



# Direct Saliva MELATONIN ELISA

EK-DSM 96 tests

Release Date: 2021-05-07

## ENGLISH

### INTENDED USE

The NovoLytiX 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 overnight incubation, melatonin present in the pre-treated saliva and controls as well as in the calibrators, compete with biotinylated melatonin during a 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 to the melatonin-biotin-antibody complexes captured on the coated wells during a 60-minutes incubation step. Unbound enzyme label is then removed by a washing step and TMB substrate (tetramethylbenzidine) is added to the wells. In a further 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	Quantity	Code	Reconstitution
<b>Pretreatment Solution</b>	1 vial 5 mL	B-EKDSM-PRS	Ready to use <b>corrosive agent</b>
<b>Neutralizing Solution</b>	1 vial 5 mL	B-EKDSM-NS	Ready to use <b>irritant</b>
<b>Microtiter Plate</b> precoated with G280 anti-melatonin Ab	12x8 wells	B-EKDSM-MP	Wash 2x before use
<b>Plate Sealer</b>	3 pieces	-	Ready to use
<b>Wash Buffer Concentrate (10x)</b> with preservatives	1 bottle 100 mL	B-EKDSM-WB	Dilute with 900 mL deionized water
<b>Blanking Reagent<sup>1)</sup></b> 50 µL concentrate; do not pretreat	1 vial	B-EKDSM-BR	Reconstitute in 1mL Incubation Buffer
<b>Incubation Buffer</b> (Zero Calibrator) melatonin-free buffer	1 vial 12 mL	B-EKDSM-IB	Ready to use
<b>Calibrators<sup>2)</sup></b> 50 µL concentrate; do not pretreat	5 vials	B-EKDSM-CASET	Reconstitute each with 1 mL Incubation Buffer
<b>Control low / high<sup>3)</sup></b> 50 µL concentrate; for pretreatment see page 3	2 vials	B-EKDSM-CONSET	Reconstitute each with 1 mL Incubation Buffer
<b>Biotin Conjugate</b>	1 vial 5.5 mL	B-EKDSM-BC	Ready to use
<b>Enzyme Label</b> Streptavidin conjugated to HRP	1 vial 11 mL	B-EKDSM-EL	Ready to use
<b>TMB Substrate</b>	1 vial	B-TMB	Ready to use

Reagents	Quantity	Code	Reconstitution
<b>Stop Solution</b> 0.25 M sulfuric acid (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	1 vial 11 mL	B-ST5	Ready to use <b>corrosive agent</b>

Table 1

- The Blanking reagent contains a saturated melatonin solution. Prevent any contamination of other kit reagents.
- 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.
- Lot specific amount of melatonin see data sheet added to the kit.

### STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

Sealed / 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

### MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Precision pipettes with disposable tips: 5 µL, 50 µL, 100 µL and 1000 µL pipettes. Repeater or multichannel pipette for 50 µL and 100 µL.
- Disposable polystyrene or polypropylene tubes for the preparation of sample dilutions.
- 1000 mL cylinder for the dilution of the wash buffer.
- Microtiter plate washer or squeeze bottle for wash buffer.
- Blotting paper.
- Refrigerator
- Microtiter plate orbital shaker.
- Microtiter plate reader for measurement of absorbance at 450 nm.
- NovoLytiX Saliva Collection Devices, B-SLEEP-CHECK16 or B-SVC50.

### PRECAUTIONS

#### Safety precautions

- This test is for in vitro use only, and must be handled by qualified personnel, in accordance with good laboratory practices (GLP).

- 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). The substrate TMB (B-TMB) contains Tetramethylbenzidine. The stop solution (B-STC) contains sulfuric acid (0.25 M). Each of those reagents is irritant to eyes, skin and mucous membranes. Avoid contact with eyes, skin and clothes. 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**

- Read the instructions carefully before 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.
- **NEW:** The Blanking Reagent (B-EKDSM-BR), the Calibrators A to E (B-EKDSM-CASET) and the Controls (B-EKDSM-CONSET) are provided as a concentrate and are replacing the lyophilized form. After adding 1 mL of Incubation Buffer (B-EKDSM-IB) the vials should be gently shaken and turned a few times over the tightly screwed cap in order to reconstitute potentially remaining drops attached to the vial walls and sealing caps.
- 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.
- 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.
- Microwells cannot be re-used.
- Let the reagents adjust to reach room temperature. Mix the reagents well (vortex) before use.

#### **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 (with 5 points each) per microtiter plate. For applications other than Sleep Check duplicate determinations are recommended.

---

### **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.

---

### **SPECIMEN COLLECTION**

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

- Do not use cotton swabs containing citric acid.
- Do not stimulate saliva flow by chewing gums or eating lemons.
- Patients should perform the collection on an evening without sporting activities and any intense efforts.
- When collecting saliva at night, a dim flash light or a ≤100 lux yellow light should be used in order to avoid a possible light influence on the melatonin profile.
- 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. Rinse the mouth with water 15 minutes before the collection.
- Drinks containing artificial colorants, caffeine (coffee, black or green tea, iced tea, cola) or alcohol are to be avoided on the evening of the collection.
- Patients should avoid brushing their teeth, with or without toothpaste, during sampling periods. It is likely that patients with gingivitis will contaminate the saliva with plasma or even whole blood leading to unknown consequences.
- On the collection day, if possible, no aspirin and medicines that contain ibuprofen (Brufen®, Algifor® Dismenol®, 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.

---

### **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 swab and store the tube at 2-8°C or -20°C.

#### **Pre-treatment of saliva samples and controls**

- Pipet 200 µL of controls and saliva samples, respectively, into correspondingly marked polypropylene tubes.
- Add 25 µL of pretreatment solution to each tube using a multichannel or repeater pipette.

- 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 multichannel or repeater pipette. Vortex for 5 seconds.
- Centrifuge the pre-treated samples for 5 minutes 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 foil pouch 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 into well H1  
Pipet 100 µL of pretreated high control into well H2
  - 3e. Pipet 100 µL of each pretreated sample (single) into the subsequent wells.
  4. Cover the plate with a plate sealer, place it for 1 min on a plate orbital shaker set at 600 rpm and then incubate for 16-20 hours at 2-8 °C.
  5. Remove and discard 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 orbital shaker 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 five 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 orbital shaker 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 five 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 equilibrate 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 orbital shaker 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.

---

## 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 precise laboratory techniques (current GLP guidelines) 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 performance of the assay does not meet the established limits and repetition has excluded 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.

---

## STANDARDIZATION

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

---

## 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 (B<sub>0</sub>), with the blank-corrected absorbance of the incubation buffer taken as 100 %.

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

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 logistic (4-PL) algorithm.

### Samples and controls

- Record the absorbance at 450 nm for each sample, each control and 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 (B<sub>0</sub>), with the blank-corrected absorbance of incubation buffer taken as 100%.
- Locate the B/B<sub>0</sub> 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 3 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.

---

## 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: 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 4.

**Inter-Assay Precision: 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 5.

**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 (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.

**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 6.

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 7.

Due to the complex and individual nature of the saliva matrix direct spiking of saliva with melatonin can lead to decreased recovery rates.

**Specificity:** The 50% binding (cross-reactivity) of the melatonin antiserum with different compounds were tested in the Direct Saliva Melatonin Radioimmunoassay (RK-DSM) from NovoLytiX and are presented in table 8.

---

## 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 NovoLytiX. 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 NovoLytiX 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 NovoLytiX 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 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 Wells gegeben. In einem weiteren 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 gemessen werden kann.

## GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Inhalt	Art-Nr.	Rekonstitution
<b>Vorbehandlungs-Lösung</b>	1 Flasche 5 mL	B-EKDSM-PRS	Gebrauchsfertig <b>korrosiv</b>
<b>Neutralisierungs-Lösung</b>	1 Flasche 5 mL	B-EKDSM-NS	Gebrauchsfertig <b>reizend</b>
<b>Mikrotiterplatte</b> Mit G280 Anti-Melatonin Ak beschichtet	12x8 Wells	B-EKDSM-MP	Vor Gebrauch 2x Waschen
<b>Abdeckfolien</b>	3 Stück	-	Gebrauchsfertig
<b>Wasch-Puffer Konzentrat (10x)</b> Konservierungsstoffe	1 Flasche 100 mL	B-EKDSM-WB	Mit 900 mL deionisiertem Wasser lösen
<b>Nullwert-Reagenz<sup>1)</sup></b> 50 µL Konzentrat; nicht vorbehandeln	1 Flasche	B-EKDSM-BR	Mit 1 mL Inkubations-Puffer lösen
<b>Inkubations-Puffer</b> (Null-Kalibrator) Melatonin freier Puffer	1 Flasche 12 mL	B-EKDSM-IB	Gebrauchsfertig
<b>Kalibratoren<sup>2)</sup></b> 50 µL Konzentrat; nicht vorbehandeln	5 Flaschen	B-EKDSM-CASET	Mit je 1 mL Inkubations-Puffer lösen
<b>Kontrolle tief und hoch<sup>3)</sup></b> 50 µL Konzentrat; Vorbehandlung siehe Seite 8	2 Flaschen	B-EKDSM-CONSET	Mit je 1 mL Inkubations-Puffer lösen

Reagenz	Inhalt	Art-Nr.	Rekonstitution
<b>Biotin-Konjugat</b>	1 Flasche 5.5 mL	B-EKDSM-BC	Gebrauchsfertig
<b>Enzym-Marker</b> Streptavidin-HRP Konjugat	1 Flasche 11 mL	B-EKDSM-EL	Gebrauchsfertig
<b>TMB-Substrat</b> Mit Citrat gepuffert	1 Flasche 11 mL	B-TMB	Gebrauchsfertig
<b>Stopp-Lösung</b> 0.25 M Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	1 Flasche 11 mL	B-ST5	Gebrauchsfertig <b>korrosiv</b>

Tabelle 1

- Das Nullwert-Reagenz enthält eine gesättigte Melatonin Lösung. Kontaminationen von anderen Kitkomponenten müssen vermieden werden.
- Die Kalibratoren A, B, C, D und E enthalten die folgenden 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.
- Lot spezifische Melatonin Konzentrationen. Siehe beigelegtes QC Datenblatt.

## LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Verschlossene/ Ungeöffnete Reagenzien	
Bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum haltbar. Nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.	
Geöffnete/ Rekonstituierte Reagenzien	
Mikrotiterplatte	Ungebrauchte Streifen direkt in den Alu-Folienbeutel mit dem Desikator 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 haltbar
Nullwert-Reagenz	Bei 2-8°C bis zu 4 Monaten haltbar.
Kalibratoren	
Kontrollen	
Biotin-Konjugat	
Enzymmarker	Bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum haltbar
TMB Substrat	
Stopp-Lösung	

Tabelle 2

## ERFORDERLICHE NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE MATERIALIEN

- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen für 5 µL, 50 µL, 100 µL und 1000 µL. Mehrkanalpipette oder Repetierpipette für 50 µL und 100 µL.
- Polystyren oder Polypropylen Einwegröhrchen zur Verdünnung der Proben.
- 1000 mL Zylinder zur Verdünnung des Waschpuffers.
- Mikrotiter-Platten-Waschgerät oder Spritzflasche für Waschpuffer.
- Saugfähiges Papier.
- Kühlschrank.
- Mikrotiter-Platten Orbital-Schüttler.
- Mikrotiterplatten-Photometer mit optischem Filter (450 nm).

- NovoLytiX Saliva Collection Devices, B-SLEEP-CHECK16 oder B-SVC50.

---

## VORSICHTSMASSAHMEN

### Sicherheitsmassnahmen

- Dieser Test ist nur für den in-vitro-diagnostischen Gebrauch bestimmt und ist von qualifiziertem Fachpersonal unter Einhaltung der Guten Laborpraxis (GLP) anzuwenden.
- Vorbehandlungsreagenz/ Neutralisierungslösung, Substrat- und Stopp-Lösung: Das Vorbehandlungs-Reagenz (B-EKDSM-PRS) enthält Natriumhydroxid (NaOH) und die Neutralierungs-Lösung (B-EKDSM-NS) enthält Salzsäure (HCl). Die Substratlösung (B-TMB) enthält Tetramethylbenzidin. Die Stopp-Lösung (B-STIS) enthält Schwefelsäure. Jeder dieser Reagenzien reizt die Augen, die Haut und die Schleimhautmembranen. Berührung mit den Augen, der Haut und die Bekleidung vermeiden. Tragen Sie geeignete Schutzkleidung, Laborhandschuhe und Schutzbrille. Nach Berührung sofort mit viel Wasser spülen.
- Ungebrauchte Lösungen sollten gemäss der gesetzlichen Bestimmungen entsorgt werden.

### Technische Vorsichtsmassnahmen

#### Kit Komponenten

- Lesen Sie die Arbeitsanleitung sorgfältig vor der Testdurchführung durch. Die Testqualität kann negative beeinflusst werden, wenn die Reagenzien nicht korrekt verdünnt, verändert werden, oder nicht entsprechend der in dieser Anleitung angegebenen Lagerungsbedingungen gelagert werden.
- NEU: Das Nullwert-Reagenz (B-EKDSM-BR), die Kalibratoren A bis E (B-EKDSM-CASET) und die Kontrollen (B-EKDSM-CONSET) werden als Konzentrat geliefert und ersetzen die lyophilisierte Form. Nach Zugabe von 1 mL Inkubationspuffer (B-EKDSM-IB) sollten die Fläschchen vorsichtig geschüttelt und einige Male über den fest verschraubten Deckel gedreht werden, um eventuell an den Fläschchenwänden und Verschlusskappen anhaftende Resttropfen zu rekonstituieren.
- Aufgrund des Produktionsprozesses kann es Rückstände in den Wells der Mikrotiterplatten haben. Sie werden mit dem Waschschrift (Schritt 2) entfernt und haben keinen Einfluss auf die Ergebnisse.
- 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.
- Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden.
- Die Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur äquilibrieren lassen und gut mischen (vortexen).

#### Arbeitsanleitung

- Das Nullwert-Reagenz enthält eine gesättigte Melatonin Lösung. Kontaminationen von anderen Kit Komponenten

müssen vermieden werden. Die Einwegspitzen müssen nach jedem Pipettierschritt 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.

---

## 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  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Wiederholte Auftau-/Einfrierzyklen sollten vermieden werden.

---

## PROBENSAMMLUNG

Die Speichelproben werden mit Hilfe der NovoLytiX Speichelsammelbestecke gesammelt. Die Sammelbestecke können bis zu 3 mL Speichel absorbieren. Zur Testdurchführung werden 0.2 mL Speichel benötigt.

- Watterollen, die Zitronensäure enthalten, dürfen nicht verwendet werden.
- Der Speichelfluss darf nicht durch Kaugummi kauen oder dem Verzehr von Zitronen stimuliert werden.
- Die Patienten sollten die Probensammlung an einem Abend ohne sportliche Aktivitäten und intensive Anstrengungen durchführen.
- Probensammlungen während der Nacht sollten bei gedämpftem Licht ( $\leq 100$  Lux) durchgeführt werden, um einen Einfluss des Lichts auf das Melatonin Profil auszuschliessen.
- Während der Sammlungsdauer 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. 15 Minuten vor der nächsten Probengewinnung ist der Mund mit Wasser zu spülen.
- Getränke welche künstliche Farbstoffe, Koffein (Kaffee, Schwarz- oder Grüntee, IceTea, Cola) oder Alkohol enthalten, sollten am Abend der Speichelsammlung vermieden werden.
- Der Patient sollte während der Zeit der Probengewinnung darauf verzichten Zähne sowohl mit, wie auch ohne, Zahnpaste zu putzen. Patienten mit Gingivitis könnten dadurch ihren Saliva mit Plasma oder sogar Vollblut kontaminieren, was zu unbekanntem Veränderungen führen könnte.

- Wenn möglich sollte am Tag der Sammlung kein Aspirin oder Medikamente welche Ibuprofen enthalten (Brufen®, Algifor® Dismenol®, Dolocyl®, Ecoprofen®) eingenommen werden. Falls der Schlaf- oder Schlaf/Wach- Rhythmus mit Melatonin behandelt wird, sollte diese Behandlung vor der Probensammlung für mindestens eine Woche unterbrochen werden. Probenvorbereitung im Labor

#### Probengewinnung aus den Saliva Sammelbestecken

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

#### Vorbereitung Speichelproben und Kontrollen

- 200 µL der Kontrollen und der Speichelproben in entsprechend markierte Polypropylen-Röhrchen geben.
- 25 µL Vorbehandlungs-Lösung mit der Mehrkanal- oder Repetierpipette in jedes Röhrchen geben.
- Für 5 Sekunden vortexen und die Röhrchen für 10 Minuten bei 18-28°C stehen lassen.
- 25 µL Neutralisierungs-Lösung mit der Mehrkanal- oder Repetierpipette in jedes Röhrchen zugeben und für 5 Sekunden vortexen.
- Die vorbehandelten Proben werden für 5 Min bei 10'000 rpm zentrifugiert. Danach wird mit dem ELISA Verfahren weitergemacht.

#### ARBEITSANLEITUNG

1. Mikrotiter-Platte mit ausreichender Anzahl Streifen für Nullwerte (Blank), Kalibratoren, Kontrollen und Proben bereitstellen. Die restlichen Streifen **direkt** im wiederverschließbaren Alu-Folienbeutel einschliessen und gekühlt lagern.
2. Die beschichteten Wells zweimal mit  $\geq 300 \mu\text{L}$  Wasch-Puffer pro Well waschen. Die Wells entleeren und auf saugfähigem Papier gut ausklopfen.
- 3a. Je 100 µL Nullwert-Reagenz (Blank) in die Wells A1 und A2 geben.
- 3b. Je 100 µL Inkubations-Puffer (Null-Kalibrator) in die Wells B1 und B2 geben.
- 3c. Je 100 µL Kalibrator A in die Wells C1 und C2 geben.  
Je 100 µL Kalibrator B in die Wells D1 und D2 geben.  
Je 100 µL Kalibrator C in die Wells E1 und E2 geben.  
Je 100 µL Kalibrator D in die Wells F1 und F2 geben.  
Je 100 µL Kalibrator E in die Wells G1 und G2 geben.
- 3d. 100 µL vorbehandelte Kontrolle tief in Wells H1 geben.  
100 µL vorbehandelte Kontrolle hoch in Wells H2 geben.
- 3e. 100 µL der vorbehandelten Proben (Einzelwert) in die weiteren Wells geben.
4. Die Platte mit einer Abdeckfolie verschliessen, für 1 Minute auf einen Orbital-Schüttler (600 rpm) stellen und dann über Nacht für 16-20 Stunden bei 2-8°C inkubieren.
5. Folie entfernen. In jedes Well je 50 µL Biotin-Konjugat (blaue Lösung) zugeben. Die Platte mit einer Abdeckfolie verschliessen und für 1 Minute auf einen Orbital-Schüttler (600 rpm) stellen.
6. Danach für 3 Stunden ( $\pm 5$  Min) bei 2-8°C inkubieren.

7. Folie entfernen. Die Lösung aus jedem Well absaugen oder ausschütten und fünfmal mit  $\geq 300 \mu\text{L}$  Wasch-Lösung pro Well waschen. Die Wells entleeren und auf saugfähigem Papier gut ausklopfen.
8. Je 100 µL Enzym-Marker (gelbe Lösung) zu allen Wells zugeben
9. Mit einer neuen Abdeckfolie zudecken und für 60 Minuten ( $\pm 5$  Min) auf einem Orbital-Schüttler (600 rpm) bei 18-28°C inkubieren
10. Folie entfernen und entsorgen. Die Lösung aus jedem Well absaugen oder ausschütten und fünfmal mit  $\geq 300 \mu\text{L}$  Wasch-Lösung pro Well waschen. Die Wells entleeren und auf saugfähigem Papier gut ausklopfen.

**Wichtig:** TMB-Substrat vor dem Gebrauch auf 18-28°C *äquilibrieren lassen.*

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

#### QUALITÄTSKONTROLLE

Ein vollständiges Verständnis dieser Anleitung ist für den erfolgreichen Gebrauch des Produktes notwendig. Zuverlässige Resultate werden nur durch die Anwendung von GLP (aktuelle GLP Richtlinien) und die Einhaltung der Anleitung erreicht.

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 Ergebnisse des Testes nicht innerhalb der erwarteten Bereiche liegen und wiederholte Messungen einen Durchführungsfehler ausschliessen, sind folgende Punkte 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.

#### STANDARDISIERUNG

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



---

## RESULTATE

### Standardkurve

Optische Dichte aller mit Kalibrator oder Nullwert-Reagenz (Blank) gefüllten Wells 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 (B<sub>0</sub>) berechnen, wobei die Blank-korrigierte Absorption des Inkubations-Puffers als 100% gesetzt wird.

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

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 4-Parameter Logistic (4-PL) 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 (B<sub>0</sub>) berechnen, wobei die Blank-korrigierte Absorption des Inkubations-Puffers als 100% gesetzt wird.
- B/B<sub>0</sub> auf der Standardkurve auftragen und die entsprechende Melatonin-Konzentration in pg/mL aus der Horizontal-achse ablesen.

Für ein Beispiel von Resultaten und Standardkurve siehe Tabelle 3 und Abbildung 1. *Diese Daten dienen nur der Illustration und sind nicht dazu bestimmt, die Ergebnisse eines anderen Testansatzes danach zu berechnen. Eine Standardkurve muss für jeden Testansatz jeweils neu ermittelt werden.*

---

## 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 Tabelle 4 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 Tabelle 5 dargestellt. .

**Nachweisgrenze (LoB): 0.5 pg/ml .** 32 Wells 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 je 17-mal im Doppel in unabhängigen Ansätzen gemessen.

**Verdünnungslinearität: 92,2 %.** Drei Speichelproben mit hohen Melatonin Konzentrationen wurden nacheinander mit Inkubations-Puffer verdünnt und entsprechend der Arbeitsanleitung getestet. Die Resultate sind in Tabelle 6 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 austitriert. Die Daten sind in Tabelle 7 dargestellt.

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

**Spezifität:** Die 50% Bindung (Kreuzreaktivität) des Melatonin-Antiserums mit verschiedenen Molekülen wurden im Radioimmunassay von NovoLytiX (RK-DSM) ermittelt und sind in Tabelle 8 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 NovoLytiX getestet. 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 Abbildung 3 dargestellt.

# FRANCAIS

## UTILISATION

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

## PRINCIPE DU TEST

La trousse NovoLytiX 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 prétraitée, 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 étape de lavage, puis le substrat TMB (tetraméthylbenzidine) est ajouté aux puits. Au cours d'une prochaine 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	Quantité	Code	Reconstitution
<b>Solution de pré-traitement</b>	1 flacon 5 mL	B-EKDSM-PRS	Prêt à l'emploi <b>Réactif corrosif</b>
<b>Solution de neutralisation</b>	1 flacon 5 mL	B-EKDSM-NS	Prêt à l'emploi <b>Réactif irritant</b>
<b>Microplaque</b> Precoâtée avec l'anticorps G280 anti-mélatonine	12x8 puits	B-EKDSM-MP	Laver 2x avant utilisation
<b>Film adhésif</b>	3 pièces	-	Prêt à l'emploi
<b>Tampon de lavage concentré (10x)</b> avec conservateurs	1 flacon 100 mL	B-EKDSM-WB	Diluer avec 900 mL d'eau déionisée
<b>Réactif « blanc »<sup>1)</sup></b> 50 µL de concentré ; ne pas prétraiter	1 flacon	B-EKDSM-BR	Reconstituer avec 1 mL de tampon d'incubation
<b>Tampon d'incubation</b> (Calibrateur zéro) Tampon exempt de mélatonine	1 flacon 12 mL	B-EKDSM-IB	Prêt à l'emploi
<b>Calibrateurs<sup>2)</sup></b> 50 µL de concentré ; ne pas prétraiter	5 flacons	B-EKDSM-CASET	Reconstituer avec 1 mL de tampon d'incubation
<b>Contrôles élevé et bas<sup>3)</sup></b> 50 µL de concentré ; pour le prétraitement voir page 12	2 flacons	B-EKDSM-CONSET	Reconstituer avec 1 mL de tampon d'incubation

Réactifs	Quantité	Code	Reconstitution
<b>Conjugué biotine</b>	1 flacon 5.5 mL	B-EKDSM-BC	Prêt à l'emploi
<b>Marqueur enzymatique</b> Streptavidine-conjugué HRP	1 flacon 11 mL	B-EKDSM-EL	Prêt à l'emploi
<b>Substrat TMB</b> tamponné (citrate)	1 flacon 11 mL	B-TMB	Prêt à l'emploi
<b>Solution stop</b> 0,25 M acide sulfurique (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	1 flacon 11 mL	B- STS	Prêt à l'emploi <b>Réactif corrosif</b>

Tableau 1

- Le réactif blanc contient une solution saturée de mélatonine. Eviter toute contamination des autres réactifs de la trousse.
- 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.
- Les contrôles présentent des concentrations de mélatonine spécifiques à chaque lot. Veuillez vous reporter aux données additionnelles de QC pour les valeurs exactes.

## STOCKAGE 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 le sachet en aluminium contenant les dessiccateurs. Refermer le sachet 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	
Tampon de lavage dilué	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 de TMB	
Solution stop	

Tableau 2

## MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Pipettes de précision réglables avec pointes jetables pour 5 µL, 50 µL, 100 µL et 1000 µL. 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.
- NovoLytiX Saliva Collection Devices, B-SLEEP-CHECK16 ou B-SVC50.

---

## PRECAUTIONS

### Précautions de sécurité

- Ce test est prévu pour une utilisation in vitro et doit être réalisé par un personnel qualifié, en accord avec les bonnes pratiques de laboratoire (BPL).
- Prétraitement/solution de neutralisation, substrat et solution stop: La solution de prétraitement (B-EKDSM-PRS) contient de l'hydroxyde de sodium (NaOH) et la solution de neutralisation (B-EKDSM-NS) contient de l'acide chlorhydrique (HCl). Le Substrat de TMB (B-TMB) contient du tétraméthylbenzidine (TMB). La solution stop (B-STC) contient de l'acide sulfurique (0,25 M). Ces substances irritent les yeux, la peau ainsi que les muqueuses. Eviter par conséquent tout contact avec les yeux, la peau et les habits. Porter des vêtements, de gants et des lunettes de protection appropriés. En cas de contact avec les yeux ou la peau, laver immédiatement et abondamment à l'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

#### Composants du Kit

- Lire attentivement les instructions avant de réaliser le test. Le 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.
- NOUVEAU : Le Réactif « blanc » (B-EKDSM-BR), les calibrateurs A à E (B-EKDSM-CASET) et les contrôles (B-EKDSM-CONSET) sont fournis sous forme concentrée et remplacent la forme lyophilisée. Après avoir ajouté 1 ml de tampon d'incubation (B-EKDSM-IB), les flacons doivent être doucement secoués et retournés plusieurs fois sur le bouchon bien vissé afin de reconstituer les gouttes éventuellement restées attachées aux parois du flacon et au bouchon.
- 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 2 de la procédure) et n'ont aucune influence sur les résultats.
- 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.
- Il convient de prendre toutes les précautions requises pour empêcher toute contamination croisée entre réactifs, entre échantillons ou entre puits.
- Les micropuits sont à usage unique.

- Laisser les réactifs équilibrer à la température ambiante. Bien mélanger (au vortex) les réactifs avant utilisation.

### 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 Sleep Check. 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 Sleep Check des déterminations en double sont recommandées.

---

## ENVOI ET STOCKAGE DES ECHANTILLONS

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 doivent pas être envoyés les vendredis, samedis 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 peuvent ainsi être stockés au moins 6 mois à ≤-20 °C. Des cycles répétés de congélation – décongélation doivent être évités.

---

## PRELEVEMENT D'ECHANTILLONS

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

- N'employez pas les tampons de coton contenant l'acide citrique.
- Ne stimulez pas des sécrétion de salive en machant du chewing-gum ou en mangeant du citron.
- Les patients doivent effectuer la collecte le soir sans activités sportives ni efforts intenses.
- Lors de prélèvements nocturnes, il convient d'utiliser des lumières tamisées (lumière jaune de ≤100 lux ou lampe de poche) afin d'éviter d'influencer le profil.
- 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 doivent pas être consommés le jour du prélèvement. Rincer la bouche avec de l'eau 15 minutes avant la collecte.
- Les boissons contenant des colorants artificiels, de la caféine (café, thé noir ou vert, thé glacé, cola) ou alcool sont à éviter le soir de prélèvement.
- De la même façon, le brossage des dents avec ou sans dentifrice est déconseillé durant la période de prélèvements. Les résultats de patients présentant une gingivite risquent également d'être erronés en raison de la présence de sang complet ou de plasma dans les prélèvements.

- Aspirine ou médicaments contenant de l'ibuprofène (Brufen®, Algifor®, Dismenol®, Dolocyl®, Ecoprofen®) 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.

---

## 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 à -20° C.

### Prétraitement des échantillons 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 ou une pipette automatique.
- 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 ou une pipette automatique. 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 le sachet en aluminium 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 et A2.
- 3b. Pipeter 100 µL de tampon d'incubation (calibrateur zéro/ référence) en double dans les puits B1 et B2.
- 3c. Pipeter 100 µL de calibrateur A en double dans les puits C1 et C2.  
Pipeter 100 µL de calibrateur B en double dans les puits D1 et D2.  
Distribuer 100 µL de calibrateur C en double dans les puits E1 et E2.  
Distribuer 100 µL de calibrateur D en double dans les puits F1 et F2.  
Distribuer 100 µL de calibrateur E en double dans les puits G1 et G2
- 3d. Pipeter 100 µL du contrôle faible prétraité dans le puit H1.  
Pipeter 100 µL de contrôle élevé prétraité dans le puit H2.

- 3e. Pipeter 100 µL d'échantillons prétraité (en simple) dans les puits suivants.
4. Couvrir la plaque avec un couvercle opaque, la placer sur un agitateur de plaque pendant 1 minute à 600 rpm et puis 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 5 fois avec au moins 300 µL de tampon de lavage/ 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 durant 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 5 fois avec au moins 300 µL de tampon de lavage/ 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 dans 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.

---

## 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 performance 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.

## STANDARDISATION

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

## 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 ( $B_0$ ) pour chaque paire de calibrateur en fixant l'absorbance « blanc »-corrégée du tampon d'incubation à 100%.

$$B/B_0 (\%) = \% \text{ de liaison} = \frac{\text{absorbance nette}}{\text{Absorbance nette du tampon d'incubation}} \times 100$$

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 logistic (4-PL).

### 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 ( $B_0$ ) comme décrit plus haut, en fixant l'absorbance « blanc »-corrégée du tampon d'incubation à 100%.
- Reporter le rapport  $B/B_0$  sur la courbe d'étalonnage et lire la concentration de mélatonine correspondante (en pg/mL) sur l'axe horizontal.

Cf. figure 1 et tableau 3 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.*

## 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.

## CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

**Fidélité intra-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 tableau 4.

**Fidélité inter-essais: 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 tableau 5.

**Limite de blanc (LdB) : 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 quantification (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.

**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 tableau 6.

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 tableau 7.

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.

**Spécificité:** La liaison 50 % (réactivité croisée) de l'antisérum de mélatonine avec différents composés a été testée au moyen du Direct Saliva Melatonin Radioimmunoassay (RK-DSM) produit par NovoLytix AG et les résultats sont présentés en tableau 8.

## 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 NovoLytix 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 en figure 3.

**USO PREVISTO**

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

**PRINCIPIO DEL DOSAGGIO**

Il dosaggio NovoLytiX 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 incubazione di 3 ore per i siti di legame di questo anticorpo altamente specifico. Dopo il lavaggio, viene aggiunto il marcato enzimatico, streptavidina coniugata con perossidasi di rafano (HRP) che si lega durante una incubazione di 60 minuti ai complessi melatonina-biotina-anticorpo catturati su pozzetti coattati. Il marcato enzimatico non legato viene quindi rimosso attraverso il lavaggio, e viene aggiunto il Substrato TMB (tetrametilbenzidina) ai pozzetti. Durante l' 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 acida e può essere misurato a 450 nm.

**REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE**

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
<b>Soluzione di pretrattamento</b>	1 flacone 5 mL	B-EKDSM-PRS	Pronto all'uso <b>Agente corrosivo</b>
<b>Soluzione neutralizzante</b>	1 flacone 5 mL	B-EKDSM-NS	Pronto all'uso <b>Agente irritante</b>
<b>Micropiastra</b> Precoattata con Ac G280 anti-melatonina	Pozzetti da 12x8	B-EKDSM-MP	Lavare 2x prima dell'uso
<b>Foglio sigillante per la piastra</b>	3 fogli	-	Pronto all'uso
<b>Tampone di lavaggio concentrato (10x)</b> Con conservanti	1 flacone 100 mL	B-EKDSM-WB	Diluire con 900 mL di acqua deionizzata
<b>Bianco reagente<sup>1)</sup></b> 50 µL di concentrato; non pretrattare	1 flacone	B-EKDSM-BR	Ricostituire con 1 mL di tampone di incubazione
<b>Tampone d'incubazione</b> (calibratore zero) Tampone privo di melatonina	1 flacone 12 mL	B-EKDSM-IB	Pronto all'uso
<b>Calibratori<sup>2)</sup></b> 50 µL di concentrato; non pretrattare	5 flaconi	B-EKDSM-CASET	Ricostituire ciascuno con 1 mL di tampone di incubazione
<b>Controllo basso ed alto<sup>3)</sup></b> 50 µL di concentrato; per pretrattamento vedi pagina 16	2 flaconi	B-EKDSM-CONSET	Ricostituire ciascuno con 1 mL di tampone di incubazione

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
<b>Coniugato biotina</b>	1 flacone 5.5 mL	B-EKDSM-BC	Pronto all'uso
<b>Marcato enzimatico</b> Streptavidina coniugata con HRP	1 flacone 11 mL	B-EKDSM-EL	Pronto all'uso
<b>Substrato di TMB</b> Tamponato con citrato	1 flacone 11 mL	B-TMB	Pronto all'uso
<b>Soluzione stoppante</b> 0,25 M di acido solforico (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	1 flacone 11 mL	B-ST5	Pronto all'uso <b>Agente corrosivo</b>

Tabella 1

- Il bianco reagente contiene una soluzione saturata di melatonina. Prevenire la contaminazione con altri componenti del Kit.
- 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, etichettati rispettivamente con 0.6, 1.5, 4.0, 10, e 25 pg/mL di melatonina.
- Per la quantità lotto specifici di melatonina vedi il foglio aggiuntivo contenente i dati di QC.

**CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REAGENTI**

Reagenti Sigillati / Non Aperti	
Conservare 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 indicata sulle etichette.
Soluzione neutralizzante	
Tampone d'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 indicata sulle etichette.
Marcato enzimatico	
Substrato di TMB	
Soluzione stoppante	

Tabella 2

**MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI**

- Pipette di precisione con puntali monouso: 5 µL, 50 µL, 100 µL e 1000 µL. Multipipetta per i volumi di 50 µL e 100 µL.
- Provette monouso di polipropilene o polistirene per la preparazione delle diluizioni.
- Cilindro da 1000 mL per la diluizione del tampone di lavaggio.
- Flacone dosatore per il tampone di lavaggio o lavatore automatico per micropiastre.
- Carta blottante.
- Frigorifero.

- Rotatore orbitale per micropiastra.
- Lettore di micropiastra per la misurazione dell'assorbanza a 450 nm.
- NovoLytiX Saliva Collection Devices, B-SLEEP-CHECK16 o B-SVC50.

---

## PRECAUZIONI

### Precauzioni di sicurezza

- Questo test è solo per un uso in vitro e deve essere maneggiato da personale qualificato, in conformità con le buone pratiche di laboratorio (BPL).
- 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. La soluzione stoppante (B-STC) 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.
- In merito alle precauzioni adeguate per lo smaltimento di reagenti del kit, consigliamo vivamente di consultare prima le normative locali speciali del proprio paese.

### Precauzioni tecniche

#### Reagenti del kit

- 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.
- NOVITÀ: Il reagente bianco (B-EKDSM-BR), i calibratori da A a E (B-EKDSM-CASET) e i controlli (B-EKDSM-CONSET) sono forniti come concentrato e sostituiscono la forma liofilizzata. Dopo aver aggiunto 1 mL di tampone di incubazione (B-EKDSM-IB), le fiale devono essere agitate delicatamente e girate alcune volte sul tappo a vite per ricostituire le gocce eventualmente rimaste attaccate alle pareti delle fiale e ai tappi di chiusura.
- 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 2 delle 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.
- Fare ogni tentativo per assicurarsi che tra i reagenti, i campioni o tra i pozzetti non vi siano contaminazioni incrociate.
- I micropozzetti non possono essere riutilizzati.
- Lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente. Miscelare bene (agitare in modo vorticoso) i reagenti prima dell'uso.

#### Procedura del dosaggio

- Il bianco reagente contiene una soluzione saturata di melatonina. Evitare la contaminazione con gli altri componenti del dosaggio. Cambiare i puntali per ogni nuovo passaggio di pipettatura.
- Il test è ottimizzato per la procedura Sleep Check. 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 Sleep Check si raccomanda di effettuare le determinazioni in duplicato.

---

## 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  $\leq -20$  °C. Evitare cicli ripetuti di congelamento-scongelo.

---

## PRELIEVO DEI CAMPIONI

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

- Non usare tamponi di cotone che contengono l'acido citrico.
- Non stimolare il flusso della saliva mastigando chewinggum o mangiando limoni.
- I pazienti devono eseguire la raccolta in una serata senza attività sportive e sforzi intensi.
- Quando il prelievo della saliva avviene di notte, occorre utilizzare una luce fioca o una luce gialla da  $\leq 100$  lux per evitare la possibile influenza della luce sul profilo della melatonina.
- 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. Risciacquare le bocche con acqua 15 minuti prima della raccolta.
- 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.
- I pazienti non devono lavarsi i denti, con o senza dentifricio, durante il periodo del prelievo. Pazienti affetti da gengivite possono contaminare la saliva con il plasma o persino con il sangue intero le cui conseguenze non sono note.
- Se possibile, il giorno del prelievo del campione non devono essere assunti acido acetilsalicilico e

medicinali contenenti ibuprofene (Brufen®, Algifor® Dismenol®, 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.

---

## 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.

### Pretrattamento dei 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 a 18 -28 °C.
- 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 sachelto di alluminio 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 tampone d'incubazione (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.  
Dispensare 100 µL del calibratore C in duplicato nei pozzetti E1+E2.  
Dispensare 100 µL del calibratore D in duplicato nei pozzetti F1+F2.  
Dispensare 100 µL del calibratore E in duplicato nei pozzetti G1+G2.
- 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, collocarla su un rotatore orbitale settato a 600 rpm per 1 minuto e poi 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 rotatore orbitale settato a 600 rpm per 1 minuto. Rimuovere il foglio sigillante dalla piastra.
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 cinque 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 rotatore orbitale 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 cinque 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 11.

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 rotatore orbitale 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 14 entro 30 minuti.
14. Leggere l'assorbanza a 450 nm in un lettore per micropiastre.

---

## CONTROLLO DI QUALITÀ

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.

Poiché 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 tali caratteristiche non sono conformi ai limiti stabiliti e la ripetizione del test esclude problemi di manipolazione, controllare i seguenti aspetti: 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.

## STANDARDIZZAZIONE

Direct Saliva Melatonin ELISA è calibrato verso UV/VIS:  $\epsilon_{278} = 6300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  nel metanolo.

## RESULTATI

### Curva standard

Annotare l'assorbanza a 450 nm per ciascun calibratore, tampone d'incubazione 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 ( $B_0$ ), con l'assorbanza corretta con NSB del calibratore zero preso al 100 %.

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{percento legato} = \frac{\text{assorbanza netta}}{\text{assorbanza netta del tampone d'incubazione}} \times 100$$

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 4-parametri logistic (4-PL).

### 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 tampone d'incubazione ( $B_0$ ), con l'assorbanza corretta con NSB del tampone d'incubazione preso al 100%.
- Collocare il valore  $B/B_0$  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 figura 1 e tabella 3 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.*

## 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-Saggio: 12,6 %.** La precisione intra-saggio 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 tabella 4.

**Precisione Inter-Saggio: 22,9 %.** La precisione inter-saggio è stata calcolata dai risultati ottenuti in 17 sedute diverse con 5 campioni all'interno dell'ambito standard. I risultati sono riportati in tabella 5.

**Limite del Bianco (LoB): 0,5 pg/mL.** 32 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.

**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 la procedura. I risultati sono riportati in tabella 6.

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 tabella 7.

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

**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 NovoLytiX; i risultati sono riportati in tabella 8.

## 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 presente del EK-DSM descritto e con il dosaggio radioimmunologico diretto della melatonina su saliva (RK-DSM) di NovoLytiX. 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 figura 3.

**INDICACIONES DE USO**

El ELISA directo de melatonina en saliva (EK-DSM) de NovoLytiX está diseñado para la determinación cuantitativa directa de melatonina en saliva humana (1-4).

**PRINCIPIOS DEL ENSAYO**

El ELISA directo de melatonina en saliva de NovoLytiX 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 incluida el kit. Después de las primeras 16-20 horas de incubación durante la noche, la melatonina en la saliva pretratada, los controles y los calibradores, compiten con la melatonina biotinilada durante 3 horas de incubación para los sitios obligatorios de este anticuerpo altamente específico. Después del lavado, se agrega el marcador enzimático, estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP), el cual se une durante un 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 paso de lavado y se añade el sustrato de TMB (tetrametilbenzidina) a los pocillos. En un 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	Cantidad	Código	Reconstitución
<b>Solución de pretratamiento</b>	1 vial 5 mL	B-EKDSM-PRS	Listo para usar <b>Agente corrosivo</b>
<b>Solución neutralizante</b>	1 vial 5 mL	B-EKDSM-NS	Listo para usar <b>Agente irritante</b>
<b>Placa de microtitulación</b> Recubierta con Ac anti-melatonina G280a	12x8 pocillos	B-EKDSM-MP	Lavar dos veces antes de usar
<b>Sellador de placas</b>	3 unidades	-	Listo para usar
<b>Tampón de lavado concentrado (10x)</b> con conservantes	1 botella 100 mL	B-EKDSM-WB	Diluir con 900 mL de agua desionizada
<b>Reactivo blanco<sup>1)</sup></b> 50 µL de concentrado; no pretrate	1 vial	B-EKDSM-BR	Reconstituir con 1 mL de tampón de incubación
<b>Tampón de incubación</b> (calibrador cero) tampón sin melatonina;	1 botella 12 mL	B-EKDSM-IB	Listo para usar
<b>Calibradores<sup>2)</sup></b> 50 µL de concentrado; no pretrate	5 viales	B-EKDSM-CASET	Reconstituir con 1 mL de tampón de incubación

Reactivos	Cantidad	Código	Reconstitución
<b>Control bajo y alto<sup>3)</sup></b> 50 µL de concentrado; para el tratamiento previo vea la página 20	2 viales	B-EKDSM-CONSET	Reconstituir con 1 mL de tampón de incubación
<b>Conjugado de biotina</b>	1 vial 5,5 mL	B-EKDSM-BC	Listo para usar
<b>Marcador de enzima</b> estreptavidina conjugada con HRP	1 vial 11 mL	B-EKDSM-EL	Listo para usar
<b>Sustrato de TMB</b> tamponado con citrato	1 vial 11 mL	B-TMB	Listo para usar
<b>Solución de interrupción</b> Ácido sulfúrico 0,25 M	1 vial 11 mL	B- STS	Listo para usar <b>Agente corrosivo</b>

Tabla 1

- <sup>1)</sup> El reactivo que esconde contiene una solución saturada de melatonina. Prevenga cualquier contaminación de otros reactivos del kit.
- <sup>2)</sup> 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.
- <sup>3)</sup> 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 Sellado / Sin Abrir	
Almacenar a 2-8 °C. No utilizar el kit después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.	
Reactivos Abiertos / Reconstituídos	
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. Almacénesse hasta 2 meses a 2-8°C.
Solución de pretratamiento	Almacénesse a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.
Solución neutralizante	
Tampón de incubación	
Tampón de lavado diluido	Almacénesse a 2-8°C hasta 6 meses
Reactivo blanco	Almacénesse a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas
Calibradores	
Controles	
Conjugado de biotina	Almacénesse a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas
Marcador de enzima	
Sustrato de TMB	
Solución de interrupción	

Tabla 2

**MATERIALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS**

- Pipetas de precisión con puntas desechables: pipetas de 5 µL, 50 µL, 100 µL y 1000 µL. Pipetas de repetición o pipetas de varios canales para 50 µL, 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.
- NovoLytiX Saliva Collection Devices, B-SLEEP-CHECK16 o B-SVC50.

---

## PRECAUCIONES

### Precauciones de seguridad

- Este ensayo es únicamente para uso in vitro, y debe ser manipulado por personal cualificado siguiendo buenas prácticas de laboratorio (BPL).
- Solución de pretratamiento, solución neutralizante, solución sustrato 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 sustrato (B-TMB) contiene tetrametilbenzidina (TMB). La solución de interrupción (B-STC) 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. Use la ropa protectora adecuada, guantes y protección ocular. Después del contacto con los ojos o la piel, lávese inmediatamente con abundante agua.
- 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

#### Reactivos del kit

- 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.
- **NUEVO:** El Reactivo Blanco (B-EKDSM-BR), los Calibradores del A al E (B-EKDSM-CASET) y los Controles (B-EKDSM-CONSET) se suministran como concentrados y sustituyen a la forma liofilizada. Después de añadir 1 mL de tampón de incubación (B-EKDSM-IB) cerrar bien los viales, agitar suavemente y girar un par de veces de arriba a abajo para reconstituir cualquier gota haya podido quedar en las paredes o en el tapón del vial.
- 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 2 de la instrucción 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.
- Los micropocillos no pueden ser reutilizados.
- Deje atemperar los reactivos hasta que alcancen la temperatura ambiente. Mezcle bien (con agitador de vórtice) los reactivos antes de su uso.

### 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.
- El procedimiento de análisis se ha optimizado para la aplicación de Sleep Check. 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 Sleep Check, se recomiendan determinaciones por duplicado.

---

## 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.

---

## RECOGIDA DE MUESTRAS

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

- No utilice dispositivos de recogida conteniendo ácido cítrico.
- No estimule el flujo de saliva al masticar chicles o sea comiendo limones.
- Los pacientes deben realizar la recogida sin actividades deportivas y un esfuerzo activo.
- Cuando se recoja saliva por la noche debe utilizarse una linterna suave o una luz amarilla de  $\leq 100$  lux para evitar una posible influencia de la luz sobre el perfil de melatonina.
- 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.

Enjuague sus bocas con agua 15 minutos antes de la recolección.

- 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.
- Los pacientes deben evitar cepillarse los dientes, con o sin pasta dentífrica, durante los períodos de muestreo. Es probable que los pacientes con gingivitis contaminen la saliva con plasma o incluso con sangre completa, lo que podría tener consecuencias desconocidas.
- En el día de la recogida, si es posible, no deberán tomarse ni aspirina ni medicamentos que contengan ibuprofeno (Brufen®, Algifor® Dismenol®, 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.

---

## 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 rpm (~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.

### Pre-tratamiento de la muestra 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 a una temperatura entre 18 y 28 °C.
- 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 rpm. 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 aluminio 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 (como blanco) por duplicado en los pocillos A1+A2.
- 3b. Pipetee 100 µL de tampón de incubación (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.

Pipetee 100 µL de estándar C por duplicado en los pocillos D1+D2.

Pipetee 100 µL de estándar D por duplicado en los pocillos E1+E2.

Pipetee 100 µL de estándar E por duplicado en los pocillos G1+G2

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, colóquela durante 1 minuto en un mezclador de placas ajustado a 600 rpm y luego 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 rpm.

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 cinco 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 rpm 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 cinco 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 sustrato alcance 18-28°C antes de su uso en el paso 11.

11. Añada 100 µL de la solución sustrato 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 rpm, 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 14 al cabo de 30 minutos como máximo.

14. Lea la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de microtitulación.

---

## 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 el rendimiento 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.

## ESTANDARDIZACIÓN

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

## 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 tampón de incubación ( $B_0$ ), considerando la absorbancia del tampón de incubación corregida por el NSB como el 100%.

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{porcentaje unido} = \frac{\text{absorbancia neta}}{\text{Absorbancia neta del tampón de incubación}} \times 100$$

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 4-parámetros logístico (4-PL).

### 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 tampón de incubación ( $B_0$ ), considerando la absorbancia del tampón de incubación corregida por el NSB como el 100%.
- Localice el valor  $B/B_0$  de las muestras en el eje vertical, dibuje una línea horizontal que corte la curva estándar y lea la concentración de melatonina (pg/mL) en el eje horizontal.

Véanse tabla 3 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.*

## LIMITACIONES DE RENDIMIENTO

Los resultados de la prueba se deben interpretar conjuntamente con la información disponible de la evaluación clínica del paciente y otros procedimientos diagnósticos.

## CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

### Precisión intraensayo: 12,6%.

Se calculó la precisión intraensayo 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: tabla 4.

**Precisión interensayo: 22,9%.** Se calculó la precisión interensayo a partir de los resultados de 17 procesos diferentes con cinco muestras, dentro de los límites habituales. Los resultados se presentan en: tabla 5

**Límite para el blanco (LoB): 0,5 pg/mL.** Se hizo un análisis de 32 pocillos de solución amortiguadora de incubación (tampón de incubación / 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 tampón de incubación y la intersección del valor con la curva estándar obtenida en el mismo proceso.

**Límite de cuantificación (LoQ): 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.

**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: tabla 6.

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: tabla 7.

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.

**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 NovoLytiX, y se presenta en: tabla 8.

---

## 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 NovoLytiX. El análisis posterior de regresión lineal produjo un factor de correlación de  $R^2 = 0,84$ , una intersección de  $0,77 \text{ pg/mL}$  y una pendiente de  $1,21$ . La correlación se presenta en figura 3.

# APPENDIX I

## TABLES AND FIGURES / TABELLEN UND ABBILDUNGEN / TABLES ET FIGURES / TABELLE E FIGURE / TABLAS Y FIGURAS

### Examples of results

	Conc. (pg/mL)	Absorbance (OD)	B/B0 (%)	CV Conc. (%)	Calc. Conc. (pg/mL)
Blank		0.075			
Blank		0.067		<b>5.6</b>	
<b>Avg.</b>		<b>0.071</b>			
Zero Calibrator	<b>0.0</b>	1.715	98.5		
Zero Calibrator		1.766	101.5	<b>2.1</b>	
<b>Avg.</b>		<b>1.741</b>	<b>100.0</b>		
Cal A		1.484	85.3		
Cal A	<b>0.6</b>	1.514	87.0	<b>1.4</b>	
<b>Avg.</b>		<b>1.499</b>	<b>86.1</b>		
Cal B		1.292	74.2		
Cal B	<b>1.5</b>	1.274	73.2	<b>1.0</b>	
<b>Avg.</b>		<b>1.283</b>	<b>73.7</b>		
Cal C		0.755	43.4		
Cal C	<b>4.0</b>	0.769	44.2	<b>1.3</b>	
<b>Avg.</b>		<b>0.762</b>	<b>43.8</b>		
Cal D		0.364	20.9		
Cal D	<b>10</b>	0.359	20.6	<b>1.0</b>	
<b>Avg.</b>		<b>0.362</b>	<b>20.8</b>		
Cal E		0.179	10.3		
Cal E	<b>25</b>	0.182	10.5	<b>1.2</b>	
<b>Avg.</b>		<b>0.181</b>	<b>10.4</b>		
Ctrl. high		0.560	32.2		6.2
Ctrl. high		0.553	31.8	<b>0.9</b>	6.3
<b>Avg.</b>		<b>0.557</b>	<b>32.0</b>		<b>6.2</b>
Ctrl. low		0.929	53.4		2.9
Ctrl. low		0.874	50.2	<b>4.3</b>	3.3
<b>Avg.</b>		<b>0.902</b>	<b>51.8</b>		<b>3.1</b>
Sample 01		0.414	23.8		8.9
Sample 01		0.404	23.2	<b>1.7</b>	9.2
<b>Avg.</b>		<b>0.409</b>	<b>23.5</b>		<b>9.0</b>
Sample 02		0.970	55.7		2.7
Sample 02		0.908	52.2	<b>4.7</b>	3.0
<b>Avg.</b>		<b>0.939</b>	<b>54.0</b>		<b>2.9</b>
Sample 03		1.215	69.8		1.6
Sample 03		1.162	66.8	<b>3.2</b>	1.8
<b>Avg.</b>		<b>1.189</b>	<b>68.3</b>		<b>1.7</b>

Table 3

ED20 = 10.9 pg/mL    ED50 = 3.3 pg/mL    ED80 = 1.0 pg/mL

### Example of Standard Curve (OD<sub>450</sub>)

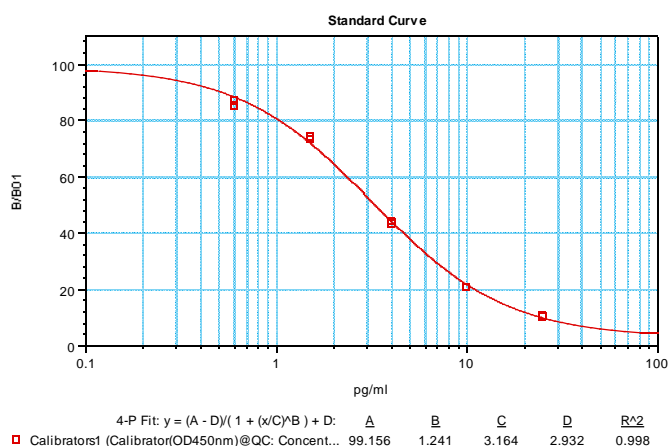


Figure 1

### Pipetting Scheme

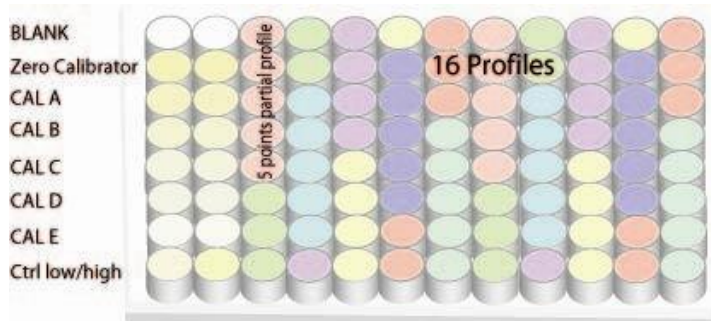


Figure 2

### 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 4

### 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 5

### Dilution Linearity

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 6

**APPENDIX I**

**TABLES AND FIGURES / TABELLEN UND ABBILDUNGEN / TABLES ET FIGURES / TABELLE E FIGURE / TABLAS Y FIGURAS**

**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 7

**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-methoxyorsoralen	< 0.001
5-methoxytryptophol	0.002
chloromelatonin	1.3
caffeine	< 0.001
caffeine acid	<0.001
soluble coffee	<0.001
soluble coffee decaffeinated	<0.001

Table 8

**Comparison EK-DSM vs. RK-DSM**

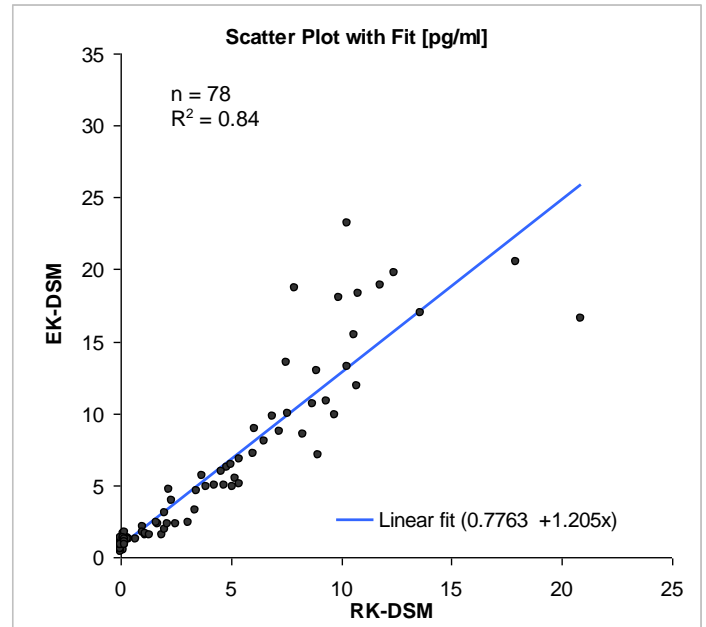


Figure 3



---

## APPENDIX II

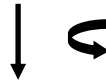
### REFERENCES / LITERATURREFERENZEN / RÉFÉRENCES / RIFERIMENTI / REFERENCIAS

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 & Controls)**

Clean polypropylene tube

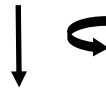
200 µl Saliva Sample or Control  
25 µl Pretreatment Solution



*Vortex, 5 sec*

*Incubate, 10 min, 18-28°C*

25 µl Neutralization Solution



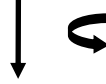
*Vortex, 5 sec*

*Centrifuge at 10'000 rpm for 5 min*

Proceed to ELISA procedure

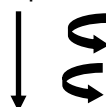
**Direct Saliva Melatonin  
ELISA Procedure**

Precoated Microtiter Plate



*Wash 2x with ≥300µL wash buffer*

100 µl Calibrators, Pretreated Controls  
or Samples



*1 minute on a plate orbital shaker*

*Incubate 16-20 hours at 2-8°C*

add 50 µl Melatonin-Biotin-Conjugate



*1 minute on a plate orbital shaker*

*3 hours at 2-8°C*

*Wash 5x with ≥300µL wash buffer*

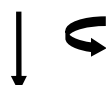
add 100 µl Enzyme Label



*60 minutes at 18-28°C  
on a plate orbital shaker*

*Wash 5x*

add 100 µl TMB Substrate



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





add 100 µl Stop Solution

➔ Read absorbance at 450 nm (within 30 minutes)



APPENDIX V

SYMBOLS / SYMBOLE / SYMBOLES / SIMBOLI / SIMBOLOS

Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad
<b>REF</b>	Order Code Bestellnummer Code Codice Código
<b>LOT</b>	Batch Code Lotbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote
<b>IVD</b>	<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
<b>REAG PRE</b>	Pretreatment Reagent Vorbehandlungs Reagenz réactif de prétraitement reagente di pretrattamento reactivo del tratamiento previo
<b>SOLN NEUT</b>	Neutralizing Solution Neutralisierungs-Lösung Solution neutralisante Soluzione neutralizzante Solución neutraliza
<b>MP</b>	Microtiter plate Mikrotiterplatte Microplaque Micropiastra Placa de microtitulación

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

