



Direct Saliva MELATONIN

ELISA

EK-DSM 96 tests

Revision date: 2012-11-29

ENGLISH

INTENDED USE

The BÜHLMANN Direct Saliva Melatonin ELISA (EK-DSM) is intended for highly sensitive, quantitative determination of melatonin in human saliva (1-4).

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The BÜHLMANN Direct Saliva Melatonin ELISA is a competitive immunoassay using a capture antibody (Ab) technique. The polyclonal Kennaway G280 anti-melatonin antibody (5,6) has been coated onto the microtiter plate, provided in the kit. After the first 16-20 hours over night incubation, melatonin present in the pre-treated saliva and controls as well as in the calibrators, compete with biotinylated melatonin during a second 3 hours incubation for the binding sites of this highly specific antibody. After washing, the enzyme label, streptavidin conjugated to horseradish peroxidase (HRP) is added, which binds during a third 60 minutes incubation step to the melatonin-biotin-antibody complexes captured on the coated wells. Unbound enzyme label is then removed by a second washing step and TMB substrate (tetramethylbenzidine) is added to the wells. In a fourth 30 minutes incubation step, a chromophore is formed in inverse proportion to the amount of melatonin present in the sample. The color turns from blue to yellow after the addition of an acidic stop solution and can be measured at 450 nm.

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantities	Code	Reconstitution
Pretreatment Solution	1 vial 5 ml	B-EKDSM-PRS	Ready to use corrosive
Neutralizing Solution	1 vial 5 ml	B-EKDSM-NS	Ready to use irritant
Microtiter Plate precoated with G280 anti-melatonin Ab	12x8 wells	B-EKDSM-MP	Wash 2x before use
Plate Sealer	3 pieces		
Wash Buffer Concentrate (10x) with preservatives	1 bottle 100 ml	B-EKDSM-WB	Dilute with 900 ml deionized water
Blanking Reagent¹⁾ lyophilized	1 vial 1 ml	B-EKDSM-BR	Dissolve in 1ml Incubation Buffer
Incubation Buffer (Zero Calibrator) melatonin-free buffer	1 vial 12 ml	B-EKDSM-IB	Ready to use
Calibrators²⁾ lyophilized; do not pretreat	5 vials lyoph.	B-EKDSM-CASET	Reconstitute with 1ml Incubation Buffer
Control low / high³⁾ for pretreatment see page 3	2 vials lyophl	B-EKDSM-CONSET	Reconstitute with 1ml Incubation Buffer
Biotin Conjugate	1 vial 5.5 ml	B-EKDSM-BC	Ready to use
Enzyme Label Streptavidin conjugated to HRP	1 vial 11 ml	B-EKDSM-EL	Ready to use
TMB Substrate buffered with citrate and H ₂ O ₂	1 vial 11 ml	B-TMB	Ready to use
Stop Solution 0.25 M sulfuric acid	1 vial 11 ml	B-ST5	Ready to use

Table 1

¹⁾ The Blanking reagent contains a saturated melatonin solution. Prevent any contamination of other kit reagents.

²⁾ The Calibrators A, B, C, D and E contain the following melatonin concentration: 0.48, 1.2, 3.2, 8.0 and 20 pg/ml which are corrected for the 20% sample dilution during pretreatment and therefore, labeled with 0.6, 1.5, 4.0, 10, and 25 pg/ml of melatonin, respectively.

³⁾ Lot specific amount of melatonin see data sheet added to the kit.

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

Unopened Reagents	
Store at 2-8°C until expiration date. Do not use past expiration date.	
Opened / Reconstituted Reagents	
Microtiter Plate	Return unused strips immediately to the plastic pouch containing the desiccant pack and reseal along the entire edge of zip-seal. Store for up to 2 months at 2-8°C
Pretreatment Reagent	Store at 2-8°C until expiration date printed on the labels.
Neutralizing Solution	
Incubation Buffer	
Wash Buffer diluted	Store at 2-8°C up to 6 months
Blanking Reagent	Stable at 2-8°C up to 4 months.
Calibrators	
Controls	
Biotin Conjugate	Store at 2-8°C until expiration date printed on the labels.
Enzyme Label	
TMB Substrate	
Stop Solution	

Table 2

PRECAUTIONS

SAFETY PRECAUTIONS

- The microtiter plate of this test (B-EKDSM-MP) contain components of human origin. Although tested and found negative for HBV surface antigen, HCV and HIV1/2 antibodies, the reagents should be handled as if capable of transmitting infections and should be handled in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions.

- Pretreatment/Neutralizing Solution, Substrate and Stop Solution:** The Pretreatment Solution (B-EKDSM-PRS) contains sodium hydroxide (NaOH) and the Neutralizing solution (B-EKDSM-NS) contains hydrochloric acid (HCl). Substrate and Stop Solution: The Substrate TMB (B-TMB) contains Tetramethylbenzidine, hydrogen peroxide (H₂O₂) and dimethylformamide. The Stop Solution (B-ST5) contains sulfuric acid (0.25 M). Each of those reagents is irritant to eyes, skin and mucous membranes. Avoid contact with Eyes, skin and cloths. Wear suitable protective clothing, gloves and eye protection. After contact with eyes or skin, wash immediately with plenty of water.

- Unused solution should be disposed of according to local State and Federal regulations.

TECHNICAL PRECAUTIONS

Kit components

- Residues in the microtiter plate** wells result from the production process. They are removed in the washing step (Assay procedure step 2) and do not affect the results.
- Read carefully the instructions prior to carrying out the test. Test performance will be adversely affected, if reagents are incorrectly diluted, modified or stored under conditions other than those as detailed in this instruction for use.
- Components must not be used after the expiry date printed on the labels.
- Do not mix different lots of reagents.
- Every effort should be made to ensure that no cross contamination occurs between reagents, samples or between wells.
- Let the reagents adjust to reach room temperature. Mix well (vortex) the reagents before use.
- Microwells cannot be re-used.

Assay Procedure

- The blanking reagent contains a saturated melatonin solution. Avoid any contamination of other reagents of this kit. Change disposable tips after each pipetting step.
- The assay procedure has been optimized for Sleep Check application. Therefore Blank reagent and Calibrators are assayed in duplicates, whereas controls and patient samples are measured in single determinations. This approach allows you to test 16 individual profiles (5 points) per microtiter plate. For applications other than Sleep Check duplicate determinations are recommended.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Precision pipettes with disposable tips: 5, 50, 100 µl and 1 ml pipettes. Repeater or multichannel pipette for 50 and 100 µl.
- Disposable polystyrene or polypropylene tubes for the preparation of sample dilutions.
- 1000 ml cylinder for dilution of the Wash Buffer.
- Microtiter plate washer or squeeze bottle for Wash Buffer.
- Blotting paper.
- Refrigerator.
- Microtiter plate rotator.
- Microtiter plate reader for measurement of absorbance at 450 nm.
- BÜHLMANN Saliva Collection Devices, B-SLEEPCHECK16 or B-SVC (50).

PROCEDURAL NOTES FOR SPECIMEN COLLECTION

Collect saliva using the BÜHLMANN Saliva Collection Devices. The devices can absorb up to 3 ml of saliva. The procedure calls for 0.2 ml of saliva.

Saliva collection is simple and can be performed in patients' home at his convenience, but following precautions are recommended:

Please read the instructions carefully before starting to collect saliva. The more carefully you follow the instructions, the more reliable the results will be.

Patient should set aside an evening for this test avoiding sporting activities and any intense efforts as far as possible.

Light: Bright light can suppress melatonin production. Therefore, it is important to avoid bright light during the test. Muted lighting from a reading lamp or from the television is preferable.

Eating: Nothing should be eaten during the collection time. The last meal must be taken at least 30 minutes before starting the collection. Bananas and chocolate should not be eaten during the entire day before the collection.

Drinking: Drinks containing artificial colorants, caffeine (coffee, black or green tea, iced tea, cola) or alcohol are not allowed on the evening of the collection.

Medicines: On the collection day, if possible, no aspirin and medicines that contain ibuprofen (Algiofor, Brufen, Dysmenol, Dolocyl, Ecoprofen) should be taken. If your sleep or sleep-wake rhythm is treated with melatonin, this must be discontinued at least one week before the collection.

COLLECTION MODE



- 1 Before starting collection, label the tubes. Add name, date of birth, collection date and time.



- 2 15 minutes before each saliva sample, rinse your mouth thoroughly with water



- 3 Open the top of the tube (the swap is in the top) and remove the top from the tube.



- 4 Put the swap into your mouth straight from the top without touching it with your fingers



- 5 Put the swap between your teeth and cheek and move it around with your tongue for 3-5 minutes, until the swap is thoroughly soaked with saliva.



- 6 Put the swap from your mouth straight into the tube, without touching it with your fingers.



- 7 Using the top, push the swap into the tube and put on the top. For the collection of a melatonin profile repeat step 1 to 7 as indicated.

Store the samples refrigerated at 2-8°C.

SPECIMEN SHIPMENT AND STORAGE

Shipment: The collected saliva samples must be shipped to the laboratory within two days. Collected saliva samples must be kept in the fridge at 2-8°C.

Samples should not be sent on Fridays, Saturdays or the day before holiday.

Storage: The saliva samples absorbed in the cotton swab may be stored in the saliva collection device for up to 7 days at 2-8°C. If not assayed within one week after collection, samples should be frozen and may be stored for at least 6 months at ≤ -20°C. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided.

SAMPLE PRETREATMENT (LABORATORY)

Sample recovery from saliva collection devices

Centrifuge the collection devices sent by the patient for around 5 min at 3000 rpm (~1500x g). Discard the suspended insert with the swap and store the tube at 2-8°C or -20°C.

Pretreatment of Saliva Samples and Controls

- Pipet 200 µl of controls and saliva samples, respectively, into correspondingly marked, clean polypropylene, tubes.
- Add 25 µl of pretreatment solution to each tube using a multipipettor device.
- Vortex for 5 seconds and leave the tubes for 10 minutes at 18-28°C.
- Add 25 µl of neutralizing solution to each tube using a multipipettor device. Vortex for 5 seconds.

- Centrifuge the pre-treated samples for 5 min at 10'000 rpm. Proceed to the ELISA procedure.

ASSAY PROCEDURE

1. Use a plate with enough 8-well strips to test the desired number of Blanks, Calibrators, Controls and samples. Remove excess strips from the holder and re-seal them in the plastic bag together with the two desiccant bags **without delay**. Store refrigerated.
2. Wash the coated strips twice using at least 300 µl of Wash Buffer per well. Empty the wells and strike the plate firmly onto blotting paper.
- 3a. Pipet 100 µl of Blanking Reagent (Blank) in duplicate into wells A1+A2.
- 3b. Pipet 100 µl of Incubation Buffer (Zero Calibrator) in duplicate into wells B1+B2.
- 3c. Pipet 100 µl of Calibrator A in duplicate into wells C1+ C2
Pipet 100 µl of Calibrator B in duplicate into wells D1+D2
Pipet 100 µl of Calibrator C in duplicate into wells E1+E2
Pipet 100 µl of Calibrator D in duplicate into wells F1+F2
Pipet 100 µl of Calibrator E in duplicate into wells G1+G2
- 3d. Pipet 100 µl of pretreated Low Control (single) into well H1
Pipet 100 µl of pretreated High Control (single) into well H2
- 3e. Pipet 100 µl of each pretreated sample (single) into the subsequent wells.
4. Cover the plate with a plate sealer and incubate for 16-20 hours **at 2-8°C**.
5. Remove and discard the plate sealer. Add 50 µl of Biotin Conjugate (blue solution) to each well. Cover the plate with a plate sealer and place it for 1 min on a plate rotator set at 600 rpm.
6. Incubate for 3 hours (±5 minutes) **at 2-8°C**.
7. Remove and discard the plate sealer. Aspirate or invert the plate to empty the solution from each well and wash four times using at least 300 µl of wash buffer per well. Empty the wells and strike the plate firmly onto blotting paper.
8. Add 100 µl of Enzyme Label (yellow solution) to all wells.
9. Cover the plate with a new plate sealer, place the plate on a plate rotator set at 600 rpm and incubate for 60 minutes (±5 minutes) at 18-28°C.
10. Remove and discard the plate sealer. Aspirate or invert the plate to empty the solution from each well and wash four times using at least 300 µl of wash buffer per well. Empty the wells and strike the plate firmly onto blotting paper.

Important: allow the TMB Substrate to come to 18-28°C prior to use.

11. Add 100 µl of TMB Substrate to all wells.
12. Cover the plate, place it on a plate rotator set at 600 rpm, protect the plate from direct light and incubate for 30±5 minutes at 18-28°C.
13. Add 100 µl of Stop Solution to all wells. Remove air bubbles by pricking them with a pipette tip. Proceed to step 14 within 30 minutes.
14. Read the absorbance at 450 nm in a microtiter plate reader.

RESULTS

Standard Curve: Record the absorbance at 450 nm for each calibrator, Incubation Buffer and Blank well. Average the duplicate values, subtract the average of the Blank wells and record averages (=corrected average absorbance).

Calculate the binding (B) of each pair of calibrator wells as a percent of Incubation Buffer (B₀), with the Blank-corrected absorbance of the Incubation Buffer taken as 100 %.

$$B / B_0 (\%) = \text{percent bound} = \frac{\text{net absorbance}}{\text{net absorbance of Zero Calibrator}} \times 100$$

Plot the percent bound (vertical axis) versus the concentration of melatonin in pg/ml (horizontal axis) using a lin/log graph paper. Draw the best fitting curve or calculate the standard curve using a four parameter algorithm.

Samples and Controls: Record the absorbance at 450 nm for each sample well. Subtract the average of the blank wells and record the absorbance (=corrected average absorbance). Calculate, as described above, the binding of each pair of sample wells as a percent of Incubation Buffer (B₀), with the Blank-corrected absorbance of Incubation Buffer taken as 100%. Locate the B/B₀ value of the samples on the vertical axis, draw a horizontal line intersecting the standard curve and read the melatonin concentration (pg/ml) from the horizontal axis.

See Table 11 and Figure 1 for examples of results and standard curves. *These results and standard curves are for demonstration purposes only. A standard curve must be generated for each set of samples to be assayed.*

Standardization: Direct Saliva MELATONIN ELISA is calibrated with UV/VIS: $\epsilon_{278} = 6300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in methanol.

QUALITY CONTROL

A thorough understanding of this instruction for use is necessary for the successful use of the product. Reliable results will be obtained only by using precise laboratory techniques and accurately following this instruction for use. Since there are no controls for saliva melatonin commercially available, we recommend using saliva pools containing different levels of melatonin for internal quality controls. The reproducibility of standard curve parameters and control values should be within established limits of laboratory acceptability. The confidence limits for the Controls are lot-specific and printed on the additional QC Data Sheet. If the precision of the assay does not correlate with the established limits and repetition excludes errors in technique, check the following issues: i) pipeting, temperature controlling and timing devices ii) ELISA reader settings iii) expiration dates of reagents iv) storage and incubation conditions v) TMB Substrate Solution should be colorless and vi) purity of water.

LIMITATIONS

Melatonin results should be interpreted in conjunction with information available from clinical assessment of the patient and other diagnostic procedures.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Intra-Assay Precision (Within-Run): 12.6%. The intra-assay precision was calculated from the results of four different saliva samples within the standard range, measured 10 times in duplicate in a single run. The results are presented in Table 12.

Inter-Assay Precision (Run-to-Run): 22.9%. The inter-assay precision was calculated from the results of 17 independent runs with 5 samples within the standard range. The results are presented in Table 13.

Dilution Linearity/Parallelism: 92.2%. Three saliva samples with high amount of melatonin were sequentially diluted with Incubation Buffer and assayed according to the assay procedure. The Results are presented in Table 14. Due to the complex matrix of saliva samples dilution with Incubation Buffer higher than 1:8 will cause a decreased linearity. Therefore sample dilution with Incubation Buffer higher than 1:4 is not recommended.

Spiking Recovery: 97.9%. Two saliva samples from the same donor, one collected during daytime and one during night time were titrated against each other and assayed according the assay procedure twice, independently. The Results are presented in Table 15. Due to the complex and individual nature of the saliva matrix direct spiking of saliva with melatonin can lead to decreased recovery rates.

Detection Limit (LoB): 0.5 pg/ml. 32 wells of Incubation Buffer (Zero Calibrator) were assayed in two independent runs. The minimum detectable concentration in 0.1 ml of Incubation Buffer was calculated by subtracting two standard deviations of averaged Refer values from the OD of Zero calibrator and intersecting the value with the standard curve obtained in the same run.

Detection Limit (LoQ): (Limit of Quantification – LOQ): 1.6 – 20.5 pg/ml. The limit of quantification of this assay is the melatonin concentration in saliva that can be measured with an inter-assay coefficient of variation (CV) of less than 30%. The LOQ was determined from 7 different samples from 1.3 – 47.3 pg/ml each sample measured 17 times in duplicate in independent runs.

Specificity: the 50% binding (cross-reactivity) of the melatonin antiserum with different compounds were tested in the Direct Saliva Melatonin Radioimmunoassay (RK-DSM) from BÜHLMANN AG and are presented in Table 16.

METHOD COMPARISON

The comparison was done with 78 saliva samples from 10 different donors collected at different daytimes. The samples were analyzed using the presented EK-DSM assay as well as the Direct Saliva Melatonin Radioimmunoassay (RK-DSM) from BÜHLMANN AG. The subsequent linear regression analysis resulted in a correlation factor of $R^2 = 0.84$, an intercept of 0.77 pg/ml and a slope of 1.21. The correlation is presented in Figure 3.

DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN Direct Saliva Melatonin ELISA (EK-DSM) wird gebraucht für die direkte quantitative Bestimmung von Melatonin in humanen Speichelproben (Saliva) (1-4).

PRINZIP DER METHODE

Der BÜHLMANN Direct Saliva Melatonin ELISA ist ein kompetitiver Immunoassay, welcher die Fangantikörper Technik verwendet. Die im Kit enthaltene Mikrotiterplatte wurde mit dem polyklonalen Kennaway G280 Anti-Melatonin Antikörper (5,6) beschichtet. Nach der ersten 16-20 Stunden über-Nacht-Inkubation mit den vorbehandelten Speichelproben und Kontrollen, sowie den gebrauchsfertigen Kalibratoren konkurriert Melatonin während einer 3 Stunden Inkubation, mit biotinyliertem Melatonin für die Bindungsstellen des hochspezifischen Antikörpers. Nach einem Waschschrift wird der Enzymmarker (Streptavidin konjugierte Meerrettichperoxidase (HRP)) zugegeben und bindet während einer 60 Minuten Inkubation an den auf die Oberfläche gebundenen Melatonin-Biotin-Antikörper-Komplex. Ungebundener Enzymmarker wird durch einen Waschschrift entfernt und TMB Substrat (Tetramethylbenzidin) wird in die Kavitäten gegeben. In einem letzten Inkubationsschritt wird ein Farbprodukt gebildet, welches umgekehrt proportional zur Melatonin Konzentration ist. Durch die Zugabe der Stopp-Lösung ändert sich die Färbung von Blau nach Gelb, welche danach bei einer Wellenlänge von 450 nm quantifiziert werden kann.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Menge	Art.-Nr.	Rekonstitution
Vorbehandlungs-Reagenz	1 Flasche 5 ml	B-EKDSM-PRS	Gebrauchsfertig korrosiv
Neutralisierungs-Lösung	1 Flasche 5 ml	B-EKDSM-NS	Gebrauchsfertig reizend
Mikrotiter-Platte Mit G280 Anti-Melatonin Ak beschichtet	12x8 Kavitäten	B-EKDSM-MP	Vor Gebrauch 2x waschen
Abdeckfolie	3 Stück		
Wasch-Puffer Konzentrat (10x) Konservierungsstoffe	1 Flasche 100 ml	B-EKDSM-WB	Mit 900 ml deionisiertem Wasser lösen
Nullwert-Reagenz¹⁾ lyophilisiert	1 Flasche 1 ml	B-EKDSM-BR	Mit 1 ml Inkubations-Puffer lösen
Inkubations-Puffer (Null-Kalibrator) Melatonin freier Puffer	1 Flasche 12 ml	B-EKDSM-IB	Gebrauchsfertig
Kalibratoren²⁾ lyophilisiert; nicht vorbehandeln	5 Flaschen 1 ml	B-EKDSM-CASET	Mit je 1 ml Inkubations-Puffer lösen
Kontrolle tief/hoch³⁾ Vorbehandlung siehe Seite 7	2 Flaschen 1 ml	B-EKDSM-CONSET	Mit je 1 ml Inkubations-Puffer lösen
Biotin-Konjugat	1 Flasche 5.5 ml	B-EKDSM-BC	Gebrauchsfertig
Enzym-Marker Streptavidin-HRP Konjugat	1 Flasche 11 ml	B-EKDSM-EL	Gebrauchsfertig
TMB-Substrat Mit Citrat und H ₂ O ₂ gepuffert	1 Flasche 11 ml	B-TMB	Gebrauchsfertig
Stopp-Lösung 0.25 M Schwefelsäure	1 Flasche 11 ml	B-STs	Gebrauchsfertig

Table 3

¹⁾ Das Nullwert-Reagenz enthält eine gesättigte Melatonin Lösung. Kontaminationen von anderen Kitkomponenten müssen vermieden werden.

²⁾ Die Kalibratoren A, B, C, D und E enthalten die folgenden tatsächlichen Melatonin Konzentrationen: 0.48, 1.2, 3.2, 8.0 und 20 pg/ml. Unter Einbezug einer Probenverdünnung von 20% bei der Vorbehandlung, resultiert für den Test jedoch eine Konzentration von: 0.6, 1.5, 4.0, 10, und 25 pg/ml Melatonin.

³⁾ Lot abhängige Melatonin Konzentrationen. Siehe beigelegtes QC Datenblatt.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Ungeöffnete Reagenzien	
Bei 2-8°C bis zu Verfallsdatum haltbar. Nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.	
Geöffnete / Rekonstituierte Reagenzien	
Mikrotiter-Platte	Ungebrauchte Streifen direkt in den Plastikbeutel mit dem Dessikator zurücklegen und gut verschliessen. Bei 2-8°C bis zu 2 Monate haltbar.
Vorbehandlungs-Reagenz	Bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum haltbar.
Neutralisierungs-Lösung	
Inkubations-Puffer	
Wasch-Puffer verdünnt	Bei 2-8°C bis zu 6 Monaten stabil
Nullwert-Reagenz	Bei 2-8°C bis zu 4 Monaten stabil.
Kalibratoren	
Kontrollen	
Biotin-Konjugat	
Enzym-Marker	
TMB Substrat	
Stopp-Lösung	Bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum haltbar.

Table 4

VORSICHTSMASSNAHMEN

SICHERHEITSMASSNAHMEN

- Die Mikrotiter-Platten (B-EKDSM-MP) enthalten Komponenten menschlicher Herkunft. Obwohl sie negativ in Tests für HBV Oberflächenantigen, HCV und HIV1/2 Antikörper waren, sollten gemäss Good Laboratory Practice als potentiell infektiös behandelt werden und die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden.
- Vorbehandlungsreagenz/Neutralisierungslösung, Substrat- und Stopp-Lösung:** Das Vorbehandlungsreagenz (B-EKDSM-PRS) enthält Natriumhydroxid (NaOH) und die Neutralisierungslösung (B-EKDSM-NS) enthält Salzsäure (HCl). Die Substratlösung (B-TMB) enthält Tetramethylbenzidin, Wasserstoff-Peroxid und Dimethylformamide. Die Stopp-Lösung (B-STTS) enthält Schwefelsäure. Jeder dieser Reagenzien reizt die Augen, die Haut und die Schleimhautmembranen. Berührung mit den Augen, der Haut und die Bekleidung vermeiden. Nach Berührung sofort mit viel Wasser spülen.
- Ungebrauchte Lösungen sollten gemäss der gesetzlichen Bestimmungen entsorgt werden.

TECHNISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

Kitkomponenten

- Auf Grund des Produktionsprozesses kann es Rückstände in den Wells der Mikrotiterplatten haben. Sie werden mit dem 1. Waschen (Schritt 2) entfernt und haben keinen Einfluß auf die Ergebnisse.
- Lesen Sie die Arbeitsanleitung sorgfältig vor der Testdurchführung. Die Testqualität kann negativ beeinflusst werden, wenn die Reagenzien nicht korrekt verdünnt oder verändert werden sowie nicht entsprechend der in dieser Anleitung angegebenen Lagerungsbedingungen gelagert werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Mischen Sie nicht Reagenzien verschiedener Kit lots.
- Vermeiden Sie unter allen Umständen, dass es zu einer Kontamination zwischen verschiedenen Reagenzien, Proben und zwischen den Wells kommt.
- Die Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur äquilibrieren lassen und mischen (vortexen).
- Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden.
-

Assay-Durchführung

- Das Blank-Reagenz enthält eine gesättigte Melatonin Lösung. Kontaminationen von anderen Kitkomponenten müssen vermieden werden. Die Einwegspitzen müssen nach jedem Pipetierschritt gewechselt werden.
- Die Testdurchführung wurde für die Sleep Check Anwendung optimiert. Dabei werden das Blank-Reagenz und die Kalibratoren im Doppel gemessen, während die Kontrollen und die Patientenproben einzeln bestimmt werden. Diese Anwendung ermöglicht es 16 individuelle Profile à 5 Messpunkte pro Mikrotiterplatte durchzuführen. Für andere Anwendungen als der Sleep Check wird empfohlen, die Bestimmungen im Doppel anzusetzen.

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen für 5 µl, 50 µl, 100 µl und 1 ml. Multipipete für 50 µl und 100 µl
- Polystyren oder Polypropylen Einwegröhrchen zur Probenverdünnung.
- 1000 ml Zylinder zur Verdünnung des Waschpuffers.
- Mikrotiter-Platten-Waschgerät oder Spritzflasche für Waschpuffer.
- Saugfähiges Papier.
- Kühlschrank
- Mikrotiter-Platten-Schüttler.
- Mikrotiter-Platten-Photometer; optischer Filter: 450 nm.
- BÜHLMANN Saliva Collection Devices, B-SLEEPCHECK16 oder B-SVC (50).

HINWEISE FÜR DIE PROBENSAMMLUNG

Die Speichelproben werden mit Hilfe der BÜHLMANN Speichelsammelbestecke gesammelt.

Die Sammelbestecke können bis zu 3 ml Speichel absorbieren. Zur Testdurchführung werden 0.2 ml Speichelprobe benötigt.

Die Speichelsammlung ist einfach und kann zu Hause beim Patienten durchgeführt werden. Die folgenden Vorsichtsmassnahmen müssen beachtet werden:

Vor der Durchführung der Speichelsammlung muss deren Beschreibung genau gelesen werden.

Zur Probensammlung sollte ein Abend ausgesucht werden, an welchem keine sportlichen Betätigungen oder andere Anstrengungen durchgeführt werden.

Licht: Helles Licht kann die Melatonin Ausschüttung unterdrücken. Deshalb ist es wichtig, während der Sammlung helles Licht zu vermeiden. Die gedämpfte Beleuchtung einer Leselampe oder vom Fernseher sind zu bevorzugen.

Essen: Während der Sammeldauer darf keine Nahrung zu sich genommen werden. Die letzte Mahlzeit sollte mindestens 30 Minuten vor Beginn der Sammlung eingenommen werden. Auf Bananen und Schokolade sollte während des gesamten Tages der Sammlung verzichtet werden.

Getränke: Getränke welche künstliche Farbstoffe, Koffein (Kaffee, Schwarz- oder Grüntee, IceTea, Cola) oder Alkohol enthalten dürfen am Abend der Speichelsammlung nicht eingenommen werden.

Medikamente: Wenn möglich sollte am Tag der Sammlung kein Aspirin oder Medikamente welche Ibuprofen (Algiofor, Brufen, Dysmenol, Dolocyl, Ecoprofen) enthalten

eingonnen werden. Falls der Schlaf- oder Schlaf/Wach-Rhythmus mit Melatonin behandelt wird, sollte diese Behandlung vor der Probensammlung für mindestens eine Woche unterbrochen werden.

PROBENSAMMLUNG



- 1 Vor Beginn der Sammlung müssen die Sammelröhrchen beschriftet werden. Name, Geburtsdatum, Datum und Zeitpunkt der Sammlung.



- 2 15 Minuten vor jeder Speichelsammlung soll der Mund intensiv mit Wasser gespült werden.



- 3 Den Stopfen vom Sammelröhrchen abnehmen (die Watterolle befindet sich im Einhängegefäß).



- 4 Die Watterolle, ohne mit der Hand zu berühren, in den Mund nehmen.



- 5 Die Watterolle zwischen Zähne und Wange nehmen, mit der Zunge während 3-5 Minuten leicht bewegen, bis die Watterolle gut mit Speichel gefüllt ist.



- 6 Die eingespeichelte Watterolle wieder, ohne mit den Fingern zu berühren, zurück in das Einhängegefäß geben.



- 7 Mit Hilfe des Stopfens kann die Watterolle in das Einhängegefäß gedrückt werden. Für die Sammlung eines Melatonin-Profiles müssen die Schritte 1-7 wie angegeben wiederholt werden.

Die Proben gekühlt bei 2-8°C lagern.

PROBENVERSAND UND LAGERUNG

Versand: Die gesammelten Speichelproben müssen innerhalb von zwei Tagen in das Labor versandt werden. Die gesammelten Proben sollen im Kühlschrank bei 2-8°C gelagert werden.

Die Proben sollen nicht am Freitag, Samstag oder am Tag vor einem Feiertag versandt werden.

Lagerung: Die Watterolle mit der absorbierten Speichelprobe kann bis zu 7 Tage bei 2-8°C im Speichelsammelröhrchen gelagert werden. Falls die Proben nicht innerhalb einer Woche getestet werden, müssen die Proben tiefgefroren werden. Diese können für mindestens 6 Monate bei ≤-20°C gelagert werden. Wiederholtes Auftauen/Einfrieren soll vermieden werden.

TECHNISCHER HINWEIS

Das Nullwert-Reagenz enthält eine gesättigte Melatonin Lösung. Kontaminationen von anderen Kitkomponenten müssen vermieden werden. Die Einwegspitzen müssen nach jedem Pipetierschritt gewechselt werden.

Die Testdurchführung wurde für die Sleep Check Anwendung optimiert. Dabei werden das Nullwert-Reagenz und die Kalibratoren im Doppel gemessen, während die Kontrollen und die Patientenproben einzeln bestimmt werden. Diese Anwendung ermöglicht es 16 individuelle Profile à 5 Messpunkte pro Mikrotiterplatte durchzuführen.

Für andere Anwendungen als der Sleep Check wird empfohlen, die Bestimmungen im Doppel anzusetzen.

PROBENVORBEHANDLUNG

Probengewinnung aus den Saliva Sammelbestecken

Die vom Patienten zugesandten Saliva Sammelbestecke werden für ungefähr 5 Minuten bei 3000 rpm (~1500x g) zentrifugiert. Das abzentrifugierte Einhängegefäß mit der Watterolle wird verworfen. Das verbleibende Röhrchen kann bei 2-8°C oder -20°C gelagert werden.

Vorbehandlung Speichelproben und Kontrollen

- 200 µl der Kontrollen und der Speichelproben in entsprechend markierte Polypropylen-Röhrchen geben.
- 25 µl Vorbehandlungs-Lösung in jedes Röhrchen geben.
- Für 5 Sekunden vortexen und die Röhrchen für 10 Minuten bei 18-28°C stehen lassen.
- 25 µl Neutralisierungs-Lösung in jedes Röhrchen zugeben und für 5 Sekunden vortexen.
- Die vorbehandelten Proben werden für 5 Min bei 10'000 rpm zentrifugiert und im ELISA getestet.

ARBEITSANLEITUNG

1. Mikrotiter-Platte mit ausreichender Anzahl Streifen für Nullwert (Blank), Kalibratoren, Kontrollen und Proben bereitstellen. Die restlichen Streifen **direkt** im wiederver-schliessbaren Beutel einschliessen und gekühlt lagern.
2. Die beschichteten Kavitäten zweimal mit ≥300 µl Wasch-Puffer waschen. Die Kavitäten entleeren und auf saug-fähigem Papier gut ausklopfen.
 - 3a. Je 100 µl Nullwert-Reagenz (Blank) in die Kavitäten A1+A2 geben.
 - 3b. Je 100 µl Inkubations-Puffer (Null-Kalibrator) in die Kavitäten B1+B2 geben.
 - 3c. Je 100 µl Kalibrator A in die Kavitäten C1+C2 geben.
Je 100 µl Kalibrator B in die Kavitäten D1+D2 geben etc.
 - 3d. 100 µl vorbehandelte Kontrollen tief in Kavität H1 geben.
100 µl vorbehandelte Kontrollen hoch in Kavität H2 geben.
 - 3e. 100 µl der vorbehandelten Proben (Einzelwert) in die weiteren Kavitäten geben.
4. Die Platte mit einer Abdeckfolie verschließen und über Nacht für 16-20 Stunden bei 2-8°C inkubieren.
5. Folie entfernen. In jede Kavität je 50 µl Biotin-Konjugat (blaue Lösung) zugeben. Die Platte mit einer Abdeckfolie verschließen und für 1 Minute auf einen Platten-Schüttler (600 rpm) stellen.
6. Danach für 3 Stunden (±5 Min) **bei 2-8°C inkubieren**.
7. Folie entfernen. Die Lösung aus jeder Kavität absaugen oder ausschütten und viermal mit ≥300 µl Wasch-Lösung waschen. Die Kavitäten entleeren und auf saugfähigem Papier gut ausklopfen.
8. Je 100 µl Enzym-Marker (gelbe Lösung) zu allen Kavitäten zugeben.
9. Mit einer neuen Abdeckfolie zudecken und für 60 Minuten (±5 Min) auf einem Platten-Schüttler (600 rpm) bei 18-28°C inkubieren.
10. Folie entfernen und entsorgen. Die Lösung aus jeder Kavität absaugen oder ausschütten und viermal mit ≥300 µl Wasch-Lösung waschen. Die Kavitäten entleeren und auf saugfähigem Papier gut ausklopfen.

Wichtig: Das TMB Substrat muß bei 18-28°C zugegeben werden.

11. Je 100 µl TMB-Substrat zu allen Kavitäten geben.
12. Platte zudecken und für 30±5 Minuten auf einem Platten-Schüttler (600 rpm) bei 18-28°C und vor Licht geschützt inkubieren.
13. Je 100 µl Stopp-Lösung zu allen Kavitäten zugeben. Luftbläschen mit einer Pipettenspitze entfernen und innerhalb von 30 Minuten messen.
14. Die Absorption in einem Mikrotiter-Platten-Photometer bei 450 nm messen.

RESULTATE

Eichkurve: Optische Dichte aller mit Kalibrator oder Nullwert-Reagenz (Blank) gefüllten Kavitäten bei 450 nm messen. Zur Ermittlung der „korrigierten Absorptionsmittelwerte“ wird der Mittelwert aus den Doppelmessungen berechnet und der Mittelwert des Nullwert-Reagenzes (Blank) subtrahiert. Die Bindung (B) jedes Kalibratorpaares als Prozentsatz des Inkubations-Puffers (B₀) berechnen, wobei die Blank-korrigierte Absorption des Inkubations-Puffers als 100% gesetzt wird.

$$B / B_0 (\%) = \% \text{ Bindung} = \frac{\text{netto Absorption}}{\text{netto Absorption des Inkubations-Puffers}} \times 100$$

Den Bindungs-Prozentsatz (Vertikalachse) gegen die Melatonin-Konzentration in pg/ml (Horizontalachse) auf einem semi-logarithmischen (lin/log) Papier auftragen. Die optimale Kurve (best fitting curve) zeichnen oder mit einem vier-Parameter-Algorithmus berechnen.

Proben und Kontrollen: Optische Dichte der Proben und Kontrollen bei 450 nm messen. Zur Ermittlung der „Netto Absorptionsmittelwerte“ wird der Mittelwert des Nullwert-Reagenzes subtrahiert. Wie oben beschrieben, die Bindung jedes Probenpaares als Prozentsatz des Inkubations-Puffers (B₀) berechnen, wobei die Blank-korrigierte Absorption des Inkubations-Puffers als 100% gesetzt wird. B/B₀ auf der Eichkurve auftragen und die entsprechende Melatonin-Konzentration in pg/ml aus der Horizontalachse ablesen.

Für ein Beispiel von Resultaten und Eichkurve siehe Table 11 und Figure 1. *Diese Daten dienen nur der Illustration und sind nicht dazu bestimmt, die Ergebnisse eines anderen Testensatzes danach zu berechnen. Eine Eichkurve muss für jeden Testansatz jeweils neu ermittelt werden.*

Standardisierung: Direct Saliva MELATONIN ELISA ist mit UV/VIS kalibriert: $\epsilon_{278} = 6300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in Methanol.

QUALITÄTSKONTROLLE

Ein vollständiges Verständnis dieser Testpackungsbeilage ist für den erfolgreichen Gebrauch des Produktes notwendig. Zuverlässige Resultate werden nur erreicht durch die strikte Einhaltung der Arbeitsanleitung.

Da keine Melatoninkontrollen im Speichel kommerziell erhältlich sind, empfehlen wir Speichel-„Pools“ mit unterschiedlichen Melatonin Konzentrationen für die interne Qualitätskontrolle zu verwenden. Die Reproduzierbarkeit der Eichkurvenparameter und der Kontrollwerte sollte innerhalb des vom Labor etablierten Erwartungsbereiches liegen. Die Vertrauensbereiche der Kontrollen sind Lot-spezifisch und sind auf dem zusätzlichen QC-Datenblatt angegeben. Falls die Präzision des Testes nicht mit dem etablierten Erwartungsbereich übereinstimmt und wiederholte Messungen ein technisches Problem ausschliessen, sind folgende Bedingungen zu überprüfen: i) Pipettierung, Temperatur- und Zeitmessende Geräte, ii) Photometer Eichung, iii) Verfallsdaten der Reagenzien, iv) Lagerungs- und Inkubations-Bedingungen, v) die TMB Substratlösung sollte farblos sein, vi) Wasserreinheit.

LEISTUNGSEINSCHRÄNKUNGEN

Die Melatoninergebnisse sollten stets in Verbindung mit zusätzlichen Informationen aus der Anamnese des Patienten und weiteren diagnostischen Verfahren bewertet werden.

LEISTUNGSMERKMALE

Intra-Assay Präzision: 12.6%. Die Intra-Assay Präzision wurde aus den Resultaten von vier unterschiedlichen Speichelproben innerhalb des Standardbereichs berechnet. Die Proben wurden 10-mal im gleichen Ansatz im Doppel gemessen. Die Resultate sind in Table 12 dargestellt.

Inter-Assay Präzision: 22.9%. Die Inter-Assay Präzision wurde aus den Resultaten von 17 unabhängigen Durchführungen mit 5 Proben, innerhalb des Standardbereichs berechnet. Die Resultate sind in Table 13 dargestellt.

Verdünnungslinearität: 92.2%. Drei Speichelproben mit hohen Melatonin Konzentrationen wurden nacheinander mit Inkubations-Puffer verdünnt und entsprechend der Arbeitsanleitung getestet. Die Resultate sind in Table 14 dargestellt.

Aufgrund der komplexen Matrix von Speichelproben führen Verdünnungen mit Inkubations-Puffer grösser als 1:8 zu einer verminderten Linearität. Aus diesem Grunde werden Probenverdünnungen mit Inkubations-Puffer grösser als 1:4 nicht empfohlen.

Wiederfindung: 97.9%. Zwei Speichelproben vom gleichen Spender, welche während des Tages sowie während der Nacht abgenommen wurden, wurden zweimal unabhängig gegeneinander ausgetitert. Die Daten sind in Table 15 dargestellt.

Aufgrund der komplexen und individuellen Beschaffenheit der Speichelmatrix kann ein direktes Versetzen des Speichels mit Melatonin zu einer verminderten Wiederfindung führen.

Nachweisgrenze (LoB): 0.5 pg/ml. 32 Kavitäten mit Inkubations-Puffer (Null-Kalibrator) wurden in zwei unabhängigen Ansätzen getestet. Die minimal nachweisbare Konzentration in 0.1 ml Inkubations-Puffer wurde durch die Subtraktion von zwei Standardabweichungen des gemittelten Null-Kalibrators und durch Intersektion auf der im gleichen Ansatz erhaltenen Standardkurve ermittelt.

Nachweisgrenze (LoQ): 1.6 – 20.5 pg/ml. Der „Limit of Quantification“ des Tests ist die Melatoninkonzentration im Speichel, welche mit einem Variationskoeffizienten (CV) gemessen werden kann, welcher unter 30% liegt. Der LOQ wurde bestimmt mittels 7 unterschiedlichen Speichelproben zwischen 1.3 und 47.3 pg/ml. Die Proben wurden 17-mal unabhängig im Doppel gemessen.

Spezifität: Die 50% Bindung (Kreuzreaktivität) des Melatoninantiseraums mit verschiedenen Molekülen wurden im Radioimmunassay von BÜHLMANN (RK-DSM) ermittelt und sind in Table 16 dargestellt.

METHODENVERGLEICH

Der Vergleich wurde mit 78 Speichelproben von 10 verschiedenen Spendern durchgeführt, welche zu unterschiedlichen Tageszeiten gesammelt wurden. Die Proben wurden mit dem hier beschriebenen EK-DSM ELISA sowie mit dem Direct Saliva Melatonin Radioimmunassay (RK-DSM) von BÜHLMANN durchgeführt. Die durchgeführte Regressionsanalyse ergab einen Korrelationsfaktor von $R^2 = 0.84$, einen Achsenabschnitt von 0.77 pg/ml und eine Steigung von 1.21. Die Korrelation ist in Figure 3 dargestellt.

UTILISATION

La trousse de dosage Mélatonine salivaire directe ELISA (EK-DSM) des Laboratoires BÜHLMANN est destinée à la détermination directe et quantitative de la mélatonine dans les échantillons de salive (1-4).

PRINCIPE

La trousse BÜHLMANN Direct Saliva Melatonin ELISA est un immuno-essai compétitif utilisant la technique de l'anticorps de capture. L'anticorps polyclonal de Kennaway G280 anti-mélatonine (5,6) est coaté au fond des puits de la microplaque fournie dans la trousse. Après 16-20 heures de pré incubation, la mélatonine présente dans la salive prétraitee, les contrôles et les calibrateurs, entre en compétition avec la mélatonine marquée à la biotine durant une seconde période d'incubation de 3 heures pour se fixer sur les sites de son anticorps spécifique. Après un lavage, le marqueur enzymatique, la streptavidine conjuguée à la peroxydase de raifort (HRP) est ajouté durant une troisième étape d'incubation de 60 minutes où il se lie aux complexes mélatonine-biotine-anticorps capturés au fond des puits. Le marqueur enzymatique non lié est éliminé par une seconde étape de lavage, puis le substrat TMB (tetraméthylbenzidine) est ajouté aux puits. Au cours de la quatrième étape d'incubation, un produit coloré est formé en quantité inversement proportionnelle à la concentration en mélatonine présente dans l'échantillon. La couleur passe du bleu au jaune après addition de la solution stop acide et son intensité peut être mesurée à 450 nm.

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantités	Codes	Reconstitution
Solution de pré-traitement	1 flacon 5 ml	B-EKDMS-PRS	Prêt à l'emploi Réactif corrosif
Solution de neutralisation	1 flacon 5 ml	B-EKDMS-NS	Prêt à l'emploi Réactif irritant
Microplaque Precoatée avec l'anticorps G280 anti-mélatonine	12x8 puits	B-EKDMS-MP	Laver 2x avant utilisation
Films adhésifs	3 pièces		
Concentré pour solution de lavage (10x) avec conservateurs	1 flacon 100 ml	B-EKDMS-WB	Diluer avec 900 ml d'eau déionisée
Réactif "blanc"¹⁾ lyophilisé	1 flacon 1 ml	B-EKDMS-BR	Reconstituer avec 1 ml de Tampon d'incubation
Tampon d'incubation (Calibrateur zéro) Tampon exempt de mélatonine	1 flacon 12 ml	B-EKDMS-IB	Prêt à l'emploi
Calibrateurs²⁾ lyophilisés ; ne pas prétraiter	5 flacons 1 ml	B-EKDMS-CASET	Reconstituer avec 1 ml de Tampon d'incubation
Contrôles faible/élevé³⁾ pour le prétraitement voir page 11	2 flacons 1 ml	B-EKDMS-CONSET	Reconstituer avec 1 ml de Tampon d'incubation
Conjugué biotine	1 flacon 5.5 ml	B-EKDMS-BC	Prêt à l'emploi
Marqueur enzymatique Streptavidine-conjugué HRP	1 flacon 11 ml	B-EKDMS-EL	Prêt à l'emploi
Substrat TMB tamponné (citrate + H ₂ O ₂)	1 flacon 11 ml	B-TMB	Prêt à l'emploi
Solution Stop Acide sulfurique 0.25 M	1 flacon 11 ml	B-STTS	Prêt à l'emploi

Table 5

¹⁾ Le réactif blanc contient une solution saturée de mélatonine. Eviter toute contamination des autres réactifs de la trousse.

²⁾ Les calibrateurs A, B, C, D et E contiennent respectivement 0.48, 1.2, 3.2, 8.0 et 20 pg/ml de mélatonine tenant compte de la dilution de 20% due au prétraitement et sont étiquetés, de ce fait, de la façon suivante: 0.6, 1.5, 4.0, 10 et 25 pg/ml de mélatonine, respectivement.

³⁾ Les contrôles présentent des concentrations de mélatonine spécifiques à chaque lot. Veuillez vous reporter aux données additionnelles de QC pour les valeurs exactes.

CONSERVATION ET PEREMPTION DES REACTIFS

Réactifs fermés/non entamés	
Conserver les réactifs à 2-8°C jusqu'à la date de péremption. Ne pas les utiliser au-delà de la date de péremption.	
Réactifs ouverts/reconstitués	
Microplaque	Remettre immédiatement les barrettes non utilisées dans la pochette contenant les dessiccateurs. Refermer la pochette au moyen du zip et la placer au réfrigérateur. Elle se conserve durant 2 mois à 2-8°C.
Réactif de pré-traitement	Conserver à 2-8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette des flacons.
Solution de neutralisation	
Tampon d'incubation	
Solution de lavage diluée	Stable à 2-8°C jusqu'à 6 mois
Réactif « blanc »	Stables à 2-8°C jusqu'à 4 mois.
Calibrateurs	
Contrôles	
Conjugué Biotine	Conserver à 2-8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette des flacons.
Marqueur enzymatique	
Substrat TMB	
Solution Stop	

Table 6

PRECAUTIONS

PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ

- **Matériel d'origine humaine** : Les barrettes de la microplaque, les calibrateurs et les contrôles de cette trousse contiennent des composants d'origine humaine. Bien que les tests de détection de l'antigène de surface du VHB et des anticorps des virus VHC et VIH1/2 se soient révélés négatifs, il convient de considérer les réactifs comme capables de transmettre des maladies infectieuses, et de les manipuler conformément aux bonnes pratiques de laboratoire, en prenant les précautions appropriées.
- **Prétraitement/Solution de neutralisation, Substrat et Solution Stop**: La solution de prétraitement (B-EKDMS-PRS) contient de l'hydroxyde de sodium (NaOH) et la solution de neutralisation (B-EKDMS-NS) contient de l'acide chlorhydrique (HCl). Le Substrat (B-TMB) contient du tétraméthylbenzidine (TMB), du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et du diméthylfomamide. La Solution stop (B-STTS) contient de l'acide sulfurique. Ces substances irritent les yeux, la peau ainsi que les muqueuses. Eviter par conséquent tout contact avec les yeux, la peau et les habits. En cas de contact accidentel avec les yeux ou la peau, il faut impérativement rincer à grande eau.
- Pour en savoir plus sur les précautions pour la manipulation et l'élimination des réactifs du kit, nous vous recommandons fortement de consulter l'organisme réglementaire compétent pour votre pays.

PRÉCAUTIONS TECHNIQUES

Reactives

- **Les puits de la microplaque** peuvent être recouverts de **résidus** formés lors du processus de production. Ils sont éliminés par le lavage (voir l'étape 3 de la procédure) et n'ont aucune influence sur les résultats.
- Lire attentivement les instructions avant de réaliser le test. test ne donnera pas les résultats escomptés en cas de dilution incorrecte ou de modification des réactifs, ou de stockage dans des conditions autres que celles détaillées dans le présent mode d'emploi.
- Les composants ne doivent pas être utilisés au-delà de la date d'expiration imprimée sur les étiquettes.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.

- Laisser les réactifs équilibrer à la température ambiante. Reconstituer les réactifs lyophilisés comme indiqué. Bien mélanger (au vortex) les réactifs avant utilisation.
- Les micropuits sont à usage unique.

Procédure

- Le réactif "blanc" contient une solution de mélatonine saturée. Eviter toute contamination des autres réactifs contenus dans le kit. Changer d'embout entre chaque étape de pipetage.
- La procédure de dosage a été optimisée pour le SleepCheck. La détermination se fait en double pour le réactif « Blanc » et les calibrateurs et en simple pour les contrôles et les patients. Une microplaque permet ainsi le test de 16 profils individuels à 5 points. Pour les applications autres que celles relative au SleepCheck des déterminations en double sont recommandées.

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Pipettes de précision réglables avec pointes jetables pour 5 µl, 50 µl, 100 µl et 1 ml. Pipettes automatiques ou pipettes multi pointe de 50 µl et 100 µl.
- Tubes jetables en polypropylène ou polystyrène pour la préparation des dilutions d'échantillons.
- Epruvette graduée de 1000 ml pour la préparation du tampon de lavage.
- Laveur automatique de microplaques ou pissette pour le tampon de lavage.
- Papier absorbant.
- Réfrigérateur.
- Agitateur de microplaques.
- Lecteur de microplaques pour la mesure de l'absorbance à 450 nm.
- BÜHLMANN Saliva Collection Devices, B-SLEEPCHECK16 ou B-SVC (50).

MODE OPERATOIRE POUR LE PRELEVEMENT D'ECHANTILLONS

Prélever la salive en utilisant le set de prélèvement de salive BÜHLMANN. Le dispositif peut absorber jusqu'à 3 ml de salive. Le mode opératoire préconise une quantité <0.2 ml de salive.

Le prélèvement de salive est simple et peut être effectué au domicile du patient, mais les précautions suivantes sont recommandées :

Veuillez lire soigneusement les instructions avant de procéder au prélèvement de la salive.

Le patient réservera une soirée pour le test en s'abstenant d'activités sportives et de tout effort intense.

Lumière: La lumière intense peut supprimer la production de mélatonine. Par conséquent, il est important d'éviter la lumière intense durant le prélèvement. Un éclairage tamisé d'une lampe de lecture ou venant d'un téléviseur est préférable.

Alimentation: Aucun aliment ne sera pris durant le temps de prélèvement. Le dernier repas doit être pris au moins 30 minutes avant le début du prélèvement. Des bananes et du chocolat ne pourront être consommés le jour du prélèvement.

Boisson: Les boissons contenant des colorants artificiels, de la caféine (café, thé noir ou vert, thé glacé, cola) ou alcool ne sont pas permis le soir de prélèvement.

Médicaments: Aspirine ou médicaments contenant de l'ibuprofène (Algiofor, Brufen, Dysmenol, Dolocyl, Ecopufen) doivent être évités le jour du prélèvement. Si votre sommeil ou votre rythme circadien est traité par la mélatonine, celle-ci doit être arrêtée au moins une semaine avant le prélèvement.

PROCESSUS DE PRÉLEVEMENT



- 1 Avant de procéder au prélèvement d'échantillons, identifiez les tubes. Ajoutez nom, date de naissance, date de prélèvement et heure.



- 2 15 minutes avant chaque échantillonnage de salive, rincer votre bouche soigneusement avec de l'eau.



- 3 Ouvrir le dessus du tube (le tampon est situé en haut).



- 4 Placer le tampon dans votre bouche par la partie supérieure sans le toucher des doigts.



- 5 Placer le tampon entre vos dents et votre joue et faites-le tourner au moyen de la langue pendant 3-5 minutes, jusqu'à ce que le tampon soit parfaitement humecté par votre salive.



- 6 Placer le tampon venant de votre bouche immédiatement dans le tube, sans le toucher des doigts.



- 7 En utilisant le bouchon du dessus, poussez le tampon dans le tube et fermer le tube au moyen du bouchon. Pour la prise d'échantillons en vue d'un profil mélatonine, répéter les étapes 1 à 7 comme indiqué.

Stocker les échantillons réfrigérés à 2-8 °C.

ENVOI DES ECHANTILLONS ET STOCKAGE

Envoi: Les échantillons de salive doivent être envoyés au laboratoire dans les deux jours. Les tubes de prélèvement de salive employés doivent être gardés au réfrigérateur à 2-8°C.

Les échantillons ne seront pas envoyés les vendredis, samedi ou avant les jours fériés.

Stockage: Les échantillons de salive absorbés sur les tampons de coton peuvent être stockés dans le dispositif de prélèvement jusqu'à 7 jours à 2-8°C. Si l'on ne procède pas à l'essai dans la semaine, les échantillons doivent être congelés et pourront être stockés au moins 6 mois à ≤-20°C. Des cycles répétés de congélation – décongélation doivent être évités.

PRETRAITEMENT DE L'ÉCHANTILLON (LABORATOIRE)

Récupération de l'échantillon à partir du set de prélèvement de salive

Centrifuger les tubes de prélèvement de salive envoyés par le patient pendant environ 5 min à 3000 rpm (~1500x g). Jeter l'insert avec le tampon et stocker le tube à 2-8°C ou -20°C.

Echantillons de salive et contrôles

- Pipeter 200 µl d'échantillon de salive ou de contrôle dans des tubes propres en polypropylène.
- Ajouter 25 µl de solution de prétraitement à chaque tube en utilisant une multi pipette.
- Vortexer pendant 5 secondes et les laisser reposer pendant 10 minutes à 18-28°C.
- Ajouter 25 µl de solution de neutralisation en utilisant une multi pipette. Vortexer pendant 5 secondes.
- Centrifuger les échantillons prétraités pendant 5 min à 10.000 rpm. Procéder à la détermination par ELISA.

PROCEDURE

1. Préparer une microplaque avec suffisamment de barrettes pour pouvoir analyser tous les calibrateurs, contrôles et échantillons prévus. Remettre sans attendre l'excédent de barrettes dans la pochette prévue à cet effet et contenant les dessiccateurs. Conserver au réfrigérateur.
2. Laver les puits coatés à deux reprises avec au moins 300 µl de tampon de lavage/ puits. Vider les puits et taper la microplaque fermement sur du papier absorbant.
- 3a. Pipeter 100 µl de réactif « blanc » en double dans les puits A1+A2.
- 3b. Pipeter 100 µl du Tampon d'incubation (calibrateur zéro / Référence) en double dans les puits B1+B2.
- 3c. Pipeter 100 µl de calibrateur A en double dans les puits C1+C2.
Pipeter 100 µl de calibrateur B en double dans les puits D1+D2 etc.
- 3d. Pipeter 100 µl du contrôle faible prétraité dans le puit H1.
Pipeter 100 µl du contrôle élevé prétraité dans le puit H2.
- 3e. Pipeter 100 µl de chaque échantillon prétraité (en simple) dans les puits suivants.
4. Couvrir la plaque avec un couvercle opaque et incubé 16-20 heures à 2-8°C.
5. Enlever et jeter l'adhésif. Ajouter 50 µl de conjugué Biotine (solution bleue) à tous les puits. Recouvrir la plaque avec un adhésif puis la placer sur un agitateur de plaque pendant 1 minute à 600 rpm.
6. Incuber pendant 3 heures (± 5 minutes) à 2-8°C.
7. Enlever et jeter l'adhésif. Vider les puits et laver 4 fois avec au moins 300 µl de tampon de lavage froid/puits. Vider les puits et taper fermement la microplaque sur du papier absorbant.
8. Ajouter 100 µl de marqueur enzymatique (solution jaune) à tous les puits.
9. Couvrir la microplaque avec un adhésif et incubé 60 minutes (± 5 min) à 18-28°C, sur un agitateur à microplaques à 600 rpm.
10. Enlever et jeter l'adhésif. Vider les puits et laver 4 fois avec au moins 300 µl de tampon de lavage froid/ puits.

Vider les puits et taper fermement la microplaque sur du papier absorbant.

Important: veiller à ce que la solution substrat soit à température ambiante (18-28°C) avant son utilisation à l'étape 11.

11. Ajouter 100 µl de substrat TMB à chaque puits.
12. Couvrir la microplaque avec un adhésif et la placer sur un agitateur programmé à 600 rpm, en veillant à ce qu'elle soit protégée de la lumière directe et durant 30 minutes (± 5 min) à 18-28°C.
13. Ajouter 100 µl de solution Stop à tous les puits. Enlever toutes les bulles d'air au moyen d'une pointe de pipette. Passer à l'étape 14 dans les 30 minutes.
14. Mesurer l'absorbance à 450 nm au moyen d'un lecteur de microplaque.

RESULTATS

Courbe d'étalonnage : Mesurer l'absorbance à 450 nm des puits contenant les calibrateurs, Tampon d'incubation et le réactif « Blanc ». Calculer la moyenne des deux valeurs d'absorbance obtenues, soustraire la moyenne des blancs et enregistrer les valeurs d'absorption moyenne nette. Calculer la liaison (B) en pourcentage du Tampon d'incubation (B₀) pour chaque paire de calibrateur en fixant l'absorbance « blanc »-corrigée du Tampon d'incubation à 100%.

$$B/B_0 (\%) = \% \text{ de liaison} = \frac{\text{absorbance nette}}{\text{absorbance nette du Calibrateur Zéro}} \times 100$$

Reporter le pourcentage de liaison (axe vertical) contre la concentration de mélatonine en pg/ml (axe horizontal) sur un papier millimétré (lin/log).

Tracer la courbe d'étalonnage ou la calculer au moyen d'un algorithme de régression à 4 paramètres.

Echantillons et contrôles: Mesurer l'absorbance à 450 nm de chaque échantillon.

Soustraire la moyenne des blancs et enregistrer les valeurs d'absorption nette. Calculer le pourcentage de liaison par rapport au Tampon d'incubation (B₀) comme décrit plus haut, en fixant l'absorbance « blanc »-corrigée du Tampon d'incubation à 100%.

Reporter le rapport B/B₀ sur la courbe d'étalonnage et lire la concentration de mélatonine correspondante (en pg/ml) sur l'axe horizontal.

Cf. Figure 1 et Table 11 pour des exemples de résultats et de courbes d'étalonnage obtenus. *Ces résultats et courbes d'étalonnage sont donnés à titre d'exemple uniquement. Une courbe d'étalonnage doit être générée pour chaque série d'échantillons à doser.*

Standardisation : Direct Saliva MELATONIN ELISA est calibré avec UV/VIS: $\epsilon_{278} = 6300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in méthanol.

CONTROLE DE QUALITE

Une compréhension approfondie de ce manuel est nécessaire à l'utilisation correcte de ce produit. Des résultats fiables ne seront obtenus que par un travail en laboratoire précis (bonnes pratiques de laboratoire usuelles) et en suivant fidèlement les recommandations de cette brochure.

Comme il n'existe pas de contrôles salivaires de mélatonine commercialement disponibles, nous recommandons d'utiliser des pools salivaires présentant différents taux de mélatonine. Tous les contrôles doivent avoir une valeur comprise entre les limites de confiance établies. Les limites de confiance des contrôles sont spécifiques à chaque lot et sont indiquées sur la feuille de QC contenue dans chaque trousse.

La reproductibilité des paramètres de la courbe d'étalonnage ainsi que des valeurs des contrôles devrait être comprise dans le domaine des valeurs attendues établies par chaque laboratoire. Si la précision des mesures ne correspond pas aux limites établies et que les répétitions excluent toute erreur technique, il est recommandé de contrôler les paramètres suivants: i) pipetage, appareils de mesure de température et de temps, ii) calibrage des instruments, iii) date de péremption des réactifs, iv) conditions de stockage et d'incubation, v) le Substrat TMB devrait être incolore and vi) pureté de l'eau.

LIMITATIONS DE PERFORMANCE

Les résultats du test doivent être interprétés en tenant compte des informations résultant de l'examen clinique du patient et d'autres procédures diagnostiques.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Précision Intra-essai (Même essai) : 12.6%. La précision intra-essai a été calculée à partir des résultats de quatre échantillons de salive différents, mesurés 10 fois en double dans un essai unique. Les résultats sont présentés en Table 12.

Précision Inter-essai (d'un essai à l'autre) : 22.9%. La précision inter-essai a été calculée à partir des résultats de 5 échantillons lors de 17 essais différents. Les résultats sont présentés en Table 13.

Linéarité/Parallélisme de dilution : 92.2%. Trois échantillons de salive avec de fortes teneurs en mélatonine ont été dilués séquentiellement avec du tampon d'incubation et dosé selon la procédure d'essai. Les résultats sont présentés en Table 14.

Etant donné la matrice complexe des échantillons de salive, la dilution avec du tampon d'incubation à un taux supérieur à 1:8 induira une linéarité moindre. Par conséquent, la dilution de l'échantillon par du tampon d'incubation à un taux supérieur à 1:4 n'est pas recommandée.

Récupération sur échantillon dopé (spiking) : 97.9%. Deux échantillons de salive provenant du même donneur, l'un collecté en journée et l'autre en soirée, ont été titrés l'un en comparaison avec l'autre dans 2 essais indépendants. Les résultats sont présentés en Table 15.

Etant donné la nature complexe et la variabilité individuelle de la matrice salivaire, le spiking direct de la salive par de la mélatonine peut conduire à des taux de récupération inférieurs.

Limite de Détection (LoB) : 0.5 pg/ml. 32 puits de tampon d'incubation (Calibrateur zéro) ont été déterminés au cours de deux essais indépendants. La concentration minimale détectable dans 0.1 ml de tampon d'incubation a été calculée en soustrayant deux déviations standard des valeurs moyennées de référence de l'OD du calibrateur zéro et en intersectant cette valeur avec la courbe du standard obtenu dans le même essai.

Limite de Détection (LoQ) : 1.6 – 20.5 pg/ml. La limite de quantification de cet essai représente la concentration en mélatonine dans la salive qui peut être mesurée avec un coefficient de variation inter-essai (CV) de moins de 30%. La valeur de LoQ a été déterminée à partir de 7 échantillons différents dans la gamme de concentration 1.3-47.3 pg/ml, chaque échantillon étant mesuré 17 fois en double dans des essais indépendants.

Spécificité : La liaison 50% (réactivité croisée) de l'antisérum de mélatonine avec différents composés a été testée au moyen du Direct Saliva Melatonin Radioimmuno-

assay (RK-DSM) produit par BÜHLMANN AG et les résultats sont présentés en Table 16.

METHODE DE COMPARAISON

La comparaison a été effectuée sur 78 échantillons de salive provenant de 10 donneurs différents collectés à différentes heures du jour. Les échantillons ont été analysés en employant le test EK-DSM présenté ainsi que le Direct Saliva Melatonin Radioimmunoassay (RK-DSM) produit par BÜHLMANN AG. L'analyse subséquente par régression linéaire a donné comme résultat un facteur de corrélation $R^2 = 0.84$, une ordonnée de 0.77 pg/ml et une pente de 1.21. La corrélation est présentée au tableau Figure 3.

USO

Il dosaggio BÜHLMANN ELISA per la Melatonina Diretta su Saliva (EK-DSM) è concepito per la determinazione quantitativa diretta della melatonina nella saliva umana (1-4).

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il Dosaggio BÜHLMANN ELISA per la Melatonina Diretta su Saliva è un immunodosaggio competitivo che utilizza una tecnica basata su un anticorpo a cattura (Ab). L'anticorpo policlonale Kennaway G280 anti-melatonina (5,6) è stato coattato sulla micropiastra, fornita nel kit. Dopo la prima incubazione di 16-20 ore durante la notte, la melatonina presente nei pretrattati campioni, controlli e calibratori, compete con la melatonina biotinilata durante una seconda incubazione di 3 ore per i siti di legame di questo anticorpo altamente specifico. Dopo lavaggio, viene aggiunto il marcato enzimatico, streptavidina coniugata con perossidasi di rafano (HRP) che si lega durante una terza incubazione da 60 minuti ai complessi melatonina-biotina-anticorpo catturati su pozzetti coattati. Il marcato enzimatico non legato viene quindi rimosso attraverso un secondo lavaggio, e viene aggiunto il Substrato TMB (tetrametilbenzidina) ai pozzetti. Durante una quarta incubazione di 30 minuti, si ha la formazione di un prodotto colorato in maniera inversamente proporzionale al quantitativo di melatonina presente nel campione. Il colore diventa da blu a giallo dopo l'aggiunta della soluzione bloccante acidica e può essere misurato a 450 nm.

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
Soluzione di Pretrattamento	1 flacone 5 ml	B-EKDSM-PRS	Pronto all'uso Agente corrosivo
Soluzione Neutralizzante	1 flacone 5 ml	B-EKDSM-NS	Pronto all'uso Agente irritante
Micropiastra Precoattata con ac G280 anti-melatonina	Pozzetti da 12x8	B-EKDSM-MP	Lavare 2x prima dell'uso
Foglio Sigillante	3 fogli		
Tampone di Lavaggio Concentrato (10x) Con conservanti	1 flacone 100 ml	B-EKDSM-WB	Diluire con 900 ml di acqua deionizzata
Bianco Reagente¹⁾ liofilizzato	1 flacone 1 ml	B-EKDSM-BR	Aggiungere 1ml di Tampone di incubazione
Tampone incubazione (Calibratore Zero) Tampone privo di melatonina	1 flacone 12 ml	B-EKDSM-IB	Pronto all'uso
Calibratori²⁾ liofilizzati; non pretrattare	5 flaconi 1 ml	B-EKDSM-CASET	Aggiungere 1ml di Tampone di incubazione
Controllo basso/alto³⁾ per pretrattamento vedi pagina 14	2 flaconi 1 ml	B-EKDSM-CONSET	Aggiungere 1ml di Tampone di incubazione
Coniugato Biotina	1 flacone 5,5 ml	B-EKDSM-BC	Pronto all'uso
Marcato enzimatico Streptavidina coniugata con HRP	1 flacone 11 ml	B-EKDSM-EL	Pronto all'uso
Substrato TMB Tamponato con citrato e H ₂ O ₂	1 flacone 11 ml	B-TMB	Pronto all'uso
Soluzione Bloccante 0.25 M di acido solforico	1 flacone 11 ml	B-SS	Pronto all'uso

Table 7

¹⁾ Il Bianco reagente contiene una soluzione saturata di melatonina. Prevenire la contaminazione con altri componenti del Kit.

²⁾ Calibratori A, B, C, D e E contengono le seguenti concentrazioni di melatonina: 0.48, 1.2, 3.2, 10 and 20 pg/ml che sono corrette con una diluizione del campione al 20% durante il pretrattamento e quindi, marcati rispettivamente con 0.6, 1.5, 4.0, 10, e 25 pg/ml di melatonina.

³⁾ Per i quantitativi lotto specifici di melatonina vedi il foglio aggiuntivo contenente i dati di QC.

CONSERVAZIONE ED EMIVITA DEI REAGENTI

Reagenti aperti e non utilizzati	
Conservarli a 2-8°C fino alla data di scadenza stampata sulle etichette. Non usare oltre la data di scadenza del kit.	
Reagenti Aperti/Ricostituiti	
Micropiastra	Riporre le strip non utilizzate immediatamente nella confezione contenente essiccante e risigillare la busta. Conservare fino a 2 mesi a 2-8°C.
Reagente di Pretrattamento	Conservare a 2-8°C fino alla data di scadenza stampata sulle etichette.
Soluzione Neutralizzante	
Tampone di incubazione	
Tampone di Lavaggio diluito	Conservare fino a 6 mesi a 2-8°C.
Bianco Reagente	Conservare fino a 4 mesi a 2-8°C.
Calibratori	
Controlli	
Coniugato Biotina	Conservare a 2-8°C fino alla data di scadenza stampata sulle etichette.
Marcato Enzimatico	
Substrato TMB	
Soluzione Bloccante	

Table 8

PRECAUZIONI

PRECAUZIONI DI SICUREZZA

- La Micropiastra (B-EKDSM-MP) di questo kit contiene componenti di origine umana. Benché testati e risultati negativi all'antigene di superficie HBV e agli anticorpi HCV e HIV1/2, i reagenti devono essere maneggiati come potenzialmente infettivi e secondo le buone pratiche di laboratorio utilizzando le dovute precauzioni.
- Soluzione di pretrattamento/neutralizzante, substrato e soluzione stoppante:** la soluzione di pretrattamento (B-EKDSM-PRS) contiene sodio idrossido (NaOH) e la soluzione neutralizzante (B-EKDSM-NS) contiene acido cloridrico (HCl). Il substrato di TMB (B-TMB) contiene tetrametilbenzidina, perossido d'idrogeno (H₂O₂) e dimetilformamide. La soluzione stoppante (B-ST) contiene acido solforico (0.25 M). Ciascuno di questi reagenti è irritante per gli occhi, la pelle e le mucose. Evitare il contatto con occhi, pelle e vestiario. Indossare indumenti protettivi, guanti e protezioni per gli occhi. Se viene a contatto con gli occhi, la pelle e gli indumenti lavarsi immediatamente con molta acqua. Se viene a contatto con gli occhi, la pelle e gli indumenti lavarsi immediatamente con molta acqua.

PRECAUZIONI TECNICHE

Reagenti

- Residui rimasti nei pozzetti** sono causati dal processo di produzione. Questi residui vengono completamente eliminati dai lavaggi durante la procedura descritta e non compromettono in alcun modo i risultati. (fare riferimento al punto 3 delle istruzioni per l'uso).
- Leggere attentamente le istruzioni prima di eseguire il test. Le prestazioni del test subiranno un effetto negativo se si utilizzano reagenti diluiti in modo errato, modificati o conservati diversamente da come specificato nelle presenti istruzioni per l'uso.
- I componenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza riportata sulle etichette.
- Non miscelare reagenti appartenenti a lotti diversi.
- Lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente. Ricostituire i reagenti liofilizzati secondo le indicazioni. Miscelare bene (agitare in modo vorticoso) i reagenti prima dell'uso.

- I micropozzetti non possono essere riutilizzati.

Procedura

- Il bianco reagente contiene una soluzione saturata di melatonina. Evitare la contaminazione con gli altri componenti del dosaggio. Cambiare i puntali per ogni nuovo passo.
- Il test è ottimizzato per la procedura SleepCheck. Con tale procedura, il bianco reagente e i calibratori vengono analizzati in duplicato, mentre i controlli e i campioni dei pazienti vengono misurati in singolo. Questa metodica consente di analizzare 16 profili individuali (5 punti) in ogni piastra per microtitolazione. Per procedure diverse da SleepCheck si raccomanda di effettuare le determinazioni in duplicato.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Pipette di precisione con puntali monouso da: 5 µl, 50 µl, 100 µl e 1 ml. Multipipetta per i volumi di 50 µl e 100 µl.
- Provette monouso di polistirene o polipropilene per la preparazione delle diluizioni
- Cilindro da 1000 ml o flacone a spruzzo per la diluizione del Tampone di Lavaggio
- Carta Blottante
- Frigorifero
- Rotatore per micropiastra
- Lettore per micropiastra per la misurazione dell'assorbanza a 450nm
- BÜHLMANN Saliva Collection Devices, B-SLEEPCHECK16 o B-SVC (50).

NOTE PROCEDURALI PER IL PRELIEVO DEI CAMPIONI

Raccogliere la saliva tramite il dispositivo per il prelievo di saliva BÜHLMANN. Il dispositivo è in grado di assorbire fino a 3 ml di saliva. Per la procedura è necessaria una quantità di saliva inferiore a 0,2 ml.

Il prelievo di saliva è un'operazione semplice, che può essere effettuata comodamente presso il domicilio del paziente; si raccomanda, tuttavia, di rispettare le precauzioni seguenti.

Leggere con attenzione le istruzioni prima di iniziare il prelievo della saliva. I risultati saranno tanto più affidabili, quanto più ci si attiene con precisione alle istruzioni.

Il paziente deve dedicare una serata al test evitando, per quanto possibile, le attività sportive e qualsiasi tipo di sforzo intenso.

Luce: la luce intensa può inibire la produzione di melatonina. Pertanto, è importante evitare la luce intensa durante l'esecuzione del test. È preferibile utilizzare la luce attenuata di una lampada da lettura o del televisore.

Cibo: nella fase di prelievo del campione non devono essere assunti cibi. L'ultimo pasto deve essere stato consumato almeno 30 minuti prima dell'inizio del prelievo del campione. Nell'intera giornata precedente il prelievo del campione non devono essere consumate né banane, né cioccolato.

Bevande: nella sera destinata al prelievo del campione non è concesso il consumo di bevande contenenti coloranti artificiali, caffeina (caffè, tè nero o tè verde, tè freddo, coca cola) o alcool.

Medicinali: se possibile, il giorno del prelievo del campione non devono essere assunti acido acetilsalicilico e medicinali contenenti ibuprofene (Algiofor, Brufen,

Dysmenol, Dolocyl, Ecoprofen). Se il sonno o il ritmo sonno-veglia vengono regolati con melatonina, l'utilizzo di quest'ultima deve essere interrotto almeno una settimana prima del prelievo del campione.

MODALITÀ DI PRELIEVO DEI CAMPIONI



- 1 Prima di iniziare il prelievo dei campioni, etichettare le provette. Riportare nome, data di nascita, data e ora del prelievo.



- 2 Quindici minuti prima del prelievo di ciascun campione di saliva, risciacquare con cura la bocca con acqua.



- 3 Aprire il tappo della provetta (il tampone è all'interno del tappo) e rimuoverlo.



- 4 Inserire il tampone direttamente in bocca, senza toccarlo con le dita.



- 5 Posizionare il tampone tra i denti e la guancia e muoverlo con la lingua per 3-5 minuti, fintanto che non sia ben imbevuto di saliva.



- 6 Estrarre il tampone dalla bocca e riporlo direttamente nella provetta, senza toccarlo con le dita.



- 7 Servendosi del tappo, spingere il tampone nella provetta e chiudere il tappo. Per la determinazione del profilo della melatonina, ripetere le fasi da 1 a 7.

Conservare i campioni in frigorifero a 2-8 °C.

TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Trasporto: i campioni di saliva devono essere inviati al laboratorio entro due giorni. Le provette di saliva utilizzate devono essere conservate in frigorifero a 2-8 °C.

I campioni non devono essere inviati in laboratorio il venerdì, il sabato o in un giorno prefestivo.

Conservazione: i campioni di saliva contenuti nel tampone di cotone possono essere conservati nel dispositivo per il prelievo della saliva per un massimo di 7 giorni a 2-8 °C. Se non vengono analizzati entro una settimana dopo il prelievo, i campioni devono essere congelati e possono essere conservati per almeno 6 mesi a ≤ -20 °C. Evitare cicli ripetuti di congelamento-scongelo.

piastra per microtitolazione. Per procedure diverse da SleepCheck si raccomanda di effettuare le determinazioni in duplicato.

PRETRATTAMENTO DEI CAMPIONI (LABORATORIO)

Recupero del campione dei dispositivi per il prelievo di saliva

Centrifugare le provette inviate dal paziente per circa 5 min a 3000 rpm (~1500x g). Eliminare l'inserito con il tampone e conservare la provetta a 2-8 °C o -20°C.

Campioni di Saliva e Controlli

- Dispensare 200 µl rispettivamente di controlli e di campioni di saliva in provette di polipropilene pulite e contrassegnate in maniera corrispondente.
- Aggiungere 25 µl di soluzione di pretrattamento ad ogni provetta utilizzando un multipipettatore.
- Vortexare per 5 secondi e lasciar riposare le provette per 10 minuti.
- Aggiungere 25 µl di soluzione neutralizzante in ogni provetta utilizzando un multipipettatore. Vortexare per 5 secondi.
- Centrifugare i campioni pretrattati per 5 min a 10.000 rpm. Iniziare la procedura ELISA.

PROCEDURA DEL DOSAGGIO

1. Utilizzare una piastra con strip da 8-pozzetti sufficienti per testare il numero desiderato di Bianco Campione, Standard, Controlli e campioni. Rimuovere le strip in eccesso dal supporto e risigillarle **immediatamente** nella confezione insieme alle due buste di essicante. Conservarle refrigerate.
2. Lavare le strip coattate due volte usando almeno 300 µl di Tampone di Lavaggio per pozzetto. Svuotare i pozzetti e scuotere energicamente la piastra su carta blottante.
- 3a. Dispensare 100 µl di Bianco Reagente in duplicato nei pozzetti A1+A2.
- 3b. Dispensare 100 µl di Calibratore Zero in duplicato nei pozzetti B1+B2.
- 3c. Dispensare 100 µl di Calibratore A in duplicato nei pozzetti C1+ C2
Dispensare 100 µl di Calibratore B in duplicato nei pozzetti D1+D2 ecc.
- 3d. Dispensare 100 µl di Controllo Basso pretrattato nel pozzetto H1.
Dispensare 100 µl di Controllo Alto pretrattato nel pozzetto H2.
- 3e. Dispensare 100 µl di ogni campione pretrattato in singoli nei pozzetti successivi.
4. Coprire la piastra con un foglio sigillante e incubare per 16-20 ore a 2-8°C.
5. Rimuovere ed eliminare il foglio sigillante. Aggiungere 50 µl di Coniugato Biotina ad ogni pozzetto. Coprire la piastra con un foglio sigillante e collocarla su un mixer settato a 600 rpm per 1 minuto.
6. Incubare per 3 ore (±5 minuti) a 2-8°C.
7. Rimuovere ed eliminare il foglio che sigilla la piastra. Aspirare o capovolgere la piastra per svuotare la soluzione da ciascun pozzetto e lavarlo quattro volte utilizzando almeno 300 µl di tampone di lavaggio per pozzetto. Svuotare i pozzetti e scuotere energicamente la piastra su carta blottante.
8. Aggiungere 100 µl di Marcato Enzimatico (soluzione gialla) a tutti i pozzetti.
9. Coprire la piastra con un nuovo foglio sigillante, collocare la piastra su di un mixer settato a 600 rpm ed incubare per 60 minuti (±5 minuti) a 18-28°C.
10. Rimuovere ed eliminare il foglio che sigilla la piastra. Aspirare o capovolgere la piastra per svuotare la soluzione da ciascun pozzetto e lavarlo quattro volte utilizzando almeno 300 µl di tampone di lavaggio per pozzetto. Svuotare i pozzetti e scuotere energicamente la piastra su carta blottante.

Importante: Fare in modo che la Soluzione di Substrato raggiunga i 18-28°C prima di utilizzarla al punto 10.

11. Aggiungere 100 µl di Soluzione di Substrato a tutti i pozzetti.
12. Coprire la piastra con un nuovo foglio sigillante, collocare la piastra su un mixer settato a 600 rpm, proteggere la piastra dalla luce diretta ed incubarla per 30±5 minuti a 18-28°C.
13. Rimuovere ed eliminare il foglio sigillante. Aggiungere 100 µl di Soluzione Bloccante a tutti i pozzetti. Eliminare le bolle d'aria con una pipetta. Procedere al punto 13 entro 30 minuti.
14. Leggere l'assorbanza a 450 nm in un lettore per micropiastre.

RISULTATI

Curva Standard: Annotare l'assorbanza a 450 nm per ciascun calibratore e pozzetto bianco (NSB). Calcolare la media dei valori in duplicato, sottrarre la media dei pozzetti bianchi (NSB) ed annotare le medie (=assorbanza media corretta). Calcolare il legame (B) di ciascuna coppia di pozzetti dei calibratori come percentuale del Calibratore Zero (B₀), con l'assorbanza corretta con NSB del Calibratore Zero preso al 100 %.

$$B/B_0 (\%) = \text{percent bound} = \frac{\text{net absorbance}}{\text{net absorbance of Zero Calibrator}} \times 100$$

Tracciare il legato percentuale (asse verticale) verso la concentrazione di melatonina in ng/ml (asse orizzontale) utilizzando della carta per grafici lin/log. Tracciare la curva migliore o calcolare la curva standard utilizzando un algoritmo a quattro parametri.

Campioni e Controlli: Annotare l'assorbanza a 450 nm per ciascun pozzetto campione. Sottrarre la media dei pozzetti bianchi ed annotare il valore. Calcolare, come più sopra descritto, il legame di ciascuna coppia di pozzetti campione come percentuale del Calibratore Zero (B₀), con l'assorbanza corretta con NSB del Calibratore Zero preso al 100%. Collocare il valore B/B₀ dei campioni sull'asse verticale, tracciare una linea orizzontale che interseca la curva standard e leggere la concentrazione di melatonina (ng/ml) dall'asse orizzontale.

Vedi Figure 1 e Table 11 per esempi di risultati e curve standard. *Questi risultati e le curve standard sono a solo scopo di dimostrazione. Una curva standard deve essere generata per ciascun set di campioni da dosare.*

Standardizzazione: Direct Saliva Melatonin ELISA è calibrato con UV/VIS: £278 = 6300 M⁻¹cm⁻¹ nel metanolo.

CONTROLLO QUALITA'

Occorre attenersi scrupolosamente a quanto descritto in questa metodica per poter utilizzare al meglio il prodotto. Risultati affidabili potranno essere ottenuti solo utilizzando tecniche di laboratorio precise (attuali linee guida GLP) e seguendo accuratamente le istruzioni per l'utilizzo.

Poichè non esistono controlli per la melatonina disponibili in commercio, consigliamo di utilizzare pool di saliva che contengono livelli diversi di melatonina per i controlli di qualità interni. La riproducibilità dei parametri della curva standard e dei valori dei controlli deve essere entro limiti stabiliti dall'accettabilità del laboratorio. I limiti di confidenza per i Controlli sono lotto-specifici e stampati nel Foglio di QC Aggiuntivo.

Se la precisione del dosaggio non correla con i limiti stabiliti e la ripetizione esclude errori nella tecnica, verificare quanto segue: i) dispensazione, controllo della temperatura e

dispositivi di rilevazione del tempo ii) settaggio del lettore ELISA, iii) date di scadenza dei reagenti iv) condizioni di conservazione e di incubazione v) la Soluzione di Substrato TMB deve essere incolore, vi) purezza dell'acqua

AG. L'analisi della regressione lineare ha evidenziato un fattore di correlazione $R^2 = 0,84$, un'intercetta di 0,77 pg/ml e una pendenza di 1,21. La correlazione è riportata in Figure 3.

LIMITI DELLE PRESTAZIONI

I risultati del test vanno interpretati insieme alle informazioni derivanti dagli studi epidemiologici, dalla valutazione clinica del paziente e da altre procedure diagnostiche.

CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE

Precisione intra-dosaggio (all'interno della stessa seduta): 12,6%. La precisione intra-dosaggio è stata calcolata dai risultati ottenuti con quattro campioni di saliva differenti all'interno dell'ambito standard, misurati 10 volte in duplicato in un'unica seduta. I risultati sono riportati in Table 12.

Precisione inter-dosaggio (da una seduta all'altra): 22,9%. La precisione inter-dosaggio è stata calcolata dai risultati ottenuti in 17 sedute diverse con 5 campioni all'interno dell'ambito standard. I risultati sono riportati in Table 13

Linearità di diluizione/parallelismo: 92,2%. Tre campioni di saliva con quantitativi elevati di melatonina sono stati diluiti sequenzialmente con tampone di incubazione e analizzati secondo procedura. I risultati sono riportati in Table 14.

A causa della complessa composizione dei campioni di saliva, le diluizioni con tampone di incubazione superiori a 1:8 danno origine a una linearità ridotta. Pertanto, si sconsigliano le diluizioni dei campioni con tampone di incubazione superiori a 1:4.

Recupero: 97,9%. Due campioni di saliva dello stesso donatore, di cui uno prelevato durante il giorno e uno prelevato durante la notte, sono stati titolati l'uno contro l'altro e analizzati due volte, indipendentemente, secondo procedura. I risultati sono riportati in Table 15.

A causa della complessa e peculiare composizione della saliva, l'aggiunta diretta di melatonina alla saliva può essere causa di percentuali di recupero ridotte.

Limite del Bianco (LoB): 0,5 pg/ml. Trentadue pozzetti contenenti tampone di incubazione (calibratore zero/riferimento) sono stati analizzati in due sedute differenti. La concentrazione minima rilevabile in 0,1 ml di tampone di incubazione è stata calcolata sottraendo due deviazioni standard della media dei valori di riferimento dalla OD del calibratore zero e intersecando tale valore con la curva standard ottenuta nella medesima seduta.

Limite di Quantificazione (LoQ): 1,6 – 20,5 pg/ml. Il limite di quantificazione di questo dosaggio è la concentrazione di melatonina nella saliva che può essere misurata con un coefficiente di variazione inter-dosaggio (CV) inferiore al 30%. Il LOQ è stato determinato con 7 campioni differenti di 1,3 – 47,3 pg/ml e ogni campione è stato misurato 17 volte in duplicato in sedute indipendenti.

Specificità: il legame al 50% (reattività crociata) del siero anti-melatonina con diversi composti è stato analizzato con il dosaggio radioimmunologico diretto della melatonina su saliva (RK-DSM) di BÜHLMANN AG; i risultati sono riportati in Table 16.

CONFRONTO DEI METODI

Il confronto è stato effettuato con 78 campioni di saliva di 10 donatori differenti, prelevati in diversi momenti della giornata. I campioni sono stati analizzati con il dosaggio EK-DSM descritto e con il dosaggio radioimmunologico diretto della melatonina su saliva (RK-DSM) di BÜHLMANN

USO PREVISTO

El ELISA directo de melatonina en saliva (EK-DSM) de BÜHLMANN está diseñado para la determinación cuantitativa directa de melatonina en saliva humana, así como en muestras extraídas de suero, plasma u orina (1-4).

PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO

El ELISA directo de melatonina en saliva de BÜHLMANN es un inmunoanálisis competitivo que utiliza una técnica de anticuerpo (Ac) de captura. El anticuerpo policlonal anti-melatonina Kennaway G280 (5,6) recubre la placa de microtitulación suministrada con el kit. Después de las primeras 16-20 horas de incubación excesiva de la noche, la melatonina en la saliva pretratada, los controles y los calibradores, compiten con la melatonina biotinilada durante segundas 3 horas de incubación para los sitios obligatorios de este anticuerpo altamente específico. Después del lavado, se añade el marcador de enzima, estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP), el cual se une durante un segundo paso de incubación de 60 minutos a los complejos anticuerpo-melatonina-biotina capturados en los pocillos recubiertos. Después se elimina el marcador de enzima sin unir con un segundo paso de lavado y se añade el substrato de TMB (tetrametilbenzidina) a los pocillos. En un tercer paso de incubación de 30 minutos se forma un producto coloreado en proporción inversa a la cantidad de melatonina presente en la muestra. El color vira de azul a amarillo con la adición de una solución de interrupción ácida y puede medirse a 450 nm.

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidades	Código	Reconstitución
Solución de pretratamiento	1 vial 5 ml	B-EKDSM-PRS	Listo para usar Agente corrosivo
Solución neutralizante	1 vial 5 ml	B-EKDSM-NS	Listo para usar Agente irritante
Placa de microtitulación Recubierta con Ac anti-melatonina G280	12x8 pocillos	B-EKDSM-MP	Lavar dos veces antes de usar
Sellador de placas	3 unidades		
Tampón de lavado concentrado (10x) con conservantes	1 botella 100 ml	B-EKDSM-WB	Diluir con 900 ml de agua desionizada
Reactivo blanco¹⁾	1 vial 1 ml	B-EKDSM-BR	Añadir 1 ml de tampón de incubación
Tampón de incubación tampón sin melatonina;	1 vial 5 ml	B-EKDSM-IB	Listo para usar
Calibradores²⁾ liofilizado; no pretrate	5 viales 1 ml	B-EKDSM-CASET	Añadir 1 ml de tampón de incubación
Controles bajo/alto³⁾ para el tratamiento previo vea la página 19	2 viales 1 ml	B-EKDSM-CONSET	Añadir 1 ml de tampón de incubación
Conjugado de biotina	1 vial 5,5 ml	B-EKDSM-BC	Listo para usar
Marcador de enzima estreptavidina conjugada con HRP	1 vial 11 ml	B-EKDSM-EL	Listo para usar
Substrato TMB tamponado con citrato y H ₂ O ₂	1 vial 11 ml	B-TMB	Listo para usar
Solución de interrupción Ácido sulfúrico 0,25 M	1 vial 11 ml	B-SS	Listo para usar

Tabla 9

¹⁾ El reactivo que esconde contiene una solución saturada de melatonina. Prevenga cualquier contaminación de otros reactivos del kit.

²⁾ Los calibradores A, B, C, D y E contienen las siguientes concentraciones de melatonina: 0,48, 1,2, 3,2, 8,0 y 20 pg/ml corregidas para la dilución de

la muestra al 20% durante el pretratamiento y, por lo tanto, etiquetados con 0,6, 1,5, 4,0, 10 y 25 pg/ml de melatonina, respectivamente.

³⁾ Cantidad de melatonina específica del lote. Consulte la hoja de datos de control de calidad incluida en el kit.

ALMACENAMIENTO Y DURACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivos sin abrir	
Almacénese a 2-8°C. No utilice el kit pasada la fecha de caducidad. Todos los componentes del kit son estables a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.	
Reactivos abiertos / reconstituidos	
Placa de microtitulación	Guarde inmediatamente las tiras que no ha utilizado en la bolsa de aluminio que contiene los sacos desecantes y vuelva a cerrarla completamente por toda la cremallera. Almacénese hasta 2 meses a 2-8°C.
Reactivo de pretratamiento	Almacénese a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas
Solución neutralizante	
Tampón de incubación	
Tampón de lavado	Estable en 2-8°C hasta 6 meses.
Reactivo blanco	Estable en 2-8°C hasta 4 meses.
Calibradores	
Controles	
Conjugado de biotina	Almacénese a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas
Marcador de enzima	
Substrato TMB	
Solución de interrupción	

Tabla 10

PRECAUCIONES

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- La placa de microtitulación (B-EKDSM-MP) de este kit contiene componentes de origen humano. Aunque se ha comprobado y encontrado negativo para el antígeno de superficie de HBV y anticuerpos HCV y VIH1/2, los reactivos deben manipularse como si fueran capaces de transmitir infecciones y deben manejarse de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio, tomando las precauciones adecuadas.
- Solución de pretratamiento, solución neutralizante, solución substrato y solución de interrupción:** La solución de pretratamiento (B-EKDSM-PRS) contiene hidróxido de sodio (NaOH) y la solución neutralizante (B-EKDSM-NS) contiene ácido clorhídrico (HCl). La solución substrato (B-TMB) contiene tetrametilbenzidina (TMB), peróxido de hidrógeno y dimetilformamida. La solución de interrupción (B-STS) contiene ácido sulfúrico. Los dos reactivos pueden irritar los ojos, la piel y las membranas mucosas. Evite el contacto con los ojos, la piel y la ropa.
- En cuanto a las precauciones adecuadas para la eliminación de los reactivos del kit, recomendamos encarecidamente consultar con anterioridad la normativa local específica de su país.

PRECAUCIONES TÉCNICAS

- Residuos pueden formarse en los pocillos** durante el proceso de la producción. Ellos están eliminados completamente durante lavar los pocillos y no tienen ninguna influencia en los resultados (véase a punto 3 de la instrucción de uso).
- Lea atentamente las instrucciones antes de realizar el ensayo. El rendimiento del ensayo se verá gravemente afectado si los reactivos son incorrectamente diluidos, modificados o almacenados en condiciones distintas a las que se detallan en estas instrucciones de uso.
- Los componentes no deben utilizarse después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.
- No mezcle diferentes lotes de reactivos.

- Debe hacerse todo lo posible para garantizar que no se produzca contaminación cruzada entre reactivos, muestras o entre pocillos.
- Deje atemperar los reactivos hasta que alcancen la temperatura ambiente. Mezcle bien (con agitador de vórtice) los reactivos antes de su uso.
- Los micropocillos no pueden ser reutilizados.

Procedimiento

- El reactivo blanco contiene una solución saturada de melatonina. Evitar la contaminación con los otros componentes del test. Cambiar las puyas para todo paso. Para evitar la contaminación cruzada, asegúrese de no intercambiar los tapones de los calibradores.
- El procedimiento de análisis se ha optimizado para la aplicación de SleepCheck. Por lo tanto, el reactivo blanco y los calibradores se analizan por duplicado, mientras que los testigos y las muestras de los pacientes se miden en determinaciones únicas. Este método permite analizar 16 perfiles individuales (cinco puntos) por placa de microtitulación. Para aplicaciones distintas a SleepCheck, se recomiendan determinaciones por duplicado.

MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

- Pipetas de precisión con puntas desechables: pipetas de 5 µl, 50, 100 µl y 1 ml.
- Pipetas de repetición o pipetas de varios canales para 50 y 100 µl.
- Tubos desechables de poliestireno o polipropileno para la preparación de las diluciones de muestra.
- Cilindro de 1000 ml para la dilución del tampón de lavado.
- Lavador de placas de microtitulación o botella flexible para el tampón de lavado.
- Papel secante.
- Nevera
- Agitador de placas de microtitulación.
- Lector de placas de microtitulación para la medición de la absorbancia a 450 nm.
- BÜHLMANN Saliva Collection Devices, B-SLEEPCHECK16 o B-SVC (50).

NOTAS PARA EL PROCEDIMIENTO DE RECOGIDA DE MUESTRAS

Recoja muestras de saliva con ayuda del dispositivo de recogida de saliva BÜHLMANN. El dispositivo puede absorber hasta 3 ml de saliva. El procedimiento requiere < 0,2 ml de saliva.

La recogida de muestras de saliva es sencilla y puede efectuarse en el domicilio del paciente para su comodidad; sin embargo, se recomiendan las siguientes precauciones:

Lea atentamente las instrucciones antes de comenzar la recogida de la muestra de saliva. Cuanto más cuidado se ponga en seguir las instrucciones, más fiables serán los resultados.

El paciente deberá reservar una noche para esta prueba, evitando, en lo posible, actividades deportivas y cualquier esfuerzo intenso.

Luz: La luz intensa puede suprimir la producción de melatonina. Por lo tanto, es importante evitar la luz intensa durante la prueba. Es preferible la luz atenuada de una lámpara de lectura o de la televisión.

Comida: No debe comerse nada durante el tiempo de recogida de la muestra. La última comida debe tomarse por lo menos antes del comienzo de la recogida. En todo el día antes de la recogida no deben comerse ni plátanos ni chocolate.

Bebida: En la noche de la recogida no se permiten las bebidas que contienen colorantes artificiales, cafeína (café, té negro o verde, té helado, bebidas de cola) ni alcohol.

Medicamentos: En el día de la recogida, si es posible, no deberán tomarse ni aspirina ni medicamentos que contengan ibuprofeno (Algiofor, Brufen, Dysmenol, Dolocyl, Ecoprofen). Si su ritmo de sueño o de sueño-vigilia se trata con melatonina, este medicamento debe suspenderse por lo menos una semana antes de la recogida de la muestra.

MODO DE RECOGIDA



- 1 Antes de comenzar la recogida, rotule los tubos. Escriba el nombre, la fecha de nacimiento, y la fecha y hora de la recogida.



- 2 Quince minutos antes de cada muestra de saliva, enjuáguese bien la boca con agua.



- 3 Abra la parte superior del tubo (el hisopo está en la parte superior) y retírela del tubo.



- 4 Colóquese el hisopo en la boca, directamente desde la parte superior, sin tocarlo con los dedos.



- 5 Coloque el hisopo entre los dientes y el carrillo, y muévelo en círculos con la lengua, durante tres a cinco minutos, hasta que el hisopo se moje bien con la saliva.



- 6 Retire el hisopo de la boca, directamente al tubo, sin tocarlo con los dedos.



- 7 Con la parte superior, empuje el hisopo en el tubo y colóquelo en la parte superior. Para la recogida de un perfil de melatonina, repita los pasos 1 a 7, siguiendo las indicaciones.

Conserve las muestras en refrigeración, a una temperatura entre 2 y 8 °C.

ENVÍO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Envío: Las muestras de saliva recogidas deben enviarse al laboratorio en un plazo de dos días. Los tubos de recogida de saliva usados deben conservarse en la nevera, a 2 a 8 °C. Las muestras no deben enviarse los días viernes, sábado o víspera de festivos.

Conservación: Las muestras de saliva absorbidas en el hisopo de algodón pueden conservarse en el dispositivo de recogida de saliva durante un periodo de hasta siete días, a una temperatura entre 2 y 8 °C. Si las muestras no se analizan en un plazo de una semana después de su recogida, deberán congelarse y pueden conservarse por lo menos seis meses a una temperatura igual o inferior a -

20 °C. Deben evitarse los ciclos repetidos de congelación y descongelación.

PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS (LABORATORIO)

Recuperación de la muestra del dispositivo de recogida de saliva

Centrifugue los dispositivos de recogida de saliva enviados por el paciente durante un tiempo aproximado de 5 minutos, a 3000 rev/min (~1500x g). Deseche la pieza de inserción suspendida con el hisopo y conserve el tubo a una temperatura entre 2 y 8 °C o -20°C.

Muestras de saliva y controles

- Pipetee 200 µl de controles y muestras de saliva en tubos limpios de polipropileno marcados de la forma correspondiente.
- Añada 25 µl de solución de pretratamiento en cada tubo utilizando un dispositivo multipipeteador.
- Agite los tubos con el vórtex durante 5 segundos y déjelos reposar durante 10 minutos.
- Añada 25 µl de solución neutralizante en cada tubo utilizando un dispositivo multipipeteador. Agite con el vórtex durante 5 segundos.
- Centrifugue las muestras pretratadas durante 5 minutos a 10.000 rev/min. Pase al procedimiento de ELISA.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Utilice una placa con las suficientes tiras de 8 pocillos para probar el número requerido de blancos, calibradores, controles y muestras. Retire las tiras sobrantes del soporte y vuelva a guardarlas en la bolsa de plástico junto con los dos sacos desecantes **sin demora**. Almacénelo refrigerado.
2. Lave dos veces las tiras recubiertas utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.
- 3a. Pipetee 100 µl de reactivo blanco por duplicado en los pocillos A1+A2.
- 3b. Pipetee 100 µl de calibrador cero por duplicado en los pocillos B1+B2.
- 3c. Pipetee 100 µl de calibrador A por duplicado en los pocillos C1+ C2.
Pipetee 100 µl de calibrador B por duplicado en los pocillos D1+D2, etc.
- 3d. Pipetee 100 µl de control pretratado bajo en el pocillo H1.
Pipetee 100 µl de control pretratado alto en el pocillo H2.
- 3e. Pipetee 100 µl de cada muestra pretratada (singular) en los pocillos subsiguientes.
4. Cubra la placa con un sellador de placa e incube por 16-20 horas en 2-8°C.
5. Retire y deseche el sellador de placa. Añada 50 µl de conjugado de biotina en cada pocillo. Cubra la placa con un sellador de placas y colóquela durante 1 minuto en un mezclador de placas ajustado a 600 rev/min.
6. Incube durante 3 horas (± 5 minutos) a **2-8°C**.
7. Retire y deseche el sellador de placa. Aspire o invierta la placa para vaciar la solución de cada pocillo y lave cuatro veces utilizando al menos 300 µl de tampón de lavado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.
8. Añada 100 µl de marcador de enzima (solución amarilla) a todos los pocillos.

9. Cubra la placa con un sellador de placas nuevo, coloque la placa en un mezclador de placas ajustado a 600 rev/min e incube durante 60 minutos (± 5 minutos) a 18-28°C.
 10. Retire y deseche el sellador de placa. Aspire o invierta la placa para vaciar la solución de cada pocillo y lave cuatro veces utilizando al menos 300 µl de tampón de lavado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.
- Importante:** Deje que la solución substrato alcance 18-28°C antes de su uso en el paso 11.
11. Añada 100 µl de la solución substrato a todos los pocillos.
 12. Cubra la placa con un sellador de placas nuevo, coloque la placa en un mezclador de placas ajustado a 600 rev/min, proteja la placa de la luz directa e incube durante 30±5 minutos a 18-28°C.
 13. Retire y deseche el sellador de placa. Añada 100 µl de solución de interrupción a todos los pocillos. Elimine las burbujas de aire pinchándolas con la punta de una pipeta. Continúe con el paso 13 al cabo de 30 minutos como máximo.
 14. Lea la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de microtitulación.

RESULTADOS

Curva estándar: Registre la absorbancia a 450 nm para cada pocillo del calibrador y blanco (NSB). Calcule el promedio de los valores duplicados, résteles el promedio de los pocillos del blanco (NSB) y registre los promedios (= absorbancia media corregida). Calcule la unión (B) de cada par de pocillos del calibrador como un porcentaje del Calibrador cero (B₀), considerando la absorbancia del Calibrador cero corregida por el NSB como el 100%.

$$B/B_0 (\%) = \text{porcentaje unido} = \frac{\text{absorbancia neta}}{\text{absorbancia neta del calibrador cero}} \times 100$$

Represente el porcentaje unido (eje vertical) frente a la concentración de melatonina en ng/ml (eje horizontal) utilizando un papel gráfico semilogarítmico. Dibuje la mejor curva de ajuste o calcule la curva estándar utilizando un algoritmo de cuatro parámetros.

Muestras y controles: Registre la absorbancia a 450 nm para cada pocillo de la muestra. Résteles el promedio de los pocillos del blanco y registre los valores (= absorbancia corregida). Calcule, como se ha descrito anteriormente, la unión de cada par de pocillos de la muestra como un porcentaje del Calibrador cero (B₀), considerando la absorbancia del Calibrador cero corregida por el NSB como el 100%. Localice el valor B/B₀ de las muestras en el eje vertical, dibuje una línea horizontal que corte la curva estándar y lea la concentración de melatonina (ng/ml) en el eje horizontal.

Véanse Table 11 y Figure 1 para ejemplos de resultados y curvas estándar. *Estos resultados y curvas estándar se ofrecen únicamente con propósitos de demostración. Se debe generar una curva estándar para cada conjunto de muestras que se ensaye.*

Estandarización: Direct Saliva Melatonin ELISA está calibrado con UV/VIS: $\epsilon_{278} = 6300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en metanol.

CONTROL DE CALIDAD

Es necesario comprender totalmente estas instrucciones de uso para que la utilización del producto dé unos resultados satisfactorios. Sólo se obtendrán resultados fiables utilizando técnicas de laboratorio precisas (guías de Buenas

Prácticas de Laboratorio actuales) y siguiendo cuidadosamente estas instrucciones de uso.

Puesto que no hay controles para melatonina en saliva disponibles comercialmente, recomendamos el uso de reservas de saliva que contengan distintos niveles de melatonina para los controles de calidad internos. La reproducibilidad de los parámetros de la curva estándar y de los valores de control debe encontrarse dentro de los límites establecidos de aceptabilidad del laboratorio. Los límites de confianza para los controles son específicos del lote y están impresos en la hoja de datos de control de calidad adicional. Si la precisión del ensayo no se correlaciona con los límites establecidos y la repetición excluye errores de la técnica, compruebe los siguientes aspectos: i) instrumentos de pipeteado, control de temperatura y tiempo ii) ajustes del lector de ELISA iii) fechas de caducidad de los reactivos iv) condiciones de almacenamiento e incubación v) la solución sustrato con TMB debe ser incolora vi) pureza del agua.

LIMITACIONES DE RENDIMIENTO

Los resultados del test deben utilizarse como datos suplementarios disponibles para el médico en la elaboración del diagnóstico.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Precisión intraanálisis (dentro de procesos): 12,6%. Se calculó la precisión intraanálisis a partir de los resultados de cuatro muestras diferentes de saliva, dentro de los límites habituales, medidas diez veces por duplicado, en un solo proceso. Los resultados se presentan en: Table 12.

Precisión entre análisis (entre procesos): 22,9%. Se calculó la precisión entre análisis a partir de los resultados de 17 procesos diferentes con cinco muestras, dentro de los límites habituales. Los resultados se presentan en: Table 13.

Linealidad y paralelismo de la dilución: 92,2%. Tres muestras de saliva con una cantidad alta de melatonina se diluyeron consecutivamente con solución amortiguadora de incubación, y se analizaron conforme al procedimiento de análisis. Los resultados se presentan en: Table 14.

Debido a la matriz compleja de las muestras de saliva, la dilución superior a 1:8 con la solución amortiguadora de incubación producirá una disminución de la linealidad. Por lo tanto, no se recomienda la dilución superior a 1:4 de las muestras con una solución amortiguadora de incubación.

Recuperación de cantidades añadidas: 97.9%. Dos muestras de saliva del mismo donante, una recogida durante el día y la otra por la noche, se titularon entre sí y se analizaron dos veces, independientemente, según el procedimiento de análisis. Los resultados se presentan en: Table 15.

Debido a la naturaleza compleja e individual de la matriz de saliva, la adición directa de cantidades conocidas de saliva con melatonina puede causar una disminución de las tasas de recuperación.

Límite del blanco (LoB): 0,5 pg/ml. Se hizo un análisis de 32 pocillos de solución amortiguadora de incubación (calibrador cero / referencia), en dos procesos independientes. La concentración mínima detectable en 0,1 ml de solución amortiguadora de incubación se calculó restando dos desviaciones estándar de valores de referencia promediados desde la densidad óptica del calibrador cero y la intersección del valor con la curva estándar obtenida en el mismo proceso.

Límite de cuantificación: 1,6 – 20,5 pg/ml. El límite de cuantificación de este análisis es la concentración de melatonina en la saliva que puede medirse con un coeficiente de variación (CV) entre análisis inferior al 30%. El límite de cuantificación se determinó a partir de siete muestras diferentes, de 1,3 a 47,3 pg/ml cada muestra, medidas 17 veces por duplicado, en procesos independientes.

Especificidad: Se examinó la unión al 50% (reactividad cruzada) del antisuero de melatonina con diferentes compuestos, en el radioinmunoanálisis directo en saliva de melatonina (Direct Saliva Melatonin Radioimmunoassay, RK-DSM), de BÜHLMANN AG, y se presenta en: Table 16.

COMPARACIÓN ENTRE LOS MÉTODOS

La comparación se efectuó con 78 muestras de saliva de 10 donantes diferentes, recogidas a diferentes horas del día. Las muestras se analizaron mediante el análisis EK-DSM presentado, y con el radioinmunoanálisis directo en saliva de melatonina (RK-DSM), de BÜHLMANN AG. El análisis posterior de regresión lineal produjo un factor de correlación de $R^2 = 0,84$, una intersección de 0,77 pg/ml y una pendiente de 1,21. La correlación se presenta en Figure 3.

Table 11: **Example of Results**

	Conc. (pg/ml)	Absorbance (OD)	B/B0 (%)	CV Conc. (%)	Calc. Conc. (pg/ml)
Blank		0.075			
Blank Avg.		0.067 0.071		5.6	
Zero Calibrator		1.715	98.5		
Zero Calibrator Avg.	0.0	1.766 1.741	101.5 100.0	2.1	
Cal A		1.484	85.3		
Cal A Avg.	0.6	1.514 1.499	87.0 86.1	1.4	
Cal B		1.292	74.2		
Cal B Avg.	1.5	1.274 1.283	73.2 73.7	1.0	
Cal C		0.755	43.4		
Cal C Avg.	4.0	0.769 0.762	44.2 43.8	1.3	
Cal D		0.364	20.9		
Cal D Avg.	10	0.359 0.362	20.6 20.8	1.0	
Cal E		0.179	10.3		
Cal E Avg.	25	0.182 0.181	10.5 10.4	1.2	
Ctrl. high		0.560	32.2		6.2
Ctrl. high Avg.		0.553 0.557	31.8 32.0	0.9	6.2
Ctrl. low		0.929	53.4		2.9
Ctrl. low Avg.		0.874 0.902	50.2 51.8	4.3	3.3
Sample 01		0.414	23.8		8.9
Sample 01 Avg.		0.404 0.409	23.2 23.5	1.7	9.0
Sample 02		0.970	55.7		2.7
Sample 02 Avg.		0.908 0.939	52.2 54.0	4.7	3.0
Sample 03		1.215	69.8		1.6
Sample 03 Avg.		1.162 1.189	66.8 68.3	3.2	1.8

ED20 = 10.9 pg/ml

ED50 = 3.3 pg/ml

ED80 = 1.0 pg/ml

Figure 1: **Example of Standard Curve**

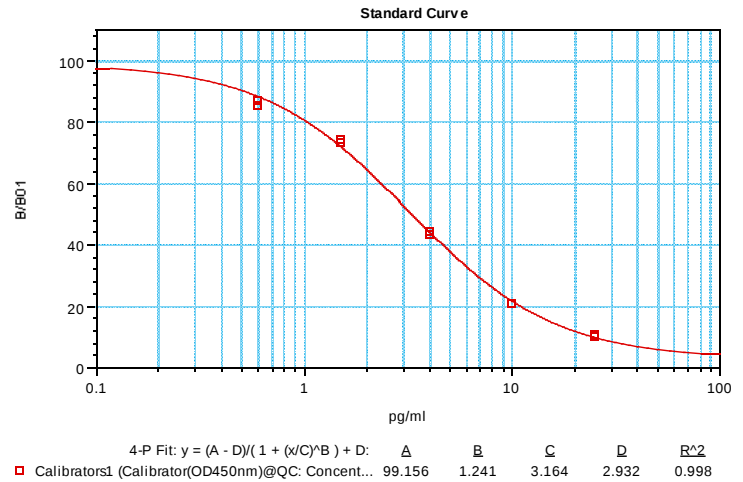


Figure 2: **Pipetting Scheme**

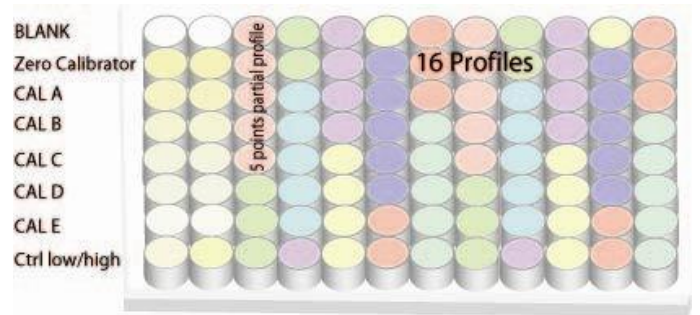


Table 12: **Intra-Assay Precision**

Sample	Mean [pg/ml]	SD [pg/ml]	CV [%]
S01	1.7	0.19	11.2
S04	5.2	1.20	22.9
S03	13.7	1.48	10.8
S05	15.9	0.84	5.3
Mean			12.6

Table 13: **Inter-Assay Precision**

Sample	Mean [pg/ml]	SD [pg/ml]	CV [%]
Ctrl low	2.6	0.59	23.8
S11	2.4	0.41	17.2
S12	4.6	1.32	28.8
Ctrl high	5.2	1.20	23.2
S13	13.7	3.05	22.3
Mean			22.9

Table 14: **Dilution Linearity/Parallelism**

Sample	Dilution Factor	Observed [pg/ml]	Expected [pg/ml]	Recovery O/E [%]
S06	1:1	14.9	--	--
	1:2	7.8	7.5	104.7
	1:4	3.0	3.7	80.5
	[1:8]	[1.1]	[1.9]	[59.1]
S07	1:1	22.7	--	--
	1:2	11.6	11.4	102.2
	1:4	5.0	5.7	88.1
	[1:8]	[1.8]	[2.8]	[63.4]
S08	1:1	20.4	--	--
	1:2	13.1	13.6	96.3
	1:4	6.4	6.8	94.1
	[1:8]	[2.7]	[3.4]	[79.4]
Mean				92.2

Table 15:

Spiking Recovery

Sample	Titration Ratio S5/S8	Expected [pg/ml]	Observed [pg/ml]	Recovery O/E [%]
S5/S8	5/0	1.2	1.2	--
	4/1	4.3	4.4	102.8
	3/2	7.4	5.3	72.0
	2/3	10.4	9.8	93.9
	1/4	13.5	13.9	102.8
	0/5	16.6	16.6	--
S5/S8	5/0	0.9	0.9	--
	4/1	3.7	3.6	96.8
	3/2	6.5	6.4	97.9
	2/3	9.4	10.5	112.2
	1/4	12.2	12.8	105.1
	0/5	15.0	15.0	--
Mean				97.9

Table 16

Specificity

Compound	Crossreactivity [%]
melatonin	100
serotonin	< 0.001
6-sulfatoxymelatonin	< 0.001
N-acetylserotonin	0.045
5-hydroxy-indole acetic acid	< 0.001
5-methoxytryptamine	0.007
5-methoxytryptophane	< 0.001
2-methyl-5-hydroxytryptamine	< 0.001
5-methoxypsoralen	< 0.001
5-methoxytryptophol	0.002
chloramelatonin	1.3
caffeine	< 0.001
caffeine acid	<0.001
soluble coffee	<0.001
soluble coffee decaffeinated	<0.001

Figure 3

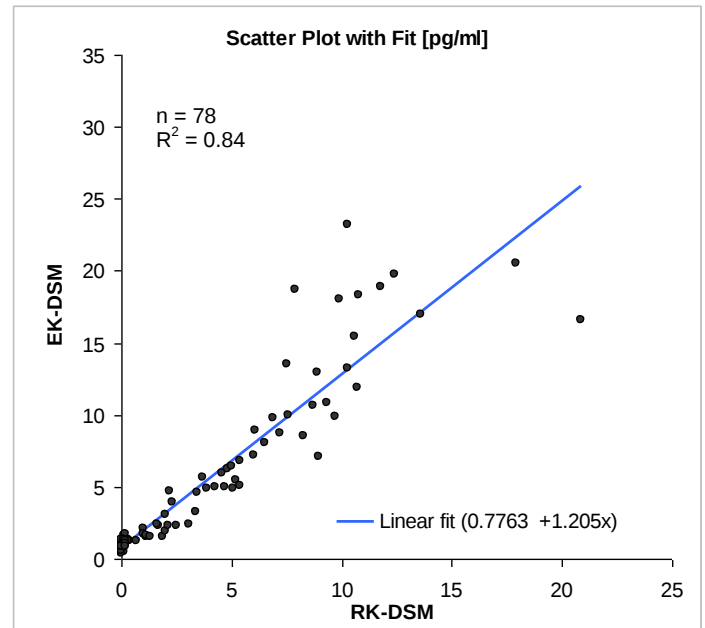
Correlation EK-DSM / RK-DSM

Table description: cf. "Results" and "Performance Characteristics" and "Method Comparison"

Tabellenbeschreibung: siehe "Resultate" und "Leistungsmerkmale" und Methodenvergleich

Explications relatives aux tableaux: voir "Résultats" et "Caractéristiques de Performance" et "Méthode de Comparaison"

Descrizione tavola: cf. "Risultati" e "Caratteristiche delle Prestazioni" e "Valori di Cut-off" e "Confronto dei Metodi"

Explicaciones relativas a las tablas: ver "Resultados" y "Características de Eficiencia" y "Comparación entre los Métodos"

APPENDIX II**REFERENCES/ LITERATURREFERENZEN/ REFERENCES/ RIFERIMENTI/ REFERENCIAS**

1. Koorengevel, KM, et al. A forced desynchrony study of circadian pacemaker characteristics in seasonal affective disorder. *J Biol Rhythms* **17**, 463-75 (2002).
2. Wirz-Justice, A, et al. No evidence for a phase delay in human circadian rhythms after a single morning melatonin administration. *J Pineal Res* **32**, 1-5 (2002).
3. Graw, P, et al. Early morning melatonin administration impairs psychomotor vigilance. *Behav Brain Res* **121**, 167-72 (2001).
4. Danilenko, KV, et al. Is sleep per se a Zeitgeber in humans. *J Biol Rhythms* **18**, 170-8 (2003).
5. Vaughan G M: New sensitive serum melatonin radioimmunoassay employing the Kennaway G280 antibody: Syrian hamster morning adrenergic response. *J Pineal Res* **15**, 88-103 (1993).
6. Voultsios, A, et al. Salivary melatonin as a circadian phase marker: validation and comparison to plasma melatonin. *J Biol Rhythms* **12**, 457-466 (1997).

Direct Saliva Melatonin Sample Pretreatment (Saliva)

Clean polypropylene tube

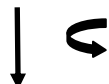
200 µl Saliva Sample or Control
25 µl Pretreatment Solution



Vortex, 5 sec

Incubate, 10 min, 18-28°C

25 µl Neutralization Solution



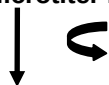
Vortex, 5 sec

Centrifuge at 10'000 rpm for 5 min

Proceed to ELISA procedure

Direct Saliva Melatonin ELISA Procedure

Precoated Microtiter Plate



Wash 2x

100 µl Calibrators, Pretreated Controls
or Samples



Incubate 16-20 hours at 2-8°C

add 50 µl Melatonin-Biotin-Conjugate



1 minute on a plate Rotator

3 hours at 2-8°C

Wash 4x

add 100 µl Enzyme Label



60 minutes at 18-28°C

on a plate rotator

Wash 4x

add 100 µl TMB Substrate



*Incubate 30 minutes at 18-28°C
on a plate rotator*

add 100 µl Stop Solution

➡ Read absorbance at 450 nm (within 30 minutes)

APPENDIX IV
SYMBOLS/ SYMBOLE/ SYMBOLES/ SIMBOLI/ SIMBOLOS

Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad
REF	Catalogue number Bestellnummer Référence du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo
LOT	Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote
IVD	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device <i>In Vitro</i> Diagnostikum Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Contains sufficient for <n> tests Ausreichend für "n" Ansätze Contenu suffisant pour „n“ tests Contenuto sufficiente per „n“ saggi Contenido suficiente para <n> ensayos
	Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura
REAG PRE	Pretreatment Reagent Vorbehandlungs Reagenz réactif de prétraitement reagente di pretrattamento reactivo del tratamiento previo
SOLN NEUT	Neutralizing Solution Neutralisierungs-Lösung Solution neutralisante Soluzione neutralizzante Solución neutraliza
MP	Microtiterplate Mikrotiter-Platte Microplaque Micropiastra Microplaca

Symbol	Explanation
BUF WASH 10X	Wash Buffer Concentrate (10x) Wasch-Puffer Konzentrat (10x) Concentré de tampon de lavage (10x) Tampone di lavaggio concentrato (10x) Tampón de lavado concentrado (x10)
REAG BLANK	Blanking Reagent Nullwert-Reagenz Réactif blanc Reagente bianco Reactivo blanco
BUF INC	Incubation Buffer Inkubations-Puffer Tampon d'incubation Tampone di incubazione Tampón de incubación
CAL A - CAL E	Calibrator A - E Kalibrator A - E Calibrateur A - E Calibratore A - E Calibrador A - E
CONTROL L	Control Low Kontrolle tief Contrôle bas Controllo basso Control bajo
CONTROL H	Control High Kontrolle hoch Contrôle élevé Controllo alto Control alto
BC	Biotin Conjugate Biotin-Konjugat Conjugué Biotine Coniugato biotinilato Conjugado de Biotina
EL	Enzyme Label Enzym-Marker Marqueur enzymatique Marcato enzimatico Marcador enzimático
SUBS TMB	TMB Substrate TMB-Substrat Substrat TMB Substrato di TMB Substrato de TMB
SOLN STOP	Stop Solution Stopp-Lösung Solution stop Soluzione stoppante Solución de parada



Printing Date
2013-01-30