

# Direct Saliva MELATONIN RIA

RK-DSM2

200 tests

Version: 05  
Revision date: 2023-06-08

# ENGLISH

## INTENDED USE

The Direct Saliva Melatonin Radio Immunoassay (RIA) test kit is intended for the direct, quantitative determination of melatonin in human saliva (1-4).

## PRINCIPLE OF THE ASSAY

The Direct Saliva Melatonin RIA kit measures melatonin by a double-antibody radio immunoassay based on the Kennaway G280 anti-melatonin antibody (5,6). Human saliva samples and reconstituted standards and controls are incubated with the anti-melatonin antibody and <sup>125</sup>I-melatonin. <sup>125</sup>I-melatonin competes with melatonin present in samples, standards and controls. After 20 hours of incubation, solid-phase second antibody is added to the mixture in order to precipitate the antibody-bound fraction. After aspiration of the unbound fraction, the antibody bound fraction of <sup>125</sup>I-melatonin is counted.

## REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity	Code	Reconstitution
<b>Incubation Buffer</b>	1 vial 100 ml	B-DSM-IB	Ready to use
<b>Antiserum</b> anti-melatonin antibody	2 vials 11 ml	B-DSM-AS	Ready to use
<b>Tracer</b> <sup>125</sup> I-melatonin	2 vials 11 ml	B-MEL-TR	Ready to use
<b>Calibrator A - E<sup>1)</sup></b> melatonin concentrate	1 set of 5 vials lyoph.	B-MEL-CASET	Reconstitute with 5.0 mL of Incubation Buffer
<b>Controls low/high<sup>2)</sup></b> melatonin concentrate	1 set of 2 vials lyoph.	B-DSM- CONSET	Reconstitute with 5.0 mL of Incubation Buffer
<b>2<sup>nd</sup> Antibody</b> solid phase bound second antibody	2 vials 11 ml	B-AB2	Ready to use

Table 1

<sup>1)</sup> After reconstitution the Calibrators A to E contain 0.5, 1.5, 5, 15 and 50 pg/ml of melatonin, respectively. Reconstitute each vial with 5.0 mL of Incubation Buffer and mix. Leave for at least 10 minutes at 2-8°C and shake gently several times before use.

<sup>2)</sup> Lot specific amounts of melatonin. Reconstitute each vial with 5.0 mL of Incubation Buffer and mix. Leave for at least 10 minutes at 2-8°C and shake gently several times before use.

## STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

Unopened reagents	
All unopened kit components are stable at 2-8°C until the expiration date.	
Opened / reconstituted reagents	
Incubation Buffer	Stable at 2-8°C until expiration date printed on the labels.
Antiserum	
Tracer	
Calibrators	Stable for at least 4 months after reconstitution at 2-8°C.
Controls	
2 <sup>nd</sup> Antibody	Store refrigerated ( <b>Do not freeze!</b> ) Stable at 2-8°C until expiration date printed on the label.

Table 2

## WARNINGS AND PRECAUTIONS

### SAFETY PRECAUTIONS

- This kit contains an ionizing gamma-emitter with a half-life of 59.4 days (125-iodinated Melatonin; radionuclid is 125-iodine, <sup>125</sup>I). The activity of the radioactive material in this kit does not exceed 74 kBq (2 µCi) of 125-iodine.
- Receipt, acquisition, possession, use, and transfer are subject to the local regulations. Unused solutions and radioactive waste should be disposed of according to local State and Federal regulations.

### TECHNICAL PRECAUTIONS

- Read carefully the instructions prior to carrying out the test. Test performance will be adversely affected if reagents are incorrectly diluted, modified or stored under conditions other than those as detailed in this instruction for use.
- Incorrect results for standard curve, controls or samples may be obtained, if the 2nd antibody was not mixed sufficiently before pipetting. Do not freeze the 2nd antibody!
- Components must not be used after the expiry date printed on the labels.
- Do not mix different lots of reagents.
- Reconstitute the lyophilized reagents as indicated. Mix (vortex) well all reagents, particularly the Antiserum, and then let the reagents adjust to reach room temperature before use.
- Counting time should be selected in order to keep statistical counting error small: e.g., at 2000 cpm the counting error is at 5%; at 10000 cpm it is only 1%.
- If the initial concentration of an unknown sample reads above the highest calibrator, the sample should be further diluted with incubation buffer and tested again according to the assay procedure.
- The procedure was tested and validated for human saliva samples. If other saliva specimen have to be used, it is recommended to either validate possible matrix effects with melatonin-free saliva specimen or extract the saliva samples by C18 reversed-phase column extraction (B-MEC).

## EQUIPMENT REQUIRED

- 100 µl, 400 µl, 1000 µl and 5000 µl precision pipettes (or preferably a 100-1000 µl adjustable multipipette) with disposable tips.
- Refrigerated centrifuge.
- Vortex mixer.
- Stir bar and magnetic stirrer.
- Aspiration device.
- Gamma-counter.

## MATERIALS RECOMMENDED BUT NOT PROVIDED

- Saliva Collection Devices: B-SLEEPCHECK16 or B-SVC50.
- Disposable polystyrene tubes for the RIA (preferably conical tubes; e.g. Sarstedt # 57.477).
- Deionized double distilled water.

## SALIVA COLLECTION AND STORAGE

### Collection of Saliva

- Collect saliva using the Saliva Collection Device. One of these cotton swabs can absorb up to 3 ml of saliva. The procedure calls for 1 ml of saliva for duplicate determinations. **Do not use cotton swabs containing citric acid.**
- Subjects ideally refrain from eating during the sampling period. If this is not possible, subjects should be permitted to eat immediately after a collection only and rinse their mouths with water 15 minutes before the next collection.
- Avoid beverages containing artificial colorants as well as alcoholic beverages during the sampling period. Coffee is not permitted - it is counter indicated in sleep studies anyway. In view of some recent reports on melatonin in some foods, it is suggested that bananas should not be eaten during the sampling period.
- Subjects should avoid brushing their teeth, with or without toothpaste, during sampling periods. It is likely that subjects with gingivitis will contaminate the saliva with plasma or even whole blood leading to unknown consequences.
- Do not stimulate saliva flow by chewing gums or eating lemons.

- When collecting saliva at night, a dim flashlight or a  $\leq 100$  lux yellow light should be used in order to avoid a possible light influence on the melatonin profile.

#### Storage:

Saliva samples absorbed in cotton swabs can 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 can be stored for at least 6 months at  $\leq -20^\circ\text{C}$ . Repeated freeze-thaw cycles should be avoided. Thaw (if frozen) and centrifuge the saliva samples for 5 minutes at 1000 x g and 2-8°C prior to testing. Transfer the clear supernatant into a new vial.

#### ASSAY PROCEDURE

1. Label conical polystyrene tubes in duplicates (8x2): A to E for the calibrators, NSB for the blank tubes, MB for the maximum binding tubes and T for the total activity tubes. Label additional tubes in duplicate for controls and saliva samples.
- 2a. Pipet 500  $\mu\text{l}$  of incubation buffer into the NSB tubes and 400  $\mu\text{l}$  of incubation buffer into the MB tubes.
- 2b. Pipet 400  $\mu\text{l}$  of the calibrators A to E into the corresponding tubes.
- 2c. Pipet 400  $\mu\text{l}$  of the controls and saliva samples into each of the correspondingly marked tubes.
3. Add 100  $\mu\text{l}$  of the melatonin antibody to all tubes **except** the NSB and T tubes.
4. Add 100  $\mu\text{l}$  of the  $^{125}\text{I}$ -melatonin tracer to all tubes. Vortex. Remove the T tubes, they will need no further processing until counting at step 10.
5. Incubate all tubes for  $20 \pm 4$  hours at 2-8°C.
- 6a. Invert the bottle containing the solid phase second antibody several times, add a stir bar and resolve the sediment using a magnetic stirrer.
- 6b. While stirring the second antibody suspension continuously, add 100  $\mu\text{l}$  of the suspension to all assay tubes (except the T tubes). Vortex.
7. Incubate for  $15 \pm 1$  minutes at 2-8°C.
8. Add 1 ml of cold, deionized water (2-8°C) to all assay tubes (except the T tubes).
9. Centrifuge for 2 minutes at 2000 x g and 2-8°C. Aspirate the supernatants (except the T tubes) and retain the precipitates for counting.
10. Count the tubes for 2 minutes in a gamma-counter.

#### RESULTS & STANDARDIZATION

1. Record the cpm for all tubes (T, NSB, MB, Calibrators A, B, C, D, E, samples and controls) and calculate the mean cpm for each pair of tubes.
2. Subtract the mean assay blank (NSB tubes) from the respective mean of each pair of tubes:  
$$\text{Net cpm} = \text{cpm}_{\text{Average}} - \text{cpm}_{\text{Average NSB}}$$
3. Calculate the binding of each pair of tubes as a percent of maximum binding (MB tubes), with the NSB-corrected cpm of the MB tubes taken as 100%:  
$$\text{percent bound} = \frac{\text{net cpm}}{\text{net MB cpm}} \times 100$$
4. Prepare a lin/log graph paper and plot the percent bound on the vertical axis against the melatonin concentration (pg/ml) on the horizontal axis for each of the calibrators. Draw the best fitting curve or calculate the standard curve using a four-parameter logistic (4-PL), a spline smoothed or an equivalent algorithm.
5. Determine the melatonin concentrations for the patient controls and samples from this standard curve.

Alternative data reduction methods are equally acceptable.

See Table 10 and Figure 1 for examples of a standard curve. This standard curve is for demonstration purposes only. A standard curve must be generated for each set of samples to be assayed.

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

#### QUALITY CONTROL

A thorough understanding of this instruction for use (IFU) is necessary for the successful use of the product. Reliable results will be obtained only by using precise laboratory techniques (current GLP guidelines) and accurately following this instruction for use.

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 QC Data Sheet added to the kit. If the precision of the assay does not correlate with the established limits and repetition excludes errors in technique, check the following issues: i) pipetting, temperature controlling and timing devices ii) expiration dates of reagents iii) storage and incubation conditions iv) purity of water.

#### LIMITATIONS

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

#### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The assay performance characteristics have been validated in duplicates.

**Intra-Assay Precision (Within-Run): 2.6-20.1%.** The intra-assay precision was calculated from results of 20 pairs of values from each saliva sample from different daytime in a single run. The values are presented in Table 12.

**Inter-Assay Precision (Run-to-Run): 6.6-16.7%.** The inter-assay precision was calculated from results of 20 pairs of values from each saliva sample from different daytime in 20 different runs. The values are presented in Table 12.

**Detection Limit (LoB): 0.2 pg/ml (0.9 pmol/l).** Twenty zero Calibrator (MB) replicates were assayed in a single run. The minimum detectable concentration of melatonin in 400  $\mu\text{l}$  incubation buffer was calculated by subtracting two standard deviations of averaged zero Calibrator duplicates from the counts at maximum binding and intersecting this value with the standard curve obtained in the same run.

**Detection Limit (LoQ): 0.9 pg/ml (4.0 pmol/l).** The functional least detectable dose (FLDD) of the assay is the minimal melatonin concentration in saliva that can be measured with an intra-assay coefficient of variation (CV) of less than 10%. The limit of quantification was determined from 13 different saliva samples each measured at least 10 times in a single run.

**Dilution Linearity/Parallelism: 93.1%.** Two human saliva sample spiked with 40 pg/ml of melatonin were diluted with Incubation Buffer and subsequently assayed according to the assay procedure. The values are presented in Table 13.

**Spiking Recovery: 106%.** Three saliva samples were spiked with increasing amounts of melatonin and analyzed according to the assay procedure. The values are presented in Table 14.

**Specificity:** In Table 15 the following cross-reactivities of the melatonin antiserum were found at 50 % binding.

# DEUTSCH

## ANWENDUNGSZWECK

Der Direct Saliva Melatonin Radioimmunoassay (RIA) wird für die direkte, quantitative Bestimmung von Melatonin aus humanen Speichelproben (Saliva) verwendet (1-4).

## PRINZIP DER METHODE

Der Direct Saliva Melatonin RIA Kit misst mittels eines Doppelantikörper Radioimmunoassays welcher auf dem Kennaway G280 anti-Melatonin Antikörper (5,6) basiert. Speichelproben sowie rekonstituierte Kontrollen und Kalibratoren werden zusammen mit dem anti-Melatonin Antikörper (Ak) und <sup>125</sup>I-Melatonin inkubiert. <sup>125</sup>I-Melatonin konkurriert mit dem in den Proben, in den Kalibratoren und in den Kontrollen vorhandenen Melatonin. Nach einer 20 Stunden Inkubation wird ein zweiter Antikörper, gebunden an eine feste Phase, zugegeben, um die antikörpergebundene Fraktion zu präzipitieren. Nach der Aspiration der ungebundenen Fraktion wird die antikörpergebundene Fraktion von <sup>125</sup>I-Melatonin in einem Gammazähler gemessen.

## GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenzien	Menge	Art.-Nr.	Rekonstitution
<b>Inkubations-Puffer</b>	1 Flasche 100 mL	B-DSM-IB	gebrauchsfertig
<b>Antiserum</b> anti-Melatonin Ak	2 Flaschen 11 mL	B-DSM-AS	gebrauchsfertig
<b>Tracer</b> <sup>125</sup> I-Melatonin	2 Flaschen 11 mL	B-MEL-TR	gebrauchsfertig
<b>Kalibratoren A - E<sup>1)</sup></b> Melatoninkonzentrat	5 Flaschen Konzentrat lyoph.	B-MEL- CASET	Mit 5.0 mL Inkubations-Puffer lösen
<b>Kontrollen tief/hoch<sup>2)</sup></b> Melatoninkonzentrat	2 Flaschen Konzentrat lyoph.	B-DSM- CONSET	Mit 5.0 mL Inkubations-Puffer lösen
<b>2. Antikörper</b> Ak gebunden an eine Festphase	2 Flaschen 11 mL	B-AB2	gebrauchsfertig

Table 3

<sup>1)</sup> Die Kalibratoren A bis E enthalten nach der Rekonstitution 0.5, 1.5, 5, 15 and 50 pg/ml Melatonin. Der Inhalt jeder Flasche wird mit 5.0 mL Inkubations-Puffer rekonstituiert. Danach für mindestens 10 Minuten bei 2-8°C stehen lassen und vor Gebrauch mehrmals leicht schütteln.

<sup>2)</sup> Lot-abhängige Menge an Melatonin. Jede Kontrolle wird mit 5.0 mL Inkubations-Puffer rekonstituiert. Danach für mindestens 10 Minuten bei 2-8°C stehen lassen und vor Gebrauch mehrmals leicht schütteln.

## LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Ungeöffnete Reagenzien	
Sämtliche ungeöffneten Kitkomponenten sind bis zum Verfallsdatum bei 2-8°C haltbar.	
Opened / reconstituted reagents	
Inkubations-Puffer	Bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum haltbar.
Antiserum	
Tracer	
Kalibratoren	Bei 2-8°C für mindestens 4 Monate haltbar.
Kontrollen	
2. Antikörper	Gekühlt lagern ( <b>Nicht einfrieren!</b> ) Bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum.

Table 4

## WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

### SICHERHEITSMASSNAHMEN

- Radioaktives Material: Der Kit enthält einen Gamma-Strahler mit einer Halbwertszeit von 59.4 Tagen (<sup>125</sup>-iodiertes Melatonin; das Radionuklid ist <sup>125</sup>-Jod, <sup>125</sup>I). Die Aktivität des radioaktiven Materials in diesem Kit übersteigt 74 kBq (2 µCi) nicht.
- Der Erwerb, sowie der Gebrauch von radioaktivem Material muss entsprechend der landesspezifischen

Bestimmungen erfolgen. Wir empfehlen, dass Sie sich über die lokalen Bestimmungen Ihres Landes bezüglich der Vorsichtsmaßnahmen beim Gebrauch und der Entsorgung von Kitreagenzien, radioaktivem Material und Patientenproben informieren.

## TECHNISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

- Lesen Sie die Arbeitsanleitung sorgfältig vor der Testdurchführung. Die Testqualität kann negativ beeinflusst werden, wenn die Reagenzien nicht korrekt verdünnt oder verändert werden sowie nicht entsprechend der in dieser Anleitung angegebenen Lagerungsbedingungen gelagert werden.
- Falsche Resultate für die Standardkurve, Kontrollen oder Proben können entstehen, wenn der 2. Antikörper vor der Zugabe nicht ausreichend gemischt wurde. 2. Antikörper nicht einfrieren!
- Die Reagenzien dürfen nicht nach dem Verfallsdatum verwendet werden, das auf den Etiketten angegeben ist.
- Mischen Sie nicht Reagenzien verschiedener Lots.
- Lösen Sie die lyophilisierten Reagenzien wie angegeben auf. Mischen (vortexen) Sie alle Reagenzien, besonders aber das Antiserum, sehr gut, und lassen Sie die Reagenzien vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur äquilibrieren.
- Die Zählzeit sollte so gewählt werden, dass der statische Zählfehler klein ist. Bei 2000 cpm ist der Zählfehler bei 5%; bei 10000 cpm nur noch 1%.
- Falls die Konzentration einer unbekannt Probe höher als der höchste Kalibrator ist, muss die Probe mit Inkubationspuffer weiter verdünnt und noch einmal getestet werden.
- Die Arbeitsanleitung wurde für den Einsatz von humanen Salivaproben getestet und validiert. Falls Salivaproben von anderen Spezies getestet werden sollen, wird empfohlen entweder mögliche Matrixeffekte mit Melatonin-freien Salivaproben zu validieren oder die Salivaproben über eine C18 reversed-phase Extraktionssäule (B-MEC) aufzureinigen.

## ERFORDERLICHE LABORGERÄTE

- 100, 400, 1000 und 5000 µl Präzisionspipetten (oder vorzugsweise 100-1000 µl verstellbare Multipipetten) mit Einwegspitzen.
- Gekühlte Zentrifuge
- Vortex Schüttler
- Magnetrührer mit Rührstab
- Aspirationsvorrichtung
- Gammastrahlungszähler.

## EMPFOHLENE HILFSMITTEL (NICHT MITGELIEFERT)

- Speichelgewinnungssets, B-SLEEPHECK-16 oder B-SVC-50.
- Einweg Polystyrolröhrchen für den RIA (z.B. konische Röhrchen von Sarstedt; Nr. 57.477)
- Deionisiertes doppelt destilliertes Wasser.

## UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

### Vorsichtsmassnahmen bei der Probengewinnung

- Speichelproben werden mit Hilfe des Sammelbestecks für Speichel abgenommen. Eine Watterolle kann bis zu 3 ml Speichel aufnehmen. Für eine Doppelbestimmung im Testansatz benötigt man 1 ml Speichel. **Watterollen, die Zitronensäure enthalten, dürfen nicht verwendet werden.**
- Nach Möglichkeit sollte der Patient während der Zeit der Probengewinnung keine Nahrung aufnehmen. Falls dies nicht möglich ist, kann dem Patienten erlaubt werden

unmittelbar nach der Probengewinnung zu essen, dabei sollte er aber 15 Minuten vor der nächsten Probengewinnung den Mund mit Wasser spülen.

- Getränke mit künstlichen Lebensmittelfarben sowie alkoholische Getränke sollten während der Zeit der Probengewinnung vermieden werden. Der Genuß von Kaffee muß untersagt werden – während Schlafstudien ist dies ohnehin kontraindiziert. Angesichts einiger kürzlich erschienen Publikationen betreffend Melatonin in Lebensmitteln, ist es ratsam auf den Verzehr von Bananen während der Zeit der Probengewinnung zu verzichten.
- 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.
- Der Speichelfluß darf nicht durch Kaugummi kauen oder dem Verzehr von Zitronen stimuliert werden.
- Probensammlungen während der Nacht sollten bei gedämpftem Licht ( $\leq 100$  Lux) durchgeführt werden, um einen Einfluß des Lichts auf das Melatonin-Profil auszuschließen.

### Lagerung

Die Speichelprobe in der Watterolle kann im Sammelbesteck bis zu 7 Tage bei 2-8°C aufbewahrt werden. Falls die Proben nicht innerhalb einer Woche gemessen werden, sollten sie bei  $\leq -20^\circ\text{C}$  eingefroren werden. Sie können dadurch für mindestens 6 Monate gelagert werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden.

Aufgetaute Speichelproben müssen vor dem Ansatz 5 Minuten bei 1000 x g und 2-8°C zentrifugiert werden. Den klaren Überstand in ein neues Röhrchen transferieren.

### ARBEITSANLEITUNG

1. Konische Polystyrol-Röhrchen für einen Doppelansatz beschriften (2x8): A bis E für die Kalibratorröhrchen, NSB (Unspezifische Bindung) für das „Blank“-Röhrchen, MB für das maximale Bindungs-Röhrchen und T für das Total Aktivitätsröhrchen. Weitere Röhrchen für Kontrollen und Speichelproben für Doppelbestimmungen beschriften.
- 2a. 500  $\mu\text{l}$  Inkubations-Puffer in das NSB Röhrchen und 400  $\mu\text{l}$  Inkubations-Puffer in das MB Röhrchen pipettieren.
- 2b. 400  $\mu\text{l}$  Kalibrator A bis E in die entsprechenden Röhrchen pipettieren.
- 2c. 400  $\mu\text{l}$  Kontrollen und Speichelproben in die entsprechenden Röhrchen pipettieren.
3. 100  $\mu\text{l}$  Antiserum zu allen Röhrchen ausser dem NSB und T Röhrchen geben. Vortexen.
4. 100  $\mu\text{l}$  125I-Melatonin Tracer zu allen Röhrchen geben. Vortexen. T Röhrchen bei Seite stellen, da dieses vor dem Meßschritt nicht weiter behandelt werden muß.
5. Alle Röhrchen für 20 ( $\pm 4$ ) Stunden bei 2-8°C inkubieren.
- 6a. Die Flasche mit dem Festphasen 2. Antikörper mehrmals schwenken, um das Sediment aufzulösen, einen Rührstab zugeben und auf einen Magnetrührer stellen.
- 6b. Während des Rührens, 100  $\mu\text{l}$  der 2. Antikörperlösung zu allen Teströhrchen (außer T Röhrchen) zugeben. Vortexen.
7. Für 15 ( $\pm 2$ ) Min bei 2-8°C inkubieren
8. 1 ml kaltes, bidestilliertes Wasser zu allen Teströhrchen (ausser T Röhrchen) zugeben.
9. Für 2 min bei 2000 x g und 2-8°C zentrifugieren. Den Überstand absaugen (außer T Röhrchen) und das Präzipitat für die Messung zurückbehalten.
10. Die Röhrchen für 2 Min in einem Gammazähler messen.

### RESULTATE & STANDARDISIERUNG

- Für alle Röhrchen werden im Gammazähler die cpm bestimmt (T, NSB, MB, A, B, C, D, E-Kalibratoren, Proben und Kontrollen) und die entsprechenden Mittelwerte ermittelt.
- Der Mittelwert vom Blank (NSB) wird von den anderen Mittelwerten subtrahiert.

$$\text{Netto cpm} = \text{cpm}_{\text{Mittelwert}} - \text{cpm}_{\text{Mittelwert NSB}}$$

- Die Bindung jedes einzelnen Mittelwertes wird in Beziehung zur maximalen Bindung (MB) gestellt. MB ist ebenfalls NSB korrigiert und wird als 100% gesetzt

$$\% \text{ Bindung} = \frac{\text{netto cpm}}{\text{netto MB cpm}} \times 100$$

- Auf einem halblogarithmischen (lin/log) Papier wird auf der vertikalen Achse die Bindung in Prozent und auf der horizontalen Achse die Melatonin Konzentration der Kalibratoren (pg/ml) aufgetragen. Die beste, passende Kurve durch die Punkte zeichnen oder mit einem entsprechenden Computerprogramm einen 4-Parameter Logistic (4-PL), einen „spline smoothed“ oder äquivalenten Algorithmus anwenden.
- Die Melatoninkonzentrationen der Patientenproben und der Kontrollen aus der erstellten Standardkurve herauslesen. Alternative Datenverdichtungsmethoden können ebenfalls verwendet werden.

Siehe Table 10 und Figure 1 für ein Zahlenbeispiel und eine Standardkurve. Diese Standardkurve ist nur zu Anschauungszwecken dargestellt. Für jeden Ansatz muss eine Standardkurve erstellt werden.

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

### QUALITÄTSKONTROLLE

Ein vollständiges Verständnis dieser Testpackungsbeilage ist für den erfolgreichen Gebrauch des Produktes notwendig. Zuverlässige Resultate werden nur erreicht, durch die Anwendung „Guter Laborpraxis“ (aktuelle GLP Richtlinien) und die Einhaltung der Arbeitsanleitung.

Die Reproduzierbarkeit der Eichkurvenparameter und der Kontrollwerte sollte innerhalb des etablierten Erwartungsbereiches liegen. Alle Kontrollen müssen im etablierten Vertrauensbereich liegen. Die Vertrauensbereiche der Kontrollen sind Lot-spezifisch und sind auf dem zusätzlichen Kontrollblatt angegeben.

Falls die Präzision des Testes nicht mit dem etablierten Erwartungsbereich übereinstimmt und wiederholte Messungen ein technisches Problem ausschließen, sind folgende Bedingungen zu überprüfen: i) Pipettierung, Temperatur- und Zeitmessende Geräte, ii) Verfallsdaten der Reagenzien, iii) Lagerung- und Inkubations-Bedingungen, iv) Wasserreinheit.

### LEISTUNGSEINSCHRÄNKUNGEN

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

### LEISTUNGSMERKMALE

Die Leistungsmerkmale wurden in Doppelbestimmungen ermittelt.

**Intra-Assay Präzision: 2.6-20.1%.** Die Intra-Assay Präzision wurde aus den Resultaten von 20 Doppelbestimmungen im gleichen Ansatz berechnet. Die vier Salivaproben wurden während verschiedenen Tageszeiten gesammelt. Die Ergebnisse sind in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** dargestellt.

**Inter-Assay Präzision: 6.6-16.7%.** Die Inter-Assay Präzision wurde aus den Resultaten von 20 Doppelbestimmungen in 20

verschiedenen Ansätzen berechnet. Die vier Salivaproben wurden während verschiedenen Tageszeiten gesammelt. Die Ergebnisse sind in Table 12 dargestellt.

**Nachweisgrenze (LoB): 0.2 pg/ml (0.9 pmol/l).** Zwanzig Nullkalibratoren (MB=Inkubations-Puffer) Doppelwerte wurden im gleichen Ansatz bestimmt. Die kleinste nachweisbare Melatonin Menge in 400 µl Inkubationspuffer wurde durch die Subtraktion von zwei Standardabweichungen vom gemittelten Nullkalibrator berechnet und durch Interpolation auf der entsprechenden Standardkurve ermittelt.

**Nachweisgrenze (LoQ): 0.9 pg/ml (4.0 pmol/l).** Die funktionell tiefste nachweisbare Menge (Limit of Quantitation) des Tests ist die kleinste Melatonin-konzentration im Saliva, die im Intra-Assay einen Variationskoeffizienten (CV) aufweist, der kleiner als 10% ist. Die LoQ wurde mittels 13 verschiedenen Salivaproben bestimmt, welche mindestens zehnfach im gleichen Ansatz getestet wurden.

**Verdünnungslinearität: 93.1%.** Zwei Salivaproben wurden mit 40 pg/ml Melatonin versetzt und mit Inkubationspuffer unterschiedlich verdünnt. Diese Proben wurden entsprechend der Arbeitsanleitung getestet. Die Ergebnisse sind in Table 13 dargestellt.

**Wiederfindung: 106%.** Drei Salivaproben wurden mit aufsteigender Menge Melatonin versetzt und entsprechend der Arbeitsanleitung getestet. Die Ergebnisse sind in Table 14 dargestellt.

**Spezifität:** In Table 15 sind die Kreuzreaktivitäten des Melatoninantisera bei einer Bindung von 50% aufgelistet.

## FRANCAIS

### DOMAINE D'UTILISATION

La trousse « Direct Saliva Melatonin » est un radio-immunoassay (RIA) conçu pour la détermination directe et quantitative de la mélatonine dans les échantillons de salive humaine (1-4).

### PRINCIPE DU DOSAGE

La trousse « Direct Saliva Melatonin RIA » permet la mesure de mélatonine au moyen d'un RIA à double anticorps sur la base de l'anticorps Kennaway G280 anti-mélatonine (5,6). Les échantillons, les contrôles et les calibrateurs reconstitués sont incubés avec l'anticorps anti-mélatonine et la mélatonine marquée à l'<sup>125</sup>I. La <sup>125</sup>I-mélatonine se trouve en compétition avec la mélatonine présente dans les échantillons, les calibrateurs et les contrôles. Après 20 heures d'incubation, un deuxième anticorps (phase solide) est ajouté au mélange afin de précipiter les fractions liées. Après élimination de la fraction libre (par aspiration), la fraction de <sup>125</sup>I-mélatonine liée à l'anticorps est mesurée.

### REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Reconstitution
<b>Tampon d'incubation</b>	1 flacon 100 ml	B-DSM-IB	Prêts à l'emploi
<b>Antisérum anti-mélatonin</b>	2 flacons 11 ml	B-DSM-AS	Prêts à l'emploi
<b>Traceur <sup>125</sup>I-mélatonin</b>	2 flacons 11 ml	B-MEL-TR	Prêts à l'emploi
<b>Calibrateurs<sup>1)</sup> mélatonine conc.</b>	5 flacons lyoph.	B-MEL-CASET	A reconstituer avec 5.0 ml de tampon d'incubation
<b>Contrôles bas/élevé<sup>2)</sup> mélatonine conc.</b>	2 flacons lyoph.	B-DSM-CONSET	A reconstituer avec 5.0 ml de tampon d'incubation

<b>2<sup>ème</sup> anticorps phase solide</b>	2 flacons 11 ml	B-AB2	Prêts à l'emploi
---	--------------------	-------	------------------

Table 5

- Après reconstitution, les calibrateurs contiennent respectivement 0.5, 1.5, 5, 15 et 50 pg/ml de mélatonine. Il convient de reconstituer chaque calibrateur avec 5.0 ml de tampon d'incubation. Laisser reposer pendant au moins 10 minutes à 2-8°C et secouer doucement plusieurs fois avant utilisation.
- Concentration de mélatonine spécifique à chaque lot. Il convient de reconstituer chaque contrôle avec 5.0 ml de tampon d'incubation Laisser reposer pendant au moins 10 minutes à 2-8°C et secouer doucement plusieurs fois avant utilisation.

### STOCKAGE ET PEREMPTION DES REACTIFS

Réactifs fermés / non entamés	
Stocker à 2-8°C. Ne pas dépasser la date de péremption	
Réactifs ouverts / reconstitués	
Tampon d'incubation	Stables à 2-8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette
Antisérum	
Traceur	
Calibrateurs	Stable à 2-8°C durant 4 mois après reconstitution.
Contrôles	
2 <sup>ème</sup> anticorps	A conserver réfrigéré ( <b>ne pas congeler!</b> ) Stable à 2-8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette

Table 6

### AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

#### PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ

Matériel radioactif: Cette trousse contient une matière radioactive émettant des rayonnements gamma ionisants avec une demi-vie de 59.4 jours (mélatonine couplée à l'<sup>125</sup>Iode; le radionucléide est 125-Iode, <sup>125</sup>I). L'activité de la matière radioactive dans cette trousse ne dépasse pas 74 kBq (2 µCi) d'<sup>125</sup>Iode.

- La réception, l'acquisition, la possession, l'utilisation et le transfert de substances radioactives ne doivent se faire qu'en respectant la réglementation de chaque pays. Nous conseillons vivement à tous les utilisateurs de s'adresser aux autorités locales afin d'obtenir les directives précises concernant l'utilisation des réactifs contenus dans la trousse et la gestion des déchets radioactifs et biologiques (échantillons analysés).

#### PRÉCAUTIONS TECHNIQUES

- 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.
- L'homogénéisation de la suspension du second anticorps est essentielle pour éviter des résultats erronés. **Ne pas congeler le second anticorps.**
- 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.
- Reconstituer les réactifs lyophilisés comme indiqué. Bien mélanger les réactifs (au vortex), particulièrement l'Antisérum, et laisser les réactifs revenir à température ambiante avant utilisation.
- Le temps de comptage devrait être suffisant de manière à éviter des erreurs statistiques (ex. au comptage de 2000 cpm correspond une marge d'erreur de 5%; le comptage de 10000 induit une marge d'erreur de 1%).
- Si les résultats obtenus sont supérieurs au calibrateur le plus concentré, il convient de procéder à la dilution de l'échantillon avec le tampon d'incubation préalablement à un nouveau dosage.

- La procédure est validée pour des échantillons de salive humaine. Si toutefois des échantillons d'origine différente doivent être testés, il convient de valider les éventuels effets de matrice avec un échantillon de salive exempt de mélatonine ou de procéder à une extraction préalable au moyen de colonne C18 (reversed-phase column extraction).

### ÉQUIPEMENT REQUIS

- Pipettes de précision réglables avec pointes jetables pour 100, 400, 1000 et 5000 µl.
- Centrifugeuse réfrigérée
- Vortex
- Agitateur magnétique et support
- Système d'aspiration
- Compteur – Gamma.

### MATERIEL RECOMMANDÉ MAIS NON FOURNI

- Dispositif de prélèvement de l'échantillon de salive, B-SLEEPCHECK-16 ou B-SVC-50.
- Tubes jetables pour RIA en polystyrène (*par ex.* tubes coniques Sarstedt; n° 57.477)
- Eau doublement distillée dé-ionisée (ultra pure).

### PRELEVEMENTS DES ECHANTILLONS DE SALIVE ET CONSERVATION

#### Précautions lors des prélèvements d'échantillons de salive

- Le prélèvement de salive doit se faire au moyen du dispositif de prélèvement. Un tampon de coton peut recevoir jusqu'à 3 ml de salive. La procédure nécessite environ 1 ml de salive pour une détermination en double. N'employez pas les tampons de coton contenant l'acide citrique.
- Il convient d'éviter l'ingestion d'aliment durant les périodes de prélèvements. En cas de nécessité absolue de manger, il convient de manger immédiatement après un prélèvement, de se rincer immédiatement la bouche avec de l'eau, de respecter un délai de 15 minutes avant le prélèvement suivant.
- Les boissons contenant des colorants de synthèse ainsi que de l'alcool doivent être évités durant toute la période de prélèvements. Le café est strictement interdit et à éviter dans toute étude portant sur le sommeil. L'ingestion de bananes est également proscrite durant la période de prélèvements sur la base de récentes études.
- 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.
- Ne stimulez pas des sécrétions de salive en machant du chewing-gum ou en mangeant du citron.
- 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.

#### Conservation des échantillons :

Les échantillons de salive recueillis au moyen du dispositif peuvent être conservés jusqu'à 7 jours à 2-8°C. Si dans cet intervalle ils ne sont pas analysés, il convient de les congeler. Ils peuvent être conservés durant au moins 6 mois à ≤-20°C. Des cycles répétés de congélation/ décongélation doivent être évités.

Il convient de décongeler les échantillons congelés puis de les centrifuger durant 5 minutes à 1000 x g et à 2-8°C avant de procéder à l'analyse. Le surnageant limpide peut être transféré dans un nouveau tube

### PROCEDURE

1. Identifier 8 tubes coniques en polystyrène en double: de A à E pour les calibrateurs, la NSB (non-specific binding) et les blancs, MB (maximal binding) et T (total activity). Préparer et identifier 2 tubes pour chaque contrôle et chaque échantillon à analyser.
- 2a. Pipeter 500 µl de tampon d'incubation dans les tubes NSB tubes, et 400 µl de tampon d'incubation dans les tubes MB.
- 2b. Pipeter 400 µl de calibrateurs A à E dans les tubes correspondants.
- 2c. Pipeter 400 µl d'échantillons et de contrôles dans les tubes correspondants et préalablement identifiés.
3. Ajouter 100 µl d'antisérum à tous les tubes, à l'exception des tubes NSB et T, puis vortexer.
4. Ajouter 100 µl de traceur <sup>125</sup>I-mélatonin à tous les tubes. Vortexer. Mettre les tubes T de côté jusqu'à l'étape de mesure.
5. Incuber tous les tubes pdt 20 (± 4) heures à 2-8°C.
- 6a. Retourner plusieurs fois le flacon contenant le second anticorps, ajouter un agitateur magnétique et placer le flacon sur le support magnétique.
- 6b. Ajouter 100 µl de second anticorps en suspension à tous les tubes, à l'exception des tubes T, vortexer.
7. Incuber pdt 15 (± 2) min à 2-8°C.
8. Ajouter 1 ml d'eau bidest. froide, à tous les tubes, à l'exception des tubes T.
9. Centrifuger pdt 2 min à 2000 x g et à 2-8°C. Aspirer le surnageant dans chaque tube, à l'exception des tubes T.
10. Mesurer les tubes pdt 2 min dans un compteur gamma.

### RESULTATS & STANDARDISATION

- Enregistrer les cpm de tous les tubes (T, NSB, MB, calibrateurs A, B, C, D, E, échantillons et contrôles) et calculer la moyenne de cpm pour tous les doubles.
- Soustraire la moyenne des tubes NSB des moyennes des doubles obtenues.

$$\text{Net cpm} = \text{cpm}_{\text{moyenne}} - \text{cpm}_{\text{moyenne NSB}}$$

- Calculer la liaison de chaque paire de tubes selon la formule suivante: MB – NSB = 100%.

$$\text{percent bound} = \frac{\text{net cpm}}{\text{net MB cpm}} \times 100$$

- Préparer du papier lin/log et reporter les % de liaison sur l'axe vertical et les concentrations de mélatonine en pg/ml sur l'axe horizontal pour chaque calibrateur, échantillon et contrôle. Tracer la courbe d'étalonnage ou la calculer au moyen d'un algorithme de régression (par exemple 4-paramètre logistic (4-PL), «spline smoothed» ou équivalent).
- Déterminer les concentrations de mélatonine pour chaque patient et chaque contrôle à partir de la courbe d'étalonnage. D'autres méthodes de traitement des données peuvent également être employées.

Cf. Table 10 et Figure 1 pour des exemples de courbes d'étalonnage. Ces éléments ne sont donnés qu'à titre d'exemple. Il convient de générer une courbe d'étalonnage lors de chaque dosage.

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

### CONTROLE DE QUALITE

Une lecture 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.

La reproductibilità de la courbe d'étalonnage ainsi que des contrôles devrait être comprise entre les limites d'acceptabilité propres à chaque laboratoire. Si la précision des mesures ne correspond pas aux limites établies et que les répétitions excluent toute erreur technique, il est recommandé de contrôler les paramètres suivants: i) pipetage, appareils de mesure de température et de temps, ii) calibrage des instruments, iii) date de péremption des réactifs, iv) conditions de stockage et d'incubation, v) pureté de l'eau.

#### LIMITATIONS DE PERFORMANCE

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

#### CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Les caractéristiques de performances de l'essai ont été validées sur des échantillons testés en deux replicats.

**Précision Intra-essai (Within-Run) : 2.6-20.1%.** Elle a été calculée à partir des résultats de 20 doubles de chaque échantillon de salive prélevé à différentes heures du jour au cours d'un seul et même essai. Les résultats se trouvent en Table 12.

**Précision Inter-essai (Run-to-Run) : 6.6-16.7%.** Elle a été calculée à partir des résultats de 20 doubles de chaque échantillon de salive prélevé à différentes heures du jour au cours de 20 essais différents. Les résultats se trouvent en Table 12.

**Limite de détection (LoB) : 0.2 pg/ml (0.9 pmol/l).** 20 réplicats du calibrateur zéro (MB) furent analysés au cours d'un seul et même essai. La limite de détection de mélatonine dans 400µl de tampon d'incubation fut calculée en enlevant deux déviations standard à la moyenne des mesures générées et en reportant le taux de liaison obtenu sur la courbe d'étalonnage.

**Limite de détection (LoQ) : 0.9 pg/ml (4.0 pmol/l).** La sensibilité fonctionnelle est la concentration minimale détectable (functional least detectable dose - FLDD) de l'essai et la concentration minimale de mélatonine mesurable par cette méthode avec un coefficient de variation inférieur à 10%. Elle a été déterminée à partir de 13 échantillons de salive différents et mesurés au cours du même essai au moins 10 fois.

**Linéarité des dilutions/Parallélisme : 93.1%.** Deux échantillons de salive humaine additionnés de 40 pg/ml de mélatonine furent dilués avec du tampon d'incubation puis analysés selon la procédure standard (cf. Table 13 pour les résultats obtenus).

**Test de récupération : 106%.** Des concentrations croissantes de mélatonine furent ajoutées à 3 échantillons de salive et analysés d'après la procédure standard. Les résultats sont présentés en Table 14.

**Spécificité : cf. Table 15** pour les réactions croisées de l'anticorps anti-mélatonine à 50% de liaison.

#### USO

Il radioimmunosaggio (RIA) è stato concepito per la determinazione quantitativa della melatonina nella saliva umana (1-4).

#### PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il kit Direct Saliva Melatonin RIA misura la melatonina in un radioimmunosaggio a doppio anticorpo basato su un anticorpo Kennaway anti-melatonina G280. (5,6). I campioni, i controlli ed i calibratori ricostituiti sono incubati con un anticorpo anti-melatonina e con melatonina marcata con I<sup>125</sup>. La melatonina marcata con I<sup>125</sup> compete con la melatonina presente nei campioni, nei calibratori e nei controlli. Dopo 20 ore di incubazione, il secondo anticorpo in fase solida viene aggiunto alla miscela in modo da far precipitare la frazione legata all'anticorpo. Dopo aspirazione della frazione non legata, viene contata la frazione legata all'anticorpo melatonina marcato con I<sup>125</sup>.

#### REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
<b>Tampone di incubazione</b>	1 flacone 100 ml	B-DSM-IB	Pronto all'uso
<b>Antisiero</b> Anticorpi anti-melatonina	2 flaconi 11 ml	B-DSM-AS	Pronto all'uso
<b>Tracciante</b> Melatonina marcata con I <sup>125</sup>	2 flaconi 11 ml	B-MEL-TR	Pronto all'uso
<b>Calibratore A - E<sup>1)</sup></b> Melatonina conc.	5 flaconi lioph.	B-MEL- CASET	Ricostituire con 5.0 ml di tampone di incubazione
<b>Controlli basso / alto<sup>2)</sup></b> Melatonina conc.	2 flaconi lioph.	B-DSM- CONSET	Ricostituire con 5.0 ml di tampone di incubazione
<b>Secondo anticorpo</b> legato alla fase solida.	2 flaconi 11 ml	B-AB2	Pronto all'uso

Table 7

<sup>1)</sup> Dopo ricostituzione i calibratori dalla A alla E contengono rispettivamente 0.5, 1.5, 5, 15 e 50 pg/ml di melatonina. Ricostituire ciascun calibratore con 5.0 ml di tampone di incubazione. Lasciare per almeno 10 minuti a 2-8°C e agitare delicatamente più volte prima dell'uso.

<sup>2)</sup> Quantitativi lotto specifici di melatonina. Ricostituire ciascun controllo con 5.0 ml di tampone di incubazione. Lasciare per almeno 10 minuti a 2-8°C e agitare delicatamente più volte prima dell'uso.

#### CONSERVAZIONE ED EMIVITA DEI REAGENTI

Reagenti non Aperti	
Conservare a 2-8°C. Non utilizzare il kit oltre la data di scadenza	
Reagenti aperti / ricostituiti	
Tampone di incubazione	Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta.
Antisiero	
Tracciante	
Calibratori	Stabile per almeno 4 mesi a 2-8°C dopo la ricostituzione
Controlli	
Secondo anticorpo	Conservare refrigerato ( <b>non congelare!</b> ) Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta.

Tabella 8

#### AVVERTENZE E PRECAUZIONI

##### AVVERTENZE E PRECAUZIONI DI SICUREZZA

- **Materiale radioattivo:** Questo kit contiene un radionuclide gamma ionizzante con tempo di dimezzamento di 59.4 giorni (Melatonina 125-iodinata; il radionuclide è Iodio-125, <sup>125</sup>I). L'attività del materiale radioattivo in questo kit non supera i 74 kBq (2 µCi) di Iodio125.
- Il ricevimento, acquisizione, possesso, utilizzo e trasferimento sono soggetti alle regolamentazioni locali. In merito alle precauzioni per la manipolazione e l'eliminazione dei

reagenti, del materiale radioattivo e dei campioni, consigliamo vivamente di consultare le regolamentazioni specifiche del vostro paese.

#### PRECAUZIONI TECNICHE

- 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.
- Possono verificarsi risultati errati per le curve standard, i controlli ed i campioni se la sospensione del secondo anticorpo non è stata correttamente mescolata prima della dispensazione. **Non congelare il secondo anticorpo.**
- I componenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza riportata sulle etichette.
- Non miscelare reagenti appartenenti a lotti diversi.
- Ricostituire i reagenti liofilici come indicato. Mescolare (vortex, agitare in modo vorticoso) bene tutti i reagenti, in particolare l'Antisiero, e poi lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente prima dell'uso.
- Se l'iniziale concentrazione di un campione non noto è superiore al calibratore più elevato, il campione deve essere ulteriormente diluito con il Tampone Tris e dosato secondo quanto previsto dal dosaggio.
- Il tempo per la conta deve essere sufficiente ad evitare errori statistici e.g. l'accumulo di 2000 cpm produrrà un errore del 5%, 10000 cpm produrranno un errore dell'1%.
- La procedura è stata testata e validata per i campioni di saliva umana. Se vengono utilizzati altri campioni, si consiglia di validare possibili effetti matrice con campioni di saliva privi di melatonina o di estrarre i campioni di saliva con estrazione a colonna in fase inversa C18.

#### ATTREZZATURE RICHIESTI

- Pipette di precisione con puntali monouso per 100, 400, 1000 e 5000 µl.
- Centrifuga refrigerata.
- Vortex mixer.
- Barra agitatrice ed agitatore magnetico.
- Dispositivo per l'aspirazione.
- Gamma-Counter.

#### MATERIALI RACCOMANDATI MA NON FORNITI

- Dispositivo per il prelievo della saliva, B-SLEEPCHECK-16 o B-SVC-50.
- Provette monouso di polistirene o polipropilene per il RIA (e.g. provette coniche della Sarstedt; no. 57.477).
- Dispositivo per l'estrazione a vuoto delle colonne di estrazione (opzionale).
- Acqua deionizzata distillata due volte.

#### PRELIEVO E CONSERVAZIONE DELLA SALIVA

##### Precauzioni per il prelievo della saliva

- Prelevare la saliva utilizzando il dispositivo per la raccolta della saliva. Un tampone di cotone può assorbire fino a 3 ml di saliva. La procedura richiede circa 1 ml di saliva per determinazioni in duplicato. Non usare tamponi di cotone che contengono l'acido citrico.
- I soggetti non dovrebbero mangiare durante il periodo del prelievo. Se ciò non fosse possibile, gli stessi devono mangiare solo subito dopo il prelievo risciacquando la bocca con acqua per 15 minuti prima del prelievo successivo.
- Evitare, nel periodo del prelievo, bevande che contengano coloranti artificiali e bevande alcoliche. Il caffè non è permesso – è controindicato in ogni caso in studi sul sonno. Alcuni resoconti recenti sulla melatonina presente nei cibi,

consigliano di non mangiare banane durante il periodo del prelievo.

- I soggetti non devono lavarsi i denti, con o senza dentifricio, durante il periodo del prelievo. Individui affetti da gengivite possono contaminare la saliva con il plasma o persino con il sangue intero le cui conseguenze non sono note.
- Non stimolare il flusso della saliva masticando chewing-gum o mangiando limoni.
- Quando il prelievo della saliva avviene di notte, occorre utilizzare una luce fioca o una luce gialla da  $\leq 100$  per evitare la possibile influenza della luce sul profilo della melatonina.

#### Prelievo e conservazione

I campioni di saliva assorbita nel tampone di cotone possono essere conservati nel dispositivo per la raccolta fino a 7 giorni a 2-8°C. Se non dosati entro una settimana dopo la raccolta, i campioni devono essere conservati per almeno 6 mesi a  $\leq 20^\circ\text{C}$ . Evitare cicli ripetuti di congelamento/ scongelamento. Scongelare i campioni congelati di saliva e centrifugare per 5 minuti a 1000 x g e 2-8°C prima del dosaggio. Trasferire il supernatante chiaro nelle nuove provette.

#### PROCEDURA DEL DOSAGGIO

1. Etichettare 8 provette coniche di polistirene in duplicato: dalla A alla E per le provette dei calibratori, per le provette NSB (legame non specifico) per i bianchi, per le provette del legame massimo MB e per le provette dell'attività totale T. Etichettare altre provette in duplicato per i campioni e i controlli.
- 2a. Dispensare 500 µl del tampone di incubazione nelle provette NSB, e 400 µl di tampone di incubazione nelle provette MB.
- 2b. Dispensare 400 µl dei calibratori dalla A alla E nelle provette corrispondenti.
- 2c. Dispensare 400 µl dei campioni dei pazienti e dei controlli in ciascuna delle provette contrassegnate in maniera corrispondente.
3. Aggiungere 100 µl dell'antisiero a tutte le provette eccetto le provette NSB e T, vortexare.
4. Aggiungere 100 µl di tracciante melatonina marcato con  $^{125}\text{I}$  a tutte le provette. Vortexare. Rimuovere le provette T, non saranno necessari ulteriori passaggi fino alla conta al punto 10.
5. Incubare tutte le provette per 20 ( $\pm 4$ ) ore a 2-8°C.
- 6a. Capovolgere la bottiglia che contiene il secondo anticorpo in fase solida diverse volte, aggiungere una barra per l'agitazione e collocare la bottiglia su un agitatore magnetico.
- 6b. Mentre si agita continuamente la sospensione del secondo anticorpo, aggiungere 100 µl della sospensione a tutte le provette (eccetto le provette T), vortexare.
7. Incubare per 15 ( $\pm 2$ ) min a 2-8°C.
8. Aggiungere 1 ml di acqua fredda, bidest. a tutte le provette del dosaggio (eccetto le provette T).
9. Centrifugare per 2 min a 2000 x g a 2-8°C. Aspirare i supernatanti (eccetto le provette T) e conservare i precipitati per la conta.
10. Contare le provette per 2 min in un gamma-counter.

#### RISULTATI & STANDARDIZZAZIONE

- Annotare i cpm per tutte le provette (T, NSB, MB, A, B, C, D, E-calibratori, campioni e controlli) e calcolare i cpm medi per ciascuna coppia di provette.
- Sottrarre i bianchi medi (provette NSB) dalle rispettive medie di ciascuna coppia di provette.

$$\text{Cpm netti} = \text{cpm}_{\text{medi}} - \text{cpm}_{\text{medi NSB}}$$

- Calcolare il legame di ciascuna coppia di provette come percentuale del legame (provette MB), con i cpm corretti con NSB delle provette MB prese al 100%.

$$\text{percent bound} = \frac{\text{net cpm}}{\text{net MBcpm}} \times 100$$

- Preparare un grafico lin/log e tracciare la percentuale di legato sull'asse verticale verso la concentrazione di melatonina (pg/mL) sull'asse orizzontale per ciascuno dei calibratori. Tracciare la curva migliore o calcolare la curva standard utilizzando un algoritmo (per esempio 4-parametri logistic (4-PL), «spline smoothed» o equivalente).
- Determinare le concentrazioni di melatonina per i campioni ed i controlli da questa curva standard. Sono accettabili anche metodi alternativi per i calcoli dei dati.

Vedi Table 10 e Figura 1 per esempi di curva standard. Questa curva standard è a solo scopo dimostrativo. Occorre generare una curva standard per ogni set di campioni da dosare.

**Standardizzazione:** Direct Saliva Melatonin RIA è calibrato con UV/VIS:  $\epsilon_{278} = 6300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  nel etanolo.

### 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.

La riproducibilità dei parametri della curva standard ed i valori dei controlli devono essere entro limiti stabiliti di accettabilità stabiliti dal laboratorio. I limiti di confidenza per i controlli sono lotto-specifici e stampati sul foglio dati del QC aggiunto al kit.

Se la precisione del dosaggio non correla con i limiti stabiliti e la ripetizione esclude gli errori nella tecnica, verificare quanto segue: i) dispensazione, controllo della temperatura e dispositivi di rilevazione del tempo ii) date di scadenza dei reagenti iii) condizioni di conservazione e di incubazione iv) purezza dell'acqua.

### 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 DELLE PRESTAZIONI

Le caratteristiche di prestazione del dosaggio sono state convalidate in duplicato.

**Precisione intradosaggio (all'interno della seduta): 2.6-20.1%.** È stata calcolata la precisione intradosaggio dai risultati di 20 coppie di valori da ciascun campione di saliva in momenti diversi del giorno in un'unica seduta. I valori sono presenti in Table 12.

**Precisione interdosaggio (da seduta a seduta): 6.6-16.7%.** La precisione interdosaggio è stata calcolata dai risultati di 20 coppie di valori per ciascun campione di saliva in diversi momenti del giorno in 20 sedute diverse. I valori sono presenti in Table 12.

**Limite del Bianco (LoB): 0.2 pg/ml (0.9 pmol/l).** Venti replicati del calibratore zero (MB) sono stati dosati in un'unica seduta. La concentrazione minima rilevabile di melatonina in 400  $\mu\text{l}$  di tampone di incubazione è stata calcolata sottraendo le due deviazioni standard dei duplicati medi del calibratore zero dalle conte al legame massimo ed intersecando questo valore con la curva standard ottenuta nella stessa seduta.

**Limite di Quantificazione (LoQ): 0.9 pg/ml.** La più piccola dose funzionale rilevabile (limite di quantificazione) del dosaggio è la concentrazione minima di melatonina nella saliva che può essere misurata con un coefficiente di variazione intradosaggio (CV) inferiore a 10%. Il LoQ è stato determinato da 13 campioni diversi di saliva ciascuno misurato almeno 10 volte in un'unica seduta.

**Linearità di diluizione/parallelismo: 93.1%.** Sono stati diluiti con il tampone di incubazione due campioni di saliva umana con 40 pg/ml di melatonina e successivamente dosati secondo procedura. I valori sono presenti in Table 13.

**Recupero: 106%.** Tre campioni di saliva sono stati diluiti con quantitativi crescenti di melatonina e dosati secondo quanto previsto dal dosaggio. I valori sono presenti in Table 14.

**Specificità:** In Table 15 sono state riscontrate le seguenti crossreattività dell'antisiero melatonina al 50 % del legame.

## ESPAÑOL

### USO PREVISTO

El radioinmunoanálisis (RIA) Direct Saliva Melatonin ha sido diseñado para realizar la determinación cuantitativa y directa de melatonina en saliva humana (1-4).

### PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO

El kit de RIA de Direct Saliva Melatonin mide la melatonina por un radioinmunoanálisis de doble anticuerpo que se basa en el anticuerpo anti-melatonina Kennaway G280 (5,6). Las muestras, los controles y los calibradores reconstituidos se incuban con el anticuerpo anti-melatonina y  $^{125}\text{I}$ -melatonina. La  $^{125}\text{I}$ -melatonina compite con la melatonina presente en las muestras, calibradores y controles. Después de 20 horas de incubación se añade a la mezcla un segundo anticuerpo de fase sólida para que precipite la fracción unida al anticuerpo. Después de aspirar la fracción no unida se cuenta la fracción de  $^{125}\text{I}$ -melatonina unida al anticuerpo.

### REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad	Código	Reconstitución
<b>Tampón de incubación</b>	1 vial 100 ml	B-DSM-IB	Listo para usar
<b>Antisero</b> anticuerpo anti-melatonina	2 viales 11 ml	B-DSM-AS	Listo para usar
<b>Trazador</b> $^{125}\text{I}$ -melatonina	2 viales 11 ml	B-MEL-TR	Listo para usar
<b>Calibrador A – E<sup>1)</sup></b> melatonina conc.	5 viales lioph.	B-MEL-CASET	Reconstituir con 5.0 ml de tampón de incubación
<b>Controles bajo / alto<sup>2)</sup></b> melatonina conc.	2 viales lioph.	B-DSM-CONSET	Reconstituir con 5.0 ml de tampón de incubación
<b>Segundo anticuerpo</b> segundo anticuerpo unido a una fase sólida	2 viales 11 ml	B-AB2	Listo para usar

Tabla 9

<sup>1)</sup> Después de la reconstitución los calibradores A a E contienen 0,5, 1,5, 5, 15 y 50 pg/ml de melatonina, respectivamente. Reconstituya cada calibrador con 5.0 ml de tampón de incubación. Dejar por lo menos 10 minutos a 2-8°C y agitar suavemente varias veces antes de usar.

<sup>2)</sup> Los controles contienen cantidades específicas de lote de melatonina. Reconstituya cada control con 5.0 ml de tampón de incubación. Dejar por lo menos 10 minutos a 2-8°C y agitar suavemente varias veces antes de usar.

## ALMACENAMIENTO Y DURACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivos sin abrir	
Almacénese a 2-8°C. No utilice el kit pasada la fecha de caducidad.	
Reactivos abiertos / reconstituidos	
Tampón de incubación	Estable a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.
Antisuero	
Trazador	
Calibradores	Estable como mínimo 4 meses a 2-8°C después de la reconstitución.
Controles	Después de la extracción almacene los controles sin reconstituir a -20°C
Segundo anticuerpo	Almacene refrigerado ( <b>¡No lo congele!</b> ) Estable a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

Tabla 10

## ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

### PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- Material radioactivo: Este kit contiene un emisor gamma ionizante con una vida media de 59.4 días (melatonina yodada 125; el radionúclido es yodo 125, <sup>125</sup>I). La actividad del material radiactivo de este kit no supera los 74 kBq (2 µCi) de 125-yodo.
- La recepción, adquisición, posesión, el uso y la cesión están sujetos a las normativas locales. Respecto a las precauciones adecuadas para la manipulación y eliminación de los reactivos del kit, material radiactivo, desechos radiactivos y especímenes de los pacientes, recomendamos encarecidamente que consulte primero las normativas locales especiales de su país.

### PRECAUCIONES TÉCNICAS

- 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.
- Se pueden producir resultados irregulares en las curvas estándar, los controles y las muestras si no se ha mezclado adecuadamente la suspensión del segundo anticuerpo antes de pipetear. **No congele el segundo anticuerpo.**
- Los componentes no deben utilizarse después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.
- No mezcle diferentes lotes de reactivos.
- Reconstituya los reactivos liofilizados como se indica. Mezcle bien (con agitador de vórtice) todos los reactivos, en particular el antisuero, y luego deje que los reactivos se atemperen hasta alcanzar temperatura ambiente antes de usarlos.
- Si la lectura de la concentración inicial de una muestra desconocida es mayor que la del calibrador más alto, la muestra extraída debe diluirse con el tampón de incubación y ensayarse de nuevo según el procedimiento del ensayo.
- El tiempo de recuento debe ser suficiente para evitar un error estadístico del recuento: p.ej., la acumulación de 2000 cpm producirá un error del recuento del 5%, 10000 cpm producirán un error de recuento del 1%.
- El procedimiento se probó y validó para muestras de saliva humana. Si se utilizan otros especímenes de saliva se recomienda validar los posibles efectos de la matriz con muestras de saliva libres de melatonina o extraer las muestras de saliva mediante extracción con columna de fase inversa C18.

## EQUIPOS NECESARIOS

- Pipetas de precisión de 100, 400, 1000 y 5000 µl (o preferiblemente una pipeta múltiple ajustable de 100–1000 µl) con tapones desechables
- Centrífuga refrigerada
- Mezclador vortex
- Barra de agitación y agitador magnético
- Dispositivo de aspiración
- Contador gamma.

## MATERIALES RECOMENDADOS NO INCLUIDOS

- Saliva Collection Device, B-SLEEPHECK-16 o B-SVC-50.
- Tubos desechables de poliestireno para el RIA (p. ej. tubos cónicos de Sarstedt; nº 57.477)
- Agua bidestilada desionizada.

## RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE SALIVA

### Precauciones para la recogida de saliva

- Recoja la saliva utilizando el Dispositivo de recogida de saliva. Un tampón de algodón puede absorber hasta 3 ml de saliva. El procedimiento requiere 1 ml de saliva para las determinaciones por duplicado. **No utilice dispositivos de recogida conteniendo ácido cítrico.**
- Idealmente, los sujetos se abstienen de comer durante el período de muestreo. Si esto no es posible, se debe permitir a los sujetos comer únicamente después de una recogida y enjuagar sus bocas con agua 15 minutos antes de la siguiente recogida.
- Se deben evitar las bebidas alcohólicas y las que contengan colorantes artificiales durante el período de muestreo. El café no está permitido y, de todos modos, está contraindicado en estudios del sueño. En vista de algunos informes recientes sobre melatonina en algunos alimentos, se sugiere que no deben ingerirse plátanos durante el período de muestreo.
- Los sujetos deben evitar cepillarse los dientes, con o sin pasta dentífrica, durante los períodos de muestreo. Es probable que los sujetos con gingivitis contaminen la saliva con plasma o incluso con sangre completa, lo que podría tener consecuencias desconocidas.
- No estimule el flujo de saliva sea por chicles o sea comiendo limones.
- Cuando se recoja saliva por la noche debe utilizarse una linterna suave o una luz amarilla de ≤100 lux para evitar una posible influencia de la luz sobre el perfil de melatonina.

### Almacenamiento:

Las muestras de saliva absorbidas en el tampón de cotone pueden guardarse en el dispositivo de recogida de saliva hasta 7 días a 2-8°C. Si no se ensayan a las 7 días de la recogida, las muestras deben congelarse y pueden almacenarse como mínimo 6 meses a ≤-20°C. Deben evitarse ciclos repetidos de congelación y descongelación de las muestras.

Descongele las muestras congeladas y centrifugue las muestras de saliva durante 5 minutos a 1000 x g y 2-8°C antes del ensayo. Traslade el sobrenadante claro a viales nuevos.

## PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Etiquete 8 tubos cónicos de poliestireno por duplicado: A a E para los tubos de los calibradores, NSB (*non-specific binding*, unión inespecífica) para los tubos del blanco, MB para los tubos de máxima unión (*maximum binding*) y T para los tubos de actividad total. Etiquete tubos adicionales por duplicado para las muestras de los pacientes y los controles.

- 2a. Pipetee 500 µl de tampón de incubación en los tubos NSB y 400 µl de tampón de incubación en los tubos MB.
- 2b. Pipetee 400 µl de los calibradores A a E en los tubos correspondientes.
- 2c. Pipetee 400 µl de las muestras extraídas de los pacientes y de los controles en todos los tubos marcados de la forma correspondiente.
3. Añada 100 µl del antisuero a todos los tubos excepto a los tubos NSB y T, agite con el vortex.
4. Añada 100 µl del trazador <sup>125</sup>I-melatonina a todos los tubos. Agite con el vortex. Retire los tubos T, puesto que ya no serán necesarios en el resto del proceso hasta el recuento del paso 10.
5. Incube todos los tubos durante 20 (± 4) horas a 2-8°C.
- 6a. Invierta varias veces la botella que contiene el segundo anticuerpo en fase sólida, añada una barra de agitación y coloque la botella en un agitador magnético.
- 6b. Mientras se agita de manera continuada la suspensión del segundo anticuerpo, añada 100 µl de la suspensión a todos los tubos de ensayo (excepto a los tubos T), agite con el vortex.
7. Incube durante 15 (± 2) min a 2-8°C.
8. Añada 1 ml de agua fría bidest. a todos los tubos de ensayo (excepto a los tubos T).
9. Centrifugue durante 2 min a 2000 x g y 2-8°C. Aspire los sobrenadantes (excepto en los tubos T) y conserve los precipitados para el recuento.
10. Cuente los tubos durante 2 min en un contador gamma.

### RESULTADOS Y ESTANDARIZACIÓN

- Registre las cpm para todos los tubos (T, NSB, MB, calibradores A, B, C, D y E, muestras y controles) y calcule el promedio de cpm para cada par de tubos.
- Reste el promedio del blanco del ensayo (tubos NSB) del promedio respectivo de cada par de tubos:

$$\text{cpm netas} = \text{cpm}_{\text{Promedio}} - \text{cpm}_{\text{Promedio de NSB}}$$

- Calcule la unión de cada par de tubos como un porcentaje de la máxima unión (tubos MB), considerando las cpm de los tubos MB corregidas por el NSB como el 100%.

$$\text{porcentaje unido} = \frac{\text{cpm netas}}{\text{cpm netas del MB}} \times 100$$

- Prepare un papel gráfico semilogarítmico y represente el porcentaje unido en el eje vertical frente a la concentración de melatonina (pg/ml) en el eje horizontal para cada uno de los calibradores. Dibuje la mejor curva de ajuste o calcule la curva estándar utilizando un algoritmo de cuatro parámetros logístico (4-PL), «spline smoothed» o equivalente.
- Determine las concentraciones de melatonina para las muestras del paciente y los controles a partir de esta curva estándar. Son aceptables igualmente métodos alternativos de reducción de datos.

Véase Table 10 y la Figura 1 como ejemplos de una curva estándar. La curva estándar se ofrece únicamente con propósitos de demostración. Se debe generar una curva estándar para cada conjunto de muestras que se ensaye.

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

### 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.

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 del kit.

Si la precisión del ensayo no se correlaciona con los límites establecidos y la repetición excluye errores de la técnica, compruebe los siguientes aspectos: i) instrumentos de pipeteado, control de temperatura y tiempo ii) fechas de caducidad de los reactivos iii) condiciones de almacenamiento e incubación iv) pureza del agua.

### LIMITACIONES DE RENDIMIENTO

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

### CARACTERÍSTICAS DE EFICIENCIA

Las características de rendimiento del análisis han sido validadas por duplicado.

**Precisión intra-ensayo (dentro la prueba): 2.6-20.1%.** La precisión intra-ensayo se calculó a partir de los resultados de 20 pares de valores obtenidos de cada muestra de la saliva de diverso día en una única prueba. Los resultados se presentan en Table 12.

**Precisión inter-ensayo (prueba a prueba): 6.6-16.7%.** La precisión inter-ensayo se calculó a partir de los resultados de 20 pares de valores obtenidos de cada muestra de la saliva de diverso día en 20 pruebas diferentes. Los resultados se presentan en Table 12.

**Límite del blanco (LoB): 0.2 pg/ml (0.9 pmol/l).** Se ensayaron veinte duplicados del calibrador cero (MB) en una única prueba. La concentración mínima detectable de melatonina en 400 µl de tampón de incubación sin extraer se calculó en 0.4 pg/ml (0.9 pmol/l) al restar 2 desviaciones estándar de los duplicados promediados del calibrador cero de los recuentos en la máxima unión, y calculando la intersección de este valor con la curva estándar obtenida en la misma prueba.

**Límite de cuantificación: 0.9 pg/ml (4.0 pmol/l).** La dosis mínima detectable funcional (DMDF) se calculó en 0.9 pg/ml (valor de corte de intra-ensayo [n=10] CV = 10%).

**Linealidad/paralelismo de dilución: 93.1%.** Se enriquecieron dos muestras de suero con 40 pg/ml de melatonina, se diluyeron y no se diluyeron con tampón de incubación y a continuación se ensayaron siguiendo el procedimiento del ensayo. Los resultados se presentan en Table 13.

**Recuperación: 106%.** Se enriquecieron tres muestras de suero con cantidades crecientes de melatonina, se extrajeron y se analizaron siguiendo el procedimiento del ensayo. Los resultados se presentan en Table 14.

**Especificidad:** En Table 15 las reacciones cruzadas del antisuero de la melatonina se encontraron en la unión al 50%.

Table 10 Example of Results

	cpm	B/T [%]	B/B <sub>0</sub> [%]	Conc. [pg/ml]	cpm <sub>CV</sub> [%]
Total	13650	100.0			
Total	13496	100.0			
Total Avg	13573	100.0			0.80
NSB	352	2.6			
NSB	357	2.6			
NSB Avg	355	2.6			0.96
MB	5401	37.2	100.0		
MB	5271	36.2	100.0		
MB Avg	5336	36.7	100.0		1.73
A Std	4934	33.7	91.9		
A Std	4879	33.3	90.8		
A Std Avg	4906	33.5	91.4	0.5	0.79
B Std	4263	28.8	78.5		
B Std	4388	29.7	81.0		
B Std Avg	4326	29.3	79.7	1.5	2.04
C Std	3264	21.4	58.4		
C Std	3145	20.6	56.0		
C Std Avg	3205	21.0	57.2	5.0	2.63
D Std	1781	10.5	28.6		
D Std	1764	10.4	28.3		
D Std Avg	1773	10.5	28.5	15.0	0.68
E Std	919	4.1	11.3		
E Std	940	4.3	11.7		
E Std Avg	930	4.2	11.5	50.0	1.60

ED<sub>20</sub>: 23.7 pg/ml      ED<sub>50</sub>: 6.6 pg/ml      ED<sub>80</sub>: 1.5 pg/ml

Figure 1 Example of Standard Curve

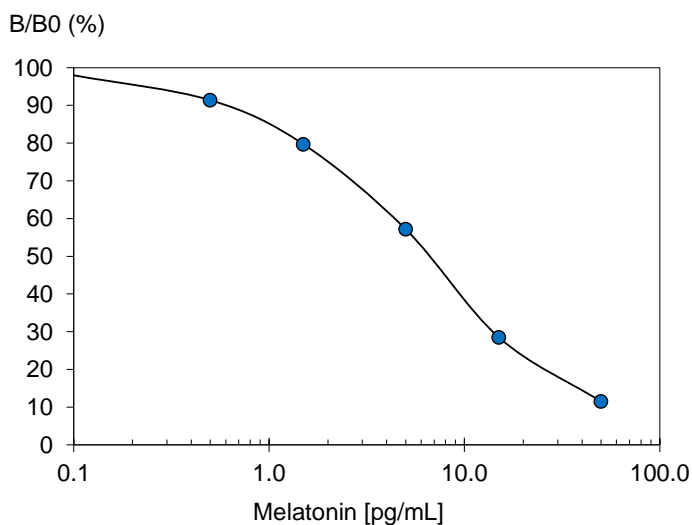


Table 11 Intra-Assay Precision

Sample	Mean [pg/ml]	SD [pg/ml]	CV (%)
daytime	0.60	0.121	20.1
evening	3.56	0.145	4.1
nighttime	24.42	1.169	4.8
early morning	7.24	0.188	2.6
Mean			7.9

Table 12 Inter-Assay Precision

Sample	Mean [pg/ml]	SD [pg/ml]	CV (%)
daytime	0.82	0.137	16.7
evening	8.99	0.593	6.6
nighttime	25.58	2.148	8.4
early morning	3.39	0.256	7.5
Mean			9.8

Table 13 Dilution Linearity/Parallelism

Sample	Dilution	Observed [pg/ml]	Expected [pg/ml]	O/E [%]
spiked Saliva 1	spiked: 40 pg/ml	44.4	---	---
	1 in 2 (50.0%)	25.1	22.2	112.9
	1 in 4 (25.0%)	11.3	11.1	101.6
	1 in 8 (12.5%)	4.92	5.55	88.6
	1 in 16 (6.3%)	2.60	2.78	93.5
	1 in 32 (3.1%)	1.51	1.39	108.6
	1 in 64 (1.6%)	0.60	0.69	87.0
spiked Saliva 2	spiked: 40 pg/ml	47.2	---	---
	1 in 2 (50.0%)	22.6	23.6	95.6
	1 in 4 (25.0%)	10.8	11.8	91.2
	1 in 8 (12.5%)	4.97	5.9	84.2
	1 in 16 (6.3%)	2.65	2.95	89.9
	1 in 32 (3.1%)	1.23	1.48	83.5
	1 in 64 (1.6%)	0.60	0.74	81.1
Mean				93.1

Table 14 Spiking Recovery

Basic Value	Added [pg/ml]	Expected [pg/ml]	Observed [pg/ml]	Recovery [%]
0.69	1	1.69	1.68	99
	2	2.69	2.50	93
	5	5.69	5.82	102
	10	10.69	11.94	112
	20	20.69	25.03	121
	40	40.69	42.95	106
1.35	1	2.35	2.51	107
	2	3.35	3.45	103
	5	6.35	7.39	116
	10	11.35	12.12	107
	20	21.35	25.11	118
	40	41.35	45.11	109
0.74	2.5	3.24	3.31	102
	5	2.74	7.02	122
	10	10.74	10.79	100
	20	20.74	21.20	102
	40	40.74	36.88	91
	80	80.74	82.60	102
Mean				106

Table 15

**Specificity**

Compound	Crossreactivity [%]
Melatonin	100
6-Sulfatoxymelatonin	0.002
Serotonin	<0.001
5-Hydroxy-Indole Acetic Acid	<0.001
N-Acetylserotonin	0.027
5-Methoxytryptamine	0.003
5-Methoxytryptophane	0.001
5-Methoxytryptophol	0.001
Methoxypsoralen	<0.001

**Table description:** cf. "Results" and "Performance Characteristics" (page 3).

**Tabellenbeschreibung:** siehe "Resultate", und "Leistungsmerkmale" (Seite 5).

**Explications relatives aux tableaux:** voir "Resultats", et "Caractéristiques de Performance" (page 8).

**Descrizione tavola:** cf. "Risultati" e "Caratteristiche di Prestazione" (pagina 10).

**Explicaciones relativas a las Tablas:** ver "Resultados", y "Características de Eficiencia" (página 12).

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

1. Koorengel, 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). Danilenko, KV, *et al.* Is sleep per se a Zeitgeber in humans. *J Biol Rhythms* **18**, 170-8 (2003).
4. 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).
5. Voultsios, A, *et al.* Salivary melatonin as a circadian phase marker: validation and comparison to plasma melatonin. *J Biol Rhythms* **12**, 457-466 (1997).






**Change Log**

Date	Version	Reason for change
2020-12-22	01	1 <sup>st</sup> NovoLytiX version
2022-03-22	02	Calibrators (B-MEL-CASET) and Controls (B-DSM-CONSET) are delivered as 50x concentrates and need to be reconstituted with 4.9 mL of B-DSM-IB each; number of vials of Incubation Buffer (B-DSM-IB) reduced from two to one (reason: all interviewed customers did not use the second vial and disposed of this for each kit; section MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED is separated in sections EQUIPMENT REQUIRED and MATERIALS RECOMMENDED BUT NOT PROVIDED)
2022-12-05	03	Calibrators (B-MEL-CASET) are delivered as lyophilized 50x concentrates and need to be reconstituted with 5.0 mL of B-DSM-IB each
2023-04-24	04	Controls Low and High (B-DSM-CONSET) are delivered as lyophilized 50x concentrates and need to be reconstituted with 5.0 mL of B-DSM-IB each
2023-06-08	05	Correction in the footnote of Tables 1/3/5/7/9: Controls Low and High (B-DSM-CONSET) need to be reconstituted in 5.0 mL (instead of 4.9 mL)

<b>RADIOIMMUNOASSAY PROCEDURE</b>							
<b>Polystyrene tubes in duplicate</b>	<b>Incubation Buffer (µl)</b>	<b>Standard, Control, Sample (µl)</b>	<b>Antiserum (µl)</b>	<b>Tracer (µl)</b>		<b>Second Antibody (µl)</b>	
Total	--	--	--	100		--	Vortex and incubate for 15±2 minutes at 2-8°C
NSB	500	--	--	100		100	
MB	400	--	100	100		100	
Std A 0.5 pg/ml	--	400	100	100		100	add 1 ml of deionized water (except T tubes) and centrifuge for 2 minutes at 2-8°C and 2000 x g
Std B 1.5 pg/ml	--	400	100	100		100	
Std C 5.0 pg/ml	--	400	100	100		100	
Std D 15.0 pg/ml	--	400	100	100		100	
Std E 50.0 pg/ml	--	400	100	100		100	
Control LOW	--	400	100	100		100	
Control HIGH	--	400	100	100		100	Vortex and incubate at 2-8°C for 20±4 hours
Samples	--	400	100	100		100	aspirate supernatant (except T tubes) and count for 2 minutes

Table 16

## SYMBOLS/SYMBOLE/ SYMBOLES/SIMBOLI/ SIMBOLOS

Symbol	Explanation	Symbol	Explanation
	Use by Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad	<b>BUF INC</b>	Incubation Buffer Inkubations-Puffer Tampon d'incubation Tampone d'incubazione Tampón de incubación
<b>REF</b>	Catalogue number Bestellnummer Référence du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo	<b>Ab</b>	Antiserum Antiserum Antisérum Antisiero Antisuero
<b>LOT</b>	Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote	<b>TR</b>	Tracer Tracer Traceur Elemento tracciante Trazador
<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>	<b>CALA - CAL E</b>	Calibrator A - E Kalibrator A - E Calibrateur A - E Calibratore A - E Calibrador A - E
	Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso	<b>CONTROL L</b>	Control Low Kontrolle tief Contrôle bas Controllo basso Control bajo
	Contains sufficient for <n> tests Ausreichend für „n“ Ansätze Contenu suffisant pour „n“ tests Contenuto sufficiente per „n“ saggi Contenido suficiente para <n> ensayos	<b>CONTROL H</b>	Control High Kontrolle hoch Contrôle élevé Controllo alto Control alto
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura	<b>Ab2</b>	2 <sup>nd</sup> Antibody 2. Antikörper 2 <sup>ème</sup> Anticorps Secondo anticorpo Segundo anticuerpo
	Radioactive Material Radioaktives Material Matériel radioactif Materiale radioattivo Material radiactivo		



Printing Date  
2023-06-08