire.

### Exemple

Le 50<sup>ème</sup> percentile chez les garçons aux Stades de Tanner 3 et 4 est donné par l'équation:

$$\text{Leptine} = 0.0181 \cdot e^{(0.2067 \cdot \text{IMC})}$$

Le 5<sup>ème</sup> percentile est donné par:  $\text{Leptine} = 0.0181 \cdot e^{(0.2067 \cdot \text{IMC} - 1.1919)}$

Et le 95<sup>ème</sup> percentile est donné par:  $\text{Leptine} = 0.0181 \cdot e^{(0.2067 \cdot \text{IMC} + 1.1919)}$

Sur un tracé semi-logarithmique, ces lignes sont parallèles à distance égale du 50<sup>ème</sup> percentile.

### Calcul des scores de déviation standard (SDS; Z-scores)

Une méthode pratique pour détecter une déviation du taux de leptine mesuré par rapport à la fourchette de référence correspondante consiste à calculer sa déviation standard en rapportant le taux de leptine pour l'IMC du patient à la valeur moyenne de leptine du groupe d'âge et de sexe correspondant et en exprimant sa déviation par x-fois la déviation standard. On peut considérer cette méthode comme étant une normalisation par rapport à la cohorte normale de référence. Ainsi les valeurs de leptine peuvent être ajustées en fonction de l'IMC, du sexe et du stade/âge pubertaire (c'est-à-dire que l'influence du sexe, de l'âge et de l'IMC est éliminée) et peuvent être regroupées pour des analyses ultérieures.

Compte tenu de la répartition logarithmique des taux de leptine, on peut calculer la SDS de la leptine de la façon suivante:

$$\text{Leptine SDS} = \frac{(\ln(\text{leptine}) - \ln(a) - b \cdot \text{IMC})}{d}$$

Dans cette équation, ln représente le logarithme naturel (se reportant à la base e). Les facteurs a, b et d sont donnés dans la table 1 selon le sexe et le stade/âge pubertaire.

#### Exemple:

Un garçon au stade de Tanner 3, IMC = 25 kg/m<sup>2</sup>, Concentration mesurée de leptine = 5 ng/ml.

$$\text{Leptine SDS} = \frac{(\ln(5) - \ln(0.0181) - 0.2067 \cdot 25)}{0.6850} = 0.66$$

**Facteurs a, b, c et d pour le calcul des fourchettes de référence de la leptine et leptine SDS basés sur l'IMC. Les groupes d'individus normaux ont été stratifiés en fonction du sexe et du stade/âge pubertaire. TS= Stade de Tanner, n= nombre d'individus, a,b,c et d = facteurs tels que définis dans le texte.**

Cohorte	n	a	b	c	d
<b>Garçons</b>					
<b>TS 1&amp;2</b>	136	0.0146	0.2706	0.8821	0.5379
<b>TS 3&amp;4</b>	50	0.0181	0.2067	1.1919	0.6850
<b>TS 5</b>	112	0.0316	0.1462	1.0821	0.6558
<b>Adultes</b>	380	0.0130	0.2200	1.1053	0.6740
<b>Filles</b>					
<b>TS 1&amp;2</b>	136	0.0422	0.2499	0.7849	0.4786
<b>TS 3&amp;4</b>	43	0.0543	0.2357	0.5745	0.3379
<b>TS 5</b>	157	0.2550	0.1508	0.7053	0.4301
<b>Adultes</b>	587	0.3042	0.1467	0.8548	0.5212

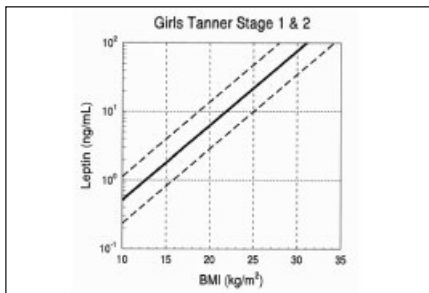
Table 1

Percentile (µg/l)					
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	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				

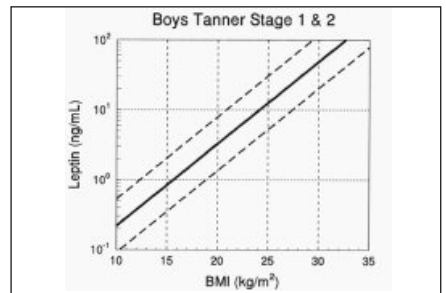
**Table 2:** Filles Stades de Tanner 1 et 2

Percentile (µg/l)					
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	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				

**Table 3:** Garçons Stades de Tanner 1 et 2



**Figure 1:** Fourchette de référence des taux de sérum humain rapportés à l'IMC. Filles Stades de Tanner 1 & 2 (se reporter au texte pour les détails).



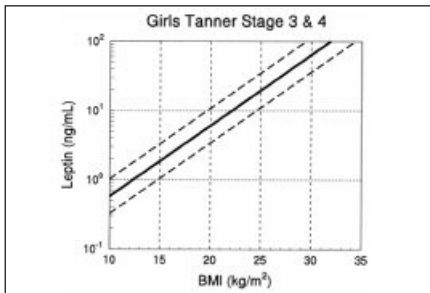
**Figure 2:** Fourchette de référence des taux de sérum humain rapportés à l'IMC. Garçons Stades de Tanner 1 & 2 (se reporter au texte pour les détails).

Percentile (µg/l)					
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	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				

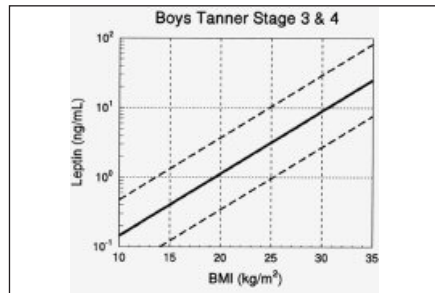
**Table 4:** Filles Stades de Tanner 3 et 4

Percentile (µg/l)					
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	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		

**Table 5:** Garçons Stades de Tanner 3 et 4



**Figure 3:** Fourchette de référence des taux de sérum humain rapportés à l'IMC. Filles Stades de Tanner 3 & 4 (se reporter au texte pour les détails).



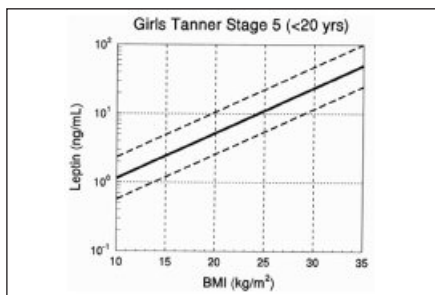
**Figure 4:** Fourchette de référence des taux de sérum humain rapportés à l'IMC. Garçons Stades de Tanner 3 & 4 (se reporter au texte pour les détails).

Percentile ( $\mu\text{g/l}$ )					
IMC ( $\text{kg/m}^2$ )	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		

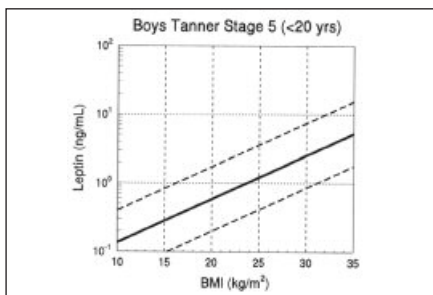
**Table 6:** Filles Stade de Tanner 5

Percentile ( $\mu\text{g/l}$ )					
IMC ( $\text{kg/m}^2$ )	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

**Table 7:** Garçons Stade de Tanner 5



**Figure 5:** Fourchette de référence des taux de sérum humain rapportés à l'IMC. Filles Stade de Tanner 5 (se reporter au texte pour les détails).



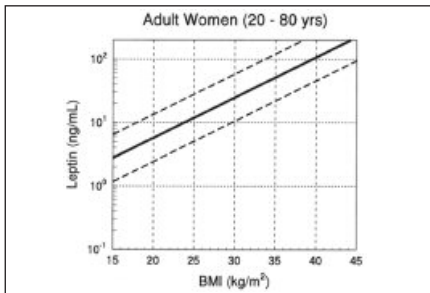
**Figure 6:** Fourchette de référence des taux de sérum humain rapportés à l'IMC. Garçons Stade de Tanner 5 (se reporter au texte pour les détails).

Percentile (µg/l)					
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	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		

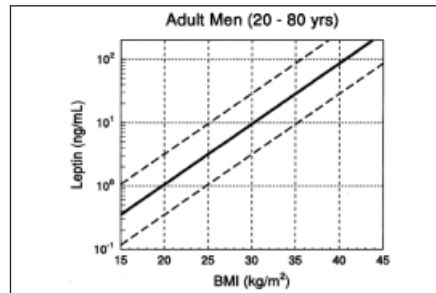
**Table 8:** Femmes adultes

Percentile (µg/l)					
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	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		

**Table 9:** Hommes adultes



**Figure 7:** Fourchette de référence des taux de sérum humain rapportés à l'IMC. Femmes adultes (se reporter au texte pour les détails).



**Figure 8:** Fourchette de référence des taux de sérum humain rapportés à l'IMC. Hommes adultes (se reporter au texte pour les détails).

## Performances du Test

### Calibration

Les standards du kit ont été préparés à partir de Leptine recombinante, calibrée contre le WHO international standard NIBSC 97/594.

### Précision

#### (Inter essais)

Echantillon	Valeur Moyenne (ng/ml)	Déviati on Standard (ng/ml)	CV (%)
Echantillon 1	3.95	0.32	8.3
Echantillon 2	6.51	0.44	6.8
Echantillon 3	33.16	2.56	7.7

#### (Intra essai)

Echantillon	Valeur Moyenne (ng/ml)	Déviati on Standard (ng/ml)	CV (%)
Echantillon 1	4.97	0.27	5.4
Echantillon 2	37.11	2.55	6.8

### Limite de Détection

La sensibilité analytique du dosage est égale à **0.2 ng/ml** (2x DS du Standard zéro).

### Test de Récupération

On a obtenu un taux de **récupération** moyen de leptine recombinante dans différents sérums humains égal à **102 %** de la valeur attendue.

### Test de Dilution

Dilution	Echantillon 1 (ng/ml)	Dilution	Echantillon 2 (ng/ml)
1:1	35.2	1:1	17.8
1:2	35.0	1:2	17.3
1:5	38.6	1:5	18.0
1:10	35.5	1:10	17.7
1:20	40.6	1:20	15.9
VM/1 DS/CV %	36.96/2.5/6.8	VM/1 DS/CV %	17.4/0.86/4.97

**VM** = Valeur Moyenne, **DS** = Déviati on Standard

### Interférence

On a surchargé des échantillons de sérums à l'aide de substances potentiellement interférentes, à différentes concentrations. On a ensuite mesuré les concentrations de Leptine et comparé celles-ci aux concentrations de Leptine des échantillons avant surcharge. Aucune des substances testées n'interfère dans le dosage de façon significative.

%	Triglycérides 100 mg/ml	Bilirubine 100 µg/ml	Hémoglobine 100 µg/ml
Echantillon 1	95	101	94
Echantillon 2	107	105	105
Echantillon 3	111	101	101

### Réactions croisées

Ce dosage est spécifique de la leptine humaine. Il y a une faible réaction croisée chez les espèces suivantes: souris, rat, cheval, mouton et poulet. On n'a pas observé de réaction croisée avec d'autres protéines telles que l'insuline et l'IGF-I.

### Remarque

Ces données ne sont données qu'à titre d'exemple. Il est préférable que chaque laboratoire utilise ses propres contrôles, et établisse ses propres valeurs normales et pathologiques de Leptine.

# TECO® Leptine Humaine

## Résumé du Dosage

- Amener les échantillons et les réactifs à température ambiante. Bien mélanger les échantillons.
- Standards **A** à **E** : Reconstituer chaque flacon à l'aide de 750 µl de Diluant **2**.
- Contrôles **H** et **L** : Reconstituer chaque flacon à l'aide de 500 µl de Diluant **2**.
- Solution de Lavage **5** : Diluer au 1:20 avec de l'eau distillée.

Préparer le nombre nécessaire de barrettes de puits **1**

Pipeter **100 µl** de Diluant **2** dans les puits

Ajouter **20 µl** de Diluant **2** en double dans les puits (Blanc)

Pipeter **20 µl** de Standards **A** à **E**, de Contrôles **L** et **H** et d'Echantillons

Couvrir la microplaque et incuber **60 min** à 20–25 °C sur un agitateur ≥350 tr/min

Aspirer et laver **3 x** avec **350 µl** de Solution de Lavage, aspirer et décanter les puits sur du papier absorbant

Ajouter **100 µl** de Conjugué Anticorps HRP **3** dans chaque puits

Couvrir la microplaque et incuber **30 min** à 20–25 °C sur un agitateur à ≥350 tr/min

Aspirer, laver **3 x** avec **350 µl** de Solution de Lavage, aspirer et décanter les puits sur du papier absorbant

Ajouter **100 µl** de Substrat TMB **4** dans chaque puits

Incuber **15 min** à 20–25 °C à l'**obscurité**

Ajouter **100 µl** de Solution d'Arrêt **6** dans chaque puits

**Mesurer l'absorption à 450 nm dans les 30 minutes**

Logiciel de quantification, 4-paramètres:

$$y = (A-D)/(1+(x/C)^B)+D$$

Filtre de référence 590-650 nm



Lire le Mode d'Emploi complet avant d'utiliser le Résumé du Dosage