

HUMAN LEPTIN RIA

Dosage quantitatif de la Leptine humaine dans le sérum, le plasma humain ou un milieu de culture.

125 tests - Cat. N°HL-81HK

1 Réactif A :	Tampon de dosage
1 Réactif B :	Anticorps anti-leptine humaine
1 Réactif C :	Leptine humaine marquée à l'iode 125 Activité totale : <56 kBq (1,5 µCi)
1 Réactif D :	Diluant pour traceur
8 Réactifs E :	Standards
2 Réactifs F :	Contrôles 1 et 2
1 Réactif G :	Réactif précipitant

USAGE IN VITRO

Stockage à 2 - 8°C
Attention : radioactif

INTRODUCTION

La leptine est un facteur de signal codé par le gène de l'obésité dans le tissu adipeux. L'administration de leptine recombinante diminue la prise de nourriture, augmente les dépenses d'énergie et entraîne une augmentation des dépenses d'énergie et une perte de poids.^{1,2} Ce dosage de leptine humaine par radioimmunologie³ a été développé pour permettre de doser la leptine dans le sérum ou le plasma humains ainsi que dans les milieux de culture. C'est un dosage entièrement homologué dans la mesure où l'anticorps a été développé contre de la leptine hautement purifiée et que les standards et le traceur ont été préparés avec de la leptine humaine.

PRINCIPE DU DOSAGE

Dans un dosage radioimmunologique, une quantité fixe d'antigène marqué est incubée avec une dilution constante de l'antisérum calculée de telle sorte que le nombre de sites de liaison de l'antigène est limité, par exemple, seuls 50% du traceur seront liés à l'anticorps. Si de l'antigène non marqué est ajouté dans le milieu, il y a compétition entre le traceur marqué et l'antigène non marqué pour un nombre limité et constant de sites de liaison sur l'anticorps. De plus, la quantité de traceur lié à l'anticorps diminue quand la concentration de l'antigène non marqué augmente. On peut effectuer la mesure après avoir effectué la séparation de l'anticorps lié du traceur libre et après avoir compté la fraction libre, la fraction liée ou les deux.

On prépare une courbe standard à l'aide de quantités croissantes d'antigène non marqué et on calcule à partir de cette courbe la concentration des échantillons inconnus. On a ainsi les quatre conditions de base d'un dosage radioimmunologique : un antisérum spécifique de l'antigène à doser, l'antigène marqué par une substance radioactive, une méthode de séparation de l'antigène sous forme liée à l'antisérum, de l'antigène sous forme libre, et finalement l'instrument qui permet de compter la radioactivité.

Le dosage de Leptine humaine de LINCO Research utilise de la leptine humaine marquée à l'iode 125 et un antisérum anti-leptine humaine, afin de mesurer le taux de leptine dans le sérum, le plasma et les milieux de culture au moyen d'une technique de dosage par double anticorps/PEG.

MATERIEL

Matériel fourni, suffisant pour effectuer 125 dosages :

1.Réactif A – Tampon de dosage

1 flacon contenant 20 ml de tampon phosphate 0,05M, pH 7,4, avec de l'EDTA 0,025 M, de la BSA à 1%, du Triton X-100 à 0,05% et de l'azide de sodium à 0,09%. Prêt à l'emploi.

2.Réactif B - Solution d'antisérum

1 flacon contenant 13 ml d'antisérum de lapin anti-leptine humaine avec de la BSA à 1%, dans du tampon de dosage. Prêt à l'emploi.

3.Réactif C – ¹²⁵I Leptine humaine

1 flacon contenant 13,5 ml après reconstitution d'une solution de Leptine humaine marquée à l'iode 125, purifiée par HPLC et de la BSA à 1%. Sous forme lyophilisée.

Chaque flacon a une activité < 56 kBq (1,5 µCi).

4.Réactif D – Diluant pour traceur

1 flacon contenant 27 ml de tampon de dosage avec des IgG de lapin normal et de la BSA à 1%.

5.Réactifs E - Standards

8 flacons contenant chacun 1 ml de Leptine humaine recombinante purifiée dans du tampon de dosage contenant de la BSA à 1%, aux concentrations suivantes : 0,5 – 1 – 2 – 5 – 10 – 20 – 50 et 100 ng/ml.

6.Réactifs F – Contrôles 1 et 2

2 flacons contenant chacun 2 ml de Leptine humaine recombinante purifiée dans du tampon de dosage qui contient de la BSA à 1%.

7.Réactif G – Réactif précipitant

1 flacon contenant 130 ml d'anticorps de chèvre anti-lapin en solution dans du tampon phosphate 0,05 M, qui contient du PEG à 3%, du Triton X-100 à 0,05%, de la BSA à 1%, de l'EDTA à 0,025 M et de l'azide de sodium à 0,09%.

CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS

Conserver tous les réactifs à 2-8°C pour une conservation à court terme. Pour une conservation prolongée (> à 2 semaines), conserver à -20°C. Eviter les congélations/décongélations répétées (>5 fois). Se référer à la date d'expiration figurant sur l'étiquette pour connaître la date d'expiration pour une conservation à -20°C. Ne pas mélanger les réactifs qui proviennent de différentes trousse, sauf s'ils proviennent du même lot.

REGLES DE BASE DE RADIOPROTECTION

1. Les réactifs de cette trousse sont destinés exclusivement à l'analyse in vitro et ne doivent en aucun cas être administrés à l'homme ou à l'animal.
2. Le matériel radioactif de cette trousse doit être manipulé en respectant les règles de sécurité concernant l'emploi des radionucléides en source non scellées.
3. Toute manipulation de substances radioactives doit s'effectuer dans une zone contrôlée, conformément à la réglementation en vigueur.
4. Ne pas pipeter les solutions radioactives à la bouche.
5. Ne pas manger, boire ou fumer en zone contrôlée.
6. Eviter tout contact direct avec les produits radioactifs. Utiliser des blouses et des gants de protection.
7. Tout déchet radioactif solide ou liquide sera éliminé selon la réglementation en vigueur.
8. Dans le cas de contamination ou de perte de substance radioactive, observer les procédures établies.

ATTENTION : Les réactifs de cette trousse contiennent de l'azide de sodium. Eviter toute contamination de la peau et des muqueuses.

Matériel nécessaire mais non fourni :

1. Tubes en verre borosilicaté, à usage unique, 12 x 75 mm (il est possible d'utiliser des tubes de polypropylène ou de polystyrène si l'utilisateur estime que le précipité est suffisamment stable)
2. Pipettes de précision de 100 µl.
3. Distributeur automatique : 100 µl et 1,0 ml.
4. Papier absorbant
5. Vortex
6. Réfrigérateur
7. Compteur à scintillations gamma

PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

On utilisera un maximum de 100 µl de sérum ou de plasma par dosage. La plupart du temps, 50 µl par tube suffisent. On peut également utiliser des cultures de tissu ou encore d'autres milieux. Il est préférable de prendre des précautions si on utilise l'héparine comme anticoagulant, car sa présence en excès provoque une augmentation des taux. ⁴ Il est préférable de ne pas utiliser plus de 10 UI d'héparine par ml de sang prélevé. On conservera les échantillons à 4°C, si on doit les doser dans les 24 heures. Pour un stockage prolongé, il est préférable de les stocker à -20°C. Eviter les congélations/décongélations répétées. (> 5 cycles). Eviter d'utiliser des échantillons hémolysés ou lipidiques.

DOSAGE

Il est important de suivre ce protocole et d'être précis dans les étapes de pipetage.

Mise en place du dosage :

1. Pipeter 300 μ l de tampon de dosage dans les tubes 3 et 4 correspondant à la liaison non spécifique (LNS), 200 μ l dans les tubes 5 et 6 correspondant au B_0 et 100 μ l dans tous les autres tubes.
2. Pipeter 100 μ l de standard et de contrôles en double (Voir le schéma du dosage).
3. Pipeter 100 μ l d'échantillon en double. (**Remarque** : On peut utiliser des volumes plus faibles d'échantillon lorsque l'on s'attend à avoir des taux de leptine élevés ou lorsque le volume de l'échantillon est limité. On ajoutera la quantité de tampon de dosage nécessaire pour compenser la différence de volume. (Par exemple si on utilise 50 μ l d'échantillon, on ajoutera 50 μ l de tampon de dosage). Se reporter à la section calcul des résultats pour modifier celui-ci.
4. Ajouter 100 μ l de Leptine humaine marquée à l'iode 125 dans tous les tubes.
5. Ajouter 100 μ l d'anticorps anti-Leptine humaine dans tous les tubes à l'exception des tubes correspondant à l'activité totale (1 et 2) et au LNS (3 et 4)
6. Mélanger au vortex, couvrir et laisser incuber pendant 20 à 24 heures à 4°C.

Le jour suivant :

7. Ajouter 1,0 ml de réactif précipitant froid (4°C) à tous les tubes à l'exception de ceux qui correspondent à l'activité totale.
8. Mélange au vortex et laisser incuber 20 minutes à 4°C.

9. Centrifuger à 4°C tous les tubes à l'exception de ceux qui correspondent à l'activité totale pendant 20 minutes à 2000 – 3000 x g. Remarque : Si on utilise une vitesse inférieure à 2000 xg, ou si on a observé des précipités de mauvaise qualité au cours des dosages précédents, on augmentera le temps de centrifugation afin d'obtenir des précipités de bonne qualité (par exemple 40 minutes).

Conversion des tr/min. en xg :

$$xg = (1,11 \times 10^{-5}) (r) (tr/min.)^2$$

r = distance radiale en cm (depuis l'axe de rotation jusqu'au fond des tubes)

tr/min. = vitesse du rotor

10. Décanter immédiatement le surnageant de tous les tubes à l'exception des tubes correspondant à l'activité totale (tubes 1 et 2), laisser égoutter pendant au moins 15 à 60 secondes, et retirer l'excès de liquide au bord des tubes. Remarque : Ne retourner les tubes qu'une seule fois. Les précipités sont fragiles et pourraient glisser.
11. Compter tous les tubes dans un compteur à scintillations gamma pendant 1 minute. Calculer la concentration en leptine humaine des échantillons en utilisant une procédure de calcul automatique.

Schéma de dosage de la Leptine

Tube	Nature	Tampon de dosage	Standard/ Contrôle/ Echantillon	Traceur	Anticorps anti-leptine	Incubation	Réactif précipitant	Centrif.	Compter
1,2	Activ.Totale	-	-	100 µl	-	-	-	-	1 min.
3,4	LNS	300 µl	-		-	20-24 heures à 4°C	1 ml 20min à 4°C	20 min. à 2000 x g	
5,6	Standard 0	200 µl	-		100 µl			à	
7,8	Standard 0.5	100 µl	100 µl					2 - 8°C	
9,10	Standard 1								
11,12	Standard 2								
13,14	Standard 5								
15,16	Standard 10								
17,18	Standard 20								
19,20	Standard 50				Vortexer			Aspirer	
21,22	Standard 100				tous les tubes			ou	
23,24	Contrôle 1							Décanter	
25,26	Contrôle 2								
27,28	Echantil. 1								
29,30	Echantil. 2								
31,...	etc...	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

CALCULS DES RESULTATS

EXPLICATION

Les calculs des taux de Leptine humaine peuvent être faits automatiquement par la plupart des compteurs gamma qui possèdent des capacités de traitement des données ou par un traitement indépendant des données par un logiciel disponible dans le commerce. Choisir un système à 4 paramètres ou un log/logit pour le traitement mathématique des données. (**Remarque** : S'assurer que le LNS est bien soustrait de la moyenne des cpm obtenus pour chaque duplicate à l'exception de l'activité totale, avant de finaliser les calculs).

CALCUL MANUEL

1. Calculer la moyenne des coups par minute (CPM) obtenus pour les tubes correspondant à AT (tubes 1 et 2), LNS (tubes 3 et 4), Maximum de liaison (tubes 5 et 6), standards, contrôles et échantillons de malade.
2. Soustraire la moyenne des coups correspondant aux tubes LNS de la moyenne des coups obtenus pour les autres tubes (à l'exception de AT), pour obtenir la moyenne des coups corrigée.
3. Calculer le pourcentage maximum de liaison ($B/T\%$), en divisant les CPM corrigés correspondant au standard zéro (B_0) par les CPM moyens correspondant à l'activité totale (AT). Ce Pourcentage devrait être compris entre 35 et 60%.
4. Calculer le pourcentage de liaison ($B/B_0 \times 100$) correspondant à chaque standard et chaque échantillon, en divisant la moyenne des coups corrigés de chacun des standards par la moyenne corrigée des coups correspondant au maximum de liaison (standard zéro).
5. Tracer la courbe standard en reportant le pourcentage de B/B_0 correspondant à chaque standard en ordonnée, et le logarithme de la concentration de chacun des standards en abscisse (l'utilisation d'un papier log-log permet d'obtenir une courbe presque droite)
6. Construire la courbe standard en joignant les points obtenus.

7. Calculer la concentration en ng/ml de Leptine humaine des échantillons inconnus et des contrôles par interpolation avec la courbe standard.

Remarque : Quand le volume utilisé est différent de 100 μ l, une correction mathématique sera faite pour tenir compte du facteur de dilution (ex : si on a utilisé 50 μ l, on multipliera les résultats par un facteur 2)

VALEURS ATTENDUES

Valeurs observées chez des individus à jeun :

Les taux de Leptine sont directement corrélés avec le degré d'adiposité.

Moyenne des taux de Leptine (pour un BMI {Body Mass Index ou Index de Masse Corporelle} de 18 à 25) :

Hommes minces : $3,8 \pm 1,8$ ng/ml

Femmes minces : $7,4 \pm 3,7$ ng/ml

Les taux augmentent 2,5 fois plus vite chez les femmes que chez les hommes par unité de BMI.³

LIMITES DU DOSAGE

1. Il faudra éliminer le dosage si l'un des 2 contrôles est en dehors des 2 déviations standards.
2. Si les CV observés entre les duplicates d'un même échantillon sont supérieurs à 10 %, il faudra redoser l'échantillon.
3. La limite de sensibilité du dosage de la Leptine humaine est égale à 0,5 ng/ml (pour un échantillon de 100 μ l)
4. La limite de linéarité du dosage de la Leptine humaine est de 100 ng/ml (pour un échantillon de 100 μ l). Tout résultat supérieur à 100 ng/ml devra être redosé après dilution à l'aide du diluant.

CARACTERISTIQUES DU DOSAGE

SENSIBILITÉ :

La plus petite quantité de Leptine qui puisse être détectée dans ce dosage est égale à 0,5 ng/ml quand on utilise un prélèvement de 100 µl.

PERFORMANCES :

ED₈₀ = 1,3 ± 0,2 ng/ml

ED₅₀ = 6,0 ± 1,0 ng/ml

ED₂₀ = 29,3 ± 5,6 ng/ml

SPÉCIFICITÉ :

La spécificité permet de connaître la capacité du test à mesurer l'analyte de façon sélective en présence d'autres composants présents dans la matrice de l'échantillon.

Leptine humaine	100 %
Leptine de rat	<0,2 %
Leptine de souris	<0,2%
Insuline humaine	*
Proinsuline humaine	*
Insuline de rat	*
C-Peptide humain	*
Glucagon	*
IGF-I	*

* Indétectable

PRECISION

Variation Inter et Intra - essai :

Echantillon	Moyenne ng/ml	CV % Intra	CV % Inter
1	4,9	8,3	6,2
2	7,2	4,6	5,0
3	10,4	3,9	4,7
4	15,7	4,7	3,0
5	25,6	3,4	3,6

Les calculs des variations intra et inter essais ont été réalisés sur 5 sérums humains contenant différentes concentrations de Leptine. Ces sérums ont été dosés à 5 reprises dans 5 dosages.

TEST DE SURCHARGE

Des quantités variables de Leptine humaine ont été ajoutées à 5 sérums humains. Les moyennes des duplicats de chaque sérum dosé dans 5 séries différentes ont été reportées dans le tableau ci-dessous.

Echantillon	Leptine ajoutée ng/ml	Leptine mesurée ng/ml	Leptine attendue ng/ml	Récupération %
1	0	4,9	-	-
2	2	7,2	6,9	104
3	5	10,4	9,9	105
4	10	15,7	14,9	105
5	20	25,6	24,9	103

TEST DE PARALLÉLISME

On a dilué des pools de sérums humains contenant des concentrations de Leptine variables selon les volumes indiqués. Des facteurs de dilution de 1 – 1,33 – 2 et 4, représentant 100 µl, 75 µl, 50 µl et 25 µl. ont été appliqués pour calculer les concentrations observées. On a reporté dans le tableau ci-dessous la moyenne des taux de Leptine et le pourcentage de récupération par rapport à la valeur attendue pour chacun des sérums dosés dans 5 dosages différents.

Echantillon	Volume de l'échantillon µl	Leptine mesurée ng/ml	Leptine attendue ng/ml	Récupération %
1	100	45,7	45,7	100
	75	45,3		99
	50	45,6		100
	25	46,1		101
2	100	31,2	31,2	100
	75	31,2		100
	50	31,3		100
	25	31,0		99
3	100	13,8	13,8	100
	75	13,1		95
	50	12,5		91
	25	12,1		88
4	100	9,1	9,1	100
	75	8,6		95
	50	8,7		96
	25	8,4		92

Exemple de résultats de Leptine

N° tube	Nom	CPM	CPM moyens	CPM corrigés	B/Bo %	Résultats en ng/ml
1	Activité totale	17236	16956			
2		16675				
3	LNS	445	466			
4		487				
5	Max.liaison Standard D	7777	7747	7281	100	
6		7716				
7	Standard 0,55 ng/ml	7087	7098	6632	91,1	
8		7109				
9	Standard 1 ng/ml	6678	6564	6098	83,8	
10		6450				
11	Standard 2 ng/ml	5817	5856	5390	74,0	
12		5894				
13	Standard 5 ng/ml	4494	4433	3967	54,5	
14		4371				
15	Standard 10 ng/ml	3339	3315	2849	39,1	
16		3290				
17	Standard 20 ng/ml	2501	2441	1975	27,1	
18		2381				
19	Standard 50 ng/ml	1543	1577	1111	15,3	
20		1610				
21	Standard 100 ng/ml	1027	1033	567	7,8	
22		1039				
23	Contrôle 1	5733	5655	5189	71,3	2,2
24		5576				
25	Contrôle 2	2962	2949	2483	34,1	13,5
26		2936				
27	Echantillon	-	-	-	-	-

Les résultats présentés ici ne sont que des exemples, et ne peuvent en aucun cas être utilisés comme courbe standard.

CONTROLE DE QUALITE

Les bonnes pratiques de laboratoire recommandent que de contrôles soient inclus dans chaque série de dosages afin d'en vérifier les performances. Deux sérums de contrôles sont inclus dans la trousse dans ce but. Il est nécessaire de doser ces contrôles ainsi que d'autres propres au laboratoire de façon régulière, afin d'établir des valeurs moyennes et des fourchettes de valeurs acceptables. La reproductibilité des paramètres de la courbe standard et des valeurs des contrôles doit se situer dans un intervalle de valeurs défini par le laboratoire.

1. Quand les 2 contrôles sont dans la fourchette des ± 2 DS :
Dosage OK
2. L'un des contrôles est en dehors de la fourchette :
Vérifier les points suivants.
 - a) Erreurs de calcul.
 - b) Duplicates des standards et des contrôles
 - c) Vérification des solutions de réactifs
 - d) Vérification du compteur gamma

BIBLIOGRAPHIE

1. Pellemounter M.A, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. 269 : 540-543, 1995.
2. Maffei M. et al. Leptin levels in human and rodent : measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Med*. Vol 1, 11 : 1155-1611, 1995.
3. Ma, Zhongmin et al. Radioimmunoassay of leptin in human plasma. *Clinical Chemistry*. 42 : 942-946, June 1996.
4. Thorell J.I. *Scand. J. Clin. Invest.* 31 : 187, 1973.
5. Feldman H, and Rodbard D. « Mathematical Theory of Radioimmunoassay », in W.D. Odell and Doughaday, W.H. (Ed), *Principles of Competitive Protein-Binding Assays*. Philadelphia : J.B. Leppincott Company ; pp 158-203, 1971.
6. Westgard J.O. et al. A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. *Clin. Chem.* 27 : 493-501, 1981.

Ce réactif a fait l'objet d'un enregistrement auprès de l'Agence du Médicament. Le numéro d'enregistrement figure sur l'emballage du réactif.

Fabriqué par :

LINCO Research, Inc
6, Research Park Drive
St. Charles, Missouri
63304 – USA