



MELATONIN

RIA

RK-MEL2 200 tests

Revision date: Version 03
2022-12-05

INTENDED USE

The Melatonin RadiolImmunoAssay (RIA) is intended for the quantitative determination of melatonin (1-3) in serum, plasma, urine and other biological specimen **upon C18 solid phase extraction**.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

Melatonin RIA kit measures melatonin by a double-antibody radioimmunoassay based on the Kennaway G280 anti-melatonin antibody (4)*. Reversed-phase column extracted samples and Controls and reconstituted Calibrators are incubated with the anti-melatonin antibody and ¹²⁵I-melatonin. ¹²⁵I-melatonin competes with melatonin present in samples, Calibrators 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 ¹²⁵I-melatonin is counted.

* This publication uses a chloroform (CHCl₃) extraction of samples, prior to a ¹²⁵I-RIA and involves some different ancillary reagents besides the liquid phase second antibodies used in the report. Hence the performance specifications reported therein do not substitute those reported in this instruction.

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity	Code	Reconstitution
Extraction Columns¹⁾ C18 reversed phase extraction columns 1 ml	20 pcs.	B-MEC	
Incubation Buffer	2 vials 100 ml	B-MEL-IB	Ready to use
Antiserum anti-melatonin antibody	2 vials 11 ml	B-MEL-AS	Ready to use
Tracer ¹²⁵ I-melatonin	2 vials 11 ml	B-MEL-TR	Ready to use
Calibrators²⁾ 50x concentrated melatonin calibrators	1 set of 5 vials lyoph.	B-MEL-CASET	Reconstitute with 5.0 mL of Incubation Buffer
Controls Low / High³⁾ melatonin in a protein buffer matrix	1 set of 2 vials 5.5 ml	B-MEL-CONSET	Ready for extraction
Second Antibody solid phase bound second antibody	2 vials 11 ml	B-AB2	Ready to use

Table 1

- ¹⁾ Each extraction column provided with this kit can be utilized up to five times if used according to the extraction procedures described in this instruction for use.
- ²⁾ 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 it gently several times before use.
- ³⁾ Lot specific amount of melatonin, see QC Data Sheet added to the kit. Extract the Controls according to the protocol as described on pp. 3ff.

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

Unopened reagents	
Store at 2-8°C. Do not use past kit expiration date. Columns should be stored at 18-28°C	
Opened / reconstituted reagents	
Extraction Columns	Used columns should be stored at 18-28°C and protected from dust and light.
Incubation Buffer	Stable at 2-8°C until expiration date printed on the label.
Antiserum	
Tracer	
Calibrators	Stable for at least 4 months at 2-8°C after reconstitution.
Controls	After extraction store Controls unreconstituted at -20°C
Second Antibody	Store refrigerated (Do not freeze!) 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; radionuclide is 125-iodine, ¹²⁵I). 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.
- The Kit controls (B-MEL-CONSET) contain components of human origin. Although tested and found negative for HBV surface antigen, HCV and HIV1/2 antibodies, the reagents should be handled as if capable of transmitting infections and should be handled in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions.

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.

EQUIPMENT REQUIRED

- 100, 400, 1000 and 5000 µl precision pipettes (or preferably a 100–1000 µl adjustable multipipette) with disposable tip
- Extraction vacuum manifold for applying the extraction columns (optional)
- Vacuum concentrator or supply for particle free nitrogen
- Refrigerated centrifuge
- Vortex mixer
- Stir bar and magnetic stirrer
- Aspiration device
- Gamma-counter.

MATERIALS RECOMMENDED BUT NOT PROVIDED

- Disposable polystyrene tubes for the RIA (e.g. conical tubes from Sarstedt; no. 57.477)
- Disposable borosilicate glass tubes for the preparation of (serum) extracts (e.g. disposable CW glass test tubes from Baxter; no. 451296)
- Methanol (*HPLC grade*)
- Hexane (*p.a.*)
- Deionized double distilled water (ultrapure; not containing any organic residues).

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

When drawing blood at night, a dim flash light or a yellow light (≤ 100 lux) should be used in order to avoid a possible light influence on the melatonin profile.

Serum: The procedure calls for about 2.5 ml of blood or for 1 ml of serum per extraction (if the sample is not diluted after extraction). Collect blood into plain tubes, avoid hemolysis, leave to clot for 45 min at room temperature (18-28°C) protected from light. Centrifuge at 1800 x g for 15 min at room temperature and collect the serum.

Lipemic, hemolytic and icteric samples should not be used in this assay. Lipemic samples can be avoided by asking patients to fast for at least 12 hours prior to drawing the.

Plasma: The procedure calls for about 2.5 ml of blood or for 1 ml of plasma per extraction (if the sample is not diluted after extraction). Collect blood into EDTA or Heparin tubes, centrifuge for 15 min at 2-8°C and 1800 x g, collect the plasma. Do not use grossly hemolysed samples.

Specimen Storage: If not extracted immediately, serum or plasma samples should be frozen and can be stored for at least 6 months at -20°C. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided.

EXTRACTION OF SAMPLES AND CONTROLS

- Each extraction column provided with this kit can be used up to five times according to the extraction procedures described below. They should be stored at 18-28°C and protected from light and dust.
- Always use HPLC GRADE METHANOL AND HEXANE as well as DEIONIZED WATER OF ULTRAPURE QUALITY (no organic residues such as oils or detergents) for the extraction procedure.
- In order to avoid clogging of the columns, FILTER OR CENTRIFUGE SAMPLES CONTAINING PARTICLES such as fibrin clots prior to the extraction (e.g. heparin plasma that was frozen).
- The extraction method results in RECOVERIES of >90% with either ¹²⁵I-melatonin or ³H-melatonin using human serum, plasma and urine samples.
- If samples have to be measured containing >50 pg/ml of melatonin, the sample volume may be reduced down to 0.125 ml without a notable change in extraction recoveries. This also indicates that SAMPLE VOLUMES AS SMALL AS 0.125 ML (≈ 0.3 ml of blood) may be used in this method (cf. page 4 for extractive dilution linearity).
- The extraction PROCEDURE WAS TESTED AND VALIDATED FOR HUMAN SERUM, PLASMA, SALIVA AND URINE samples. If you intend to measure any other specimen, it is recommended to validate the extraction recovery using ¹²⁵I-melatonin spiked specimens.

Extraction Procedure using Centrifugation

COLUMN PREPARATION & CONDITIONING

- Mark 1 extraction column for each sample to be extracted and place them into polypropylene or glass tubes.
- Add 1 ml of methanol to columns, centrifuge for 1 min at 200 x g. Repeat this step once.
- Add 1 ml of H₂O to columns, centrifuge for 1 min at 200 x g. Repeat this step once.
- Proceed with sample application without delay.

SAMPLE APPLICATION

- Add 1 ml of sample to the correspondingly marked column, centrifuge for 1 min at 200 x g.

WASHING

- Add 1 ml 10% methanol in H₂O (v/v) to the columns, centrifuge for 1 min at 500 x g. Repeat this step once.
- Add 1 ml of hexane to columns, centrifuge for 1 min at 500 x g.

ELUTION OF EXTRACT

- Place the columns into clean correspondingly marked borosilicate tubes.
- Add 1 ml of methanol to columns, centrifuge for 1 min at 200 x g.

- Use column for extracting the next sample (up to 5 times) or store column at 18-28°C Protect from light and dust.

EVAPORATION & RECONSTITUTION OF EXTRACT

- Evaporate the methanol to dryness using a vacuum concentrator with a cold trap. Alternatively, use a 37°C heating block or water bath and evaporate the methanol to dryness with a stream of particle free nitrogen.
- Reconstitute the samples with 1 ml of Incubation Buffer, vortex.
- Equilibrate the extracts for 30 min at 18-28°C, vortex. Store reconstituted extracts capped and frozen if not assayed immediately.

Extraction Procedure using Vacuum Manifold

Note: If not indicated otherwise, always pass the solvent through the column using vacuum and a flow rate of ≤ 5 ml/min.

COLUMN PREPARATION & CONDITIONING

- Mark 1 extraction column for each sample to be extracted and place them into polypropylene or glass tubes.
- Add 2 x 1 ml of methanol to columns, let the solvent pass through using vacuum.
- Add 2 x 1 ml of H₂O to columns, let the solvent pass through using vacuum.
- Proceed with sample application before the column gets dry.

SAMPLE APPLICATION

- Add 1 ml of sample to the correspondingly marked column, let the solvent pass through slowly (≤ 2 ml/min).
- Proceed with washing before the column gets dry.

WASHING

- Add 2 x 1 ml of 10% methanol in H₂O (v/v) to columns, let the solvent pass through using vacuum.
- Add 1 ml of hexane to the columns, let the solvent pass through using vacuum.
- Apply vacuum for 1 more min. in order to evaporate remaining hexane in the column.

ELUTION OF EXTRACT

- Place the columns into clean correspondingly marked borosilicate tubes.
- Add 1 ml of methanol to columns, let the solvent pass through slowly using vacuum and a flow rate of ≤ 2 ml/min.
- Use column for extracting the next sample (columns can be used up to 5 times) or store column at 18-28°C and protected from light and dust.

EVAPORATION & RECONSTITUTION OF THE EXTRACT

- Evaporate methanol to dryness using a vacuum concentrator with a cold trap. Alternatively, use a 37°C heating block or water bath and evaporate the methanol to dryness with a stream of particle free nitrogen.
- Reconstitute the samples with 1 ml of Incubation Buffer, vortex.
- Equilibrate the extracts for 30 min at 18-28°C, vortex. Store reconstituted extracts capped and frozen if not assayed immediately.

ASSAY PROCEDURE

1. Label 8 conical polystyrene tubes in duplicate: A to E for the Calibrator tubes, NSB (non-specific binding) for the blank tubes, MB for the maximum binding tubes and T for the total activity tubes. Label additional tubes in duplicate for patient samples and Controls.
 - 2a. Pipet 500 µl of Incubation Buffer into the NSB tubes, and 400 µl of Incubation Buffer into the MB tubes.
 - 2b. Pipet 400 µl of the Calibrators A to E into the corresponding tubes.
 - 2c. Pipet 400 µl of the extracted patient samples and Controls into each of the correspondingly marked tubes.

3. Add 100 µl of the Antiserum to all tubes except the NSB and T tubes, vortex.
4. Add 100 µl of ¹²⁵I-melatonin tracer to all tubes. Vortex. Remove T tubes, they will need no further processing until counting at step 10.
5. Incubate all tubes for 20 (± 4) hours at 2-8°C.
- 6a. Invert the bottle containing the solid phase Second Antibody several times, add a stir bar and place the bottle on a magnetic stirrer.
- 6b. While stirring the Second Antibody suspension continuously, add 100 µl of the suspension to all assay tubes (except T tubes), vortex.
7. Incubate for 15 (± 2) min at 2-8°C.
8. Add 1 ml of cold, bidest. water to all assay tubes (except the T tubes).
9. Centrifuge for 2 min at 2000 x g and 2-8°C. Aspirate the supernatants (except T tubes) and retain the precipitates for counting.
10. Count the tubes for 2 min in a gamma-counter.

RESULTS & STANDARDIZATION

- Record the cpm for all tubes (T, NSB, MB, A, B, C, D, E-Calibrators samples and Controls) and calculate the mean cpm for each pair of tubes.
- Subtract the mean assay blank (NSB tubes) from the respective mean of each pair of tubes:

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

1. 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%.

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

2. 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.
 3. Determine melatonin concentrations for the patient samples and Controls from this standard curve. Alternative data reduction methods are equally acceptable.
- See Table 11 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: 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 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 (Run-to-Run) of RIA: 7.9%. The intra-assay precision was calculated from results of 20 pairs of values from each sample in a single run. The results are presented in Table 12.

Inter-Assay Precision (Run-to-Run) of RIA: 11.7%. The inter-assay precision was calculated from results of 20 pairs of values in 20 different runs. The results are presented in Table 13.

Intra-Assay Precision (Run-to-Run) of Column Extraction and RIA combined: 8.2%. A daytime human serum was extracted 12 times in parallel using 12 separate extraction columns. Subsequently, all extracts were analyzed in a single run according to the assay procedure. The results are presented in Table 14.

Detection Limit (LoB): 0.3 pg/ml. Twenty Zero Calibrator (MB) replicates were assayed in a single run. The minimum detectable concentration of melatonin in 400 µl of unextracted Incubation Buffer was calculated to be 0.3 pg/ml (1.3 pmol/l) by subtracting 2 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. The functional least detectable dose (Limit of Quantitation) was calculated to be 0.9 pg/ml (cut-off of intra-assay CV = 10%).

Dilution/Linearity-Parallelism: 103.7%. Two human serum samples containing an elevated concentration of melatonin were extracted both, diluted and undiluted with Incubation Buffer and subsequently assayed according to the assay procedure. The results are presented in Table 15.

Extractive Dilution Linearity: 108.8 %. Varying amounts of a human serum sample containing an elevated concentration of melatonin were applied onto extraction columns, extracted according to the protocol and subsequently assayed according to the assay procedure. The results are presented in Table 16.

Extraction Recovery: 99.9 %. Two serum samples were spiked with increasing amounts of melatonin, extracted and analyzed according to the assay procedure. The results are presented in Table 17.

Specificity: In Table 18 the crossreactivities of the melatonin antiserum were found at 50 % binding.

ANWENDUNGSZWECK

Der Melatonin RadiolimmunoAssay (RIA) wird für die quantitative Bestimmung von Melatonin (1-3) aus Serum, Plasma, Urin und anderen biologischen Proben nach einer **C18 Festphasen Säulenextraktion** verwendet

PRINZIP DER METHODE

Der Melatonin RIA Kit basiert auf dem Prinzip eines Doppelantikörper Radioimmunoassays, bei dem Kennaway G280 anti-Melatonin Antikörper (4)* eingesetzt wird. Proben und Kontrollen, die über eine „reversed-phase“ Säule extrahiert wurden, sowie rekonstituierte Kalibratoren werden jeweils mit dem anti-Melatonin Antikörper (Ak) und ¹²⁵I-Melatonin inkubiert. ¹²⁵I-Melatonin konkurriert mit dem in den jeweiligen Proben, Kalibratoren und Kontrollen vorhandenen Melatonin. Nach einer Inkubation von 20 Stunden wird ein zweiter Antikörper, gebunden an eine feste Phase, zugegeben um die Antikörpergebundene Fraktion zu präzipitieren. Nach dem Absaugen des Überstandes (freie Fraktion) wird die antikörpergebundene Fraktion von ¹²⁵I-Melatonin in einem Gammazähler gemessen.

* In dieser Publikation wird, vor der RIA Durchführung, eine Chloroformextraktion (CHCl₃) verwendet, sowie verschiedene Hilfsreagenzien für den zweiten Antikörper in einer Flüssigphase. Dadurch unterscheiden sich die Leistungsmerkmale in der Publikation von denen in dieser Bedienungsanleitung.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenzien	Menge	Art.-Nr.	Rekonstitution
Extraktionssäulen¹⁾ C18 reversed phase Extraktionssäulen 1 ml	20 Stk.	B-MEC	
Inkubations-Puffer	2 Flaschen 100 ml	B-MEL-IB	gebrauchsfertig
Antiserum anti-Melatonin Ak	2 Flaschen 11 ml	B-MEL-AS	gebrauchsfertig
Tracer ¹²⁵ I-Melatonin	2 Flaschen 11 ml	B-MEL-TR	gebrauchsfertig
Kalibratoren²⁾ Melatonin Kalibratoren 50x konzentriert	5 Flaschen lyoph.	B-MEL-CASET	Mit 5.0 ml Inkubations-Puffer lösen
Kontrollen tief/hoch³⁾ Melatonin in einer Protein- Puffer Matrix	2 Flaschen 5.5 ml	B-MEL- CONSET	Extraktionsbereit
2. Antikörper Ak gebunden an eine Festphase	2 Flaschen 11 ml	B-AB2	gebrauchsfertig

Table 3

¹⁾ Jede mit diesem Kit mitgelieferte Extraktionssäule kann bis zu fünfmal verwendet werden, wenn diese entsprechend der in dieser Broschüre beschriebenen Extraktionsanleitung verwendet wird.

²⁾ Die Kalibratoren enthalten nach Rekonstitution 0.5, 1.5, 5, 15 und 50 pg/ml Melatonin. Kalibratoren werden mit jeweils 5.0 ml Inkubations-Puffer gelöst. Vor Gebrauch mindestens 10 Minuten bei 2-8°C stehen lassen und danach noch einmal gut mischen.

³⁾ Die Kontrollen enthalten eine lot-abhängige Melatoninkonzentration. Bitte, beachten Sie das dazugehörige QC Datenblatt welches dem Kit beigelegt ist. Die Kontrollen müssen entsprechend der Extraktionsanleitung auf Seite 6ff. vorbereitet werden.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Ungeöffnete Reagenzien	
Bei 2-8°C lagern. Nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Die Säulen sollten bei 18-28°C gelagert werden	
Opened / reconstituted reagents	
Extraktionssäulen	Gebrauchte Säulen sollten licht- und staubgeschützt bei 18-28°C gelagert werden.
Inkubations-Puffer	Bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum haltbar.
Antiserum	
Tracer	
Kalibratoren	Bei 2-8°C für mind. vier Monate haltbar.
Kontrollen	Bei -20°C bis zum Verfallsdatum lagern.

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN**SICHERHEITSMASSNAHMEN**

- Radioaktives Material: Der Kit enthält einen Gamma-Strahler mit einer Halbwertszeit von 59.4 Tagen (125-iodiertes Melatonin; das Radionuklid ist 125-Jod, ¹²⁵I). 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.
- Die Kontrollen (B-MEL-CONSET) dieses Kits enthalten Komponenten menschlichen Ursprungs. Obwohl sie negativ in Tests für HBV Oberflächenantigen, HCV und HIV1/2 Antikörper waren, sollten gemäss Good Laboratory Practice als potentiell infektiös behandelt werden und die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden.

TECHNISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

- Lesen Sie die Arbeitsanleitung sorgfältig vor der Testdurchführung. Die Testqualität kann negative 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 unbekannten Probe höher als der höchste Kalibrator ist, muss die Probe mit Inkubationspuffer weiter verdünnt und noch einmal getestet werden.

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE

- 100, 1000 und 5000 µl Präzisionspipetten (oder vorzugsweise 100-1000 µl verstellbare Multipipetten) mit Einwegspitzen
- Vakuumpumpe zum Gebrauch für die Extraktionssäulen (optional)
- Vacuum-Konzentrator oder Vorrichtung für partikelfreien Stickstoff
- Gekühlte Zentrifuge
- Vortex Schüttler
- Magnetrührer mit Rührstab
- Aspirationsvorrichtung
- Gammastrahlungszähler.

EMPFOHLENE HILFSMITTEL (NICHT MITGELIEFERT)

- Einweg Polystyrolröhrchen für den RIA (z.B. konische Röhrchen von Sarstedt; Nr. 57.477)
- Einweg Borsilikat Glasröhrchen für die Extraktpräparation (Serum) (z.B. Einweg CW Glasteströhrchen von Baxter; Nr. 451296)
- Methanol (HPLC grade)
- Hexane (p.a.)
- Deionisiertes doppelt destilliertes Wasser (Ultrapure; ohne organische Überreste).

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

Bei Blutentnahme während der Nacht sollte ein schwaches Gelblicht (≤ 100 Lux) verwendet werden, um einen möglichen Einfluß des Lichts auf das Melatoninprofil zu verhindern.

Serum: Für die Testdurchführung braucht es pro Extraktion ungefähr 2.5 ml Vollblut oder 1 ml Serum (falls die Proben nach der Extraktion nicht verdünnt werden). Blut in einem Entnahmeröhrchen sammeln (Hämolyse vermeiden) während 45 Min bei 18-28°C (RT) vor Licht geschützt gerinnen lassen, bei 1800 x g für 15 Min bei RT zentrifugieren und das Serum entnehmen.

Lipämische, hämolytische oder ikterische Proben dürfen nicht verwendet werden. Lipämische Proben können verhindert werden indem der Patient 12 Stunden vor der Blutabnahme keine Nahrung zu sich nimmt.

Plasma: Für die Testdurchführung braucht es pro Extraktion ungefähr 2.5 ml Vollblut oder 1 ml Plasma (falls die Proben nach der Extraktion nicht verdünnt werden). Blut in EDTA- oder Heparinröhrchen sammeln, bei 2-8°C und 1800 x g für 15 Min zentrifugieren und das Plasma entnehmen. Stark hämolytisches Blut darf nicht verwendet werden.

Lagerung: Falls die Extraktion nicht direkt durchgeführt wird, müssen die Serum- oder Plasmaproben eingefroren werden. Diese können für mindestens 6 Monate bei -20°C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren/Auftauen sollte vermieden werden.

PROBEN- UND KONTROLLENEXTRAKTION

- Jede mitgelieferte Extraktionssäule kann unter Beachtung der Extraktionsanleitung (s.u.) bis zu fünfmal verwendet werden. Gebrauchte Säulen sollten licht- und staubgeschützt bei 18-28°C gelagert werden.
- Es sollte immer Methanol „HPLC grade“ sowie Hexan „p.a.“, sowie deionisiertes Wasser von ultrareiner Qualität (keine organische Reststoffe wie Öl oder Detergenzien) für die Extraktionsdurchführung verwendet werden.
- Um zu verhindern, daß die Säulen verstopfen, sollten Proben welche Schwebepartikel wie Fibrin enthalten gefiltert oder zentrifugiert werden.
- Die Extraktionsmethode erzielt eine Wiederfindung von >90% sowohl mit ^{125}I -Melatonin, wie auch mit ^3H -Melatonin in humanen Serum- Plasma- oder Urinproben.
- Bei Proben welche >50 pg/ml Melatonin enthalten, sollte das Probenvolumen auf 0.125 ml verringert werden ohne eine meßbare Änderung der Extraktionswiederfindung. Dies zeigt auch, daß Probenvolumen von 0.125 (≈ 0.3 ml Blut) für diese Methode verwendet werden können (Vergleiche Seite 8, Extraktionsverdünnungslinearität).
- Die Extraktionsanleitung wurde GETESTET UND VALIDIERT FÜR HUMANES SERUM, UND PLASMA SOWIE URIN UND SPEICHEL. Falls weiteres Probenmaterial eingesetzt werden soll, wird empfohlen, die Extraktions-Wiederfindung mit Hilfe von Proben, die mit ^{125}I -Melatonin versetzt wurden, zu validieren.

Extraktionsdurchführung mittels Zentrifugation

SÄULENVORBEREITUNG UND KONDITIONIERUNG

- Für jede zu extrahierende Probe eine Säule beschriften und in ein Polypropylenröhrchen oder Glasröhrchen stellen.
- 1 ml Methanol auf die Säulen geben und für 1 Min bei 200 x g zentrifugieren. Den Schritt einmal wiederholen.
- 1 ml H_2O auf die Säulen geben und für 1 Min bei 200 x g zentrifugieren. Den Schritt einmal wiederholen.
- Ohne Verzögerung weiterfahren.

PROBEN ZUGABE

- 1 ml Serum- oder Plasmaprobe auf die entsprechend markierten Säulen geben und für 1 Min bei 200 x g zentrifugieren.

WASCHEN

- 1 ml 10% Methanol in H_2O (v/v) auf die Säulen geben und für 1 Min bei 500 x g zentrifugieren. Den Schritt einmal wiederholen.
- 1 ml Hexan auf die Säulen geben und für 1 Min bei 500 x g zentrifugieren.

EXTRAKTELUTION

- Die Säulen in entsprechend bezeichnete Borsilikatröhrchen stellen.
- 1 ml Methanol auf die Säule geben und für 1 Min bei 200 x g zentrifugieren.
- Die Säule für die Extraktion einer weiteren Probe verwenden (Säulen können bis zu bis zu fünfmal verwendet werden) oder die Säule bei 18-28°C lagern. Vor Licht und Staub schützen.

EVAPORATION & REKONSTITUTION DES EXTRAKTES

- Durch Verwendung eines gekühlten Vakuumkonzentrators das Methanol verdampfen lassen. Als alternative kann ein 37°C Heizblock oder Wasserbad verwendet werden zusammen mit einem partikelfreien Stickstoffstrahl.
- Die Proben mit 1 ml Inkubations-Puffer rekonstituieren, vortexen.
- Die Probenextrakte für 30 Min bei 18-28°C equilibrieren lassen, vortexen. Gelöste Proben verschlossen und gefroren lagern, falls diese nicht direkt gemessen werden.

Extraktionsdurchführung mittels einer Vakuumpumpe

Hinweis: Wenn nicht anders vermerkt, soll die Lösung mit einer Fließgeschwindigkeit von ≤ 5 ml/min durchfließen.

SÄULENVORBEREITUNG & KONDITIONIERUNG

- Für jede zu extrahierende Probe eine Säule beschriften und in ein Polypropylenröhrchen oder Glasröhrchen stellen.
- 2 x 1 ml Methanol auf die Säule geben und die Lösung mittels Vakuum durch die Säule lassen.
- 2 x 1 ml H_2O auf die Säule geben und die Lösung mittels Vakuum durch die Säule lassen.
- Proben zugeben bevor die Säulen trocken laufen.

PROBENZUGABE

- 1 ml Serum- oder Plasmaprobe auf die entsprechend bezeichnete Säule geben und die Lösung langsam durchfließen lassen (≤ 2 ml/min).

- Waschen bevor die Säulen trocken laufen.

WASCHEN

- 2 x 1 ml 10% Methanol in H_2O (v/v) auf die Säulen geben und die Lösung mittels Vakuum durch die Säulen lassen.
- 1 ml Hexan auf die Säulen geben und die Lösung mittels Vakuum durch die Säulen lassen.
- Vakuum für eine weitere Minute aufrechterhalten um verbleibendes Hexan zu evaporieren.

EXTRAKTELUTION

- Die Säulen in entsprechend bezeichnete Borsilikatröhrchen stellen.

- 1 ml Methanol auf die Säulen geben und die Lösung langsam durchfließen lassen (≤ 2 ml/min).
- Die Säule für die Extraktion einer weiteren Probe verwenden (bis zu fünfmal) oder die Säule bei 18-28°C lagern. Vor Licht und Staub schützen.

EVAPORATION & REKONSTITUTION DES EXTRAKTES

- Durch Verwendung eines gekühlten Vakuumkonzentrators das Methanol verdampfen lassen. Als alternative kann ein 37°C Heizblock oder Wasserbad verwendet werden zusammen mit einem partikelfreien Stickstoffstrahl.
- Die Proben mit 1 ml Inkubations-Puffer rekonstituieren, vortexen.
- Die Probenextrakte für 30 Min bei 18-28°C equilibrieren lassen, vortexen. Gelöste Proben verschlossen und gefroren lagern, falls diese nicht direkt gemessen werden.

ARBEITSANLEITUNG

1. 8 konische Polystyrol-Röhrchen im Doppelansatz beschriften: 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 beschriften für die Patientenproben sowie die Kontrollen.
- 2a. 500 µl Inkubations-Puffer in das NSB Röhrchen und 400 µl Inkubations-Puffer in das MB Röhrchen pipettieren.
- 2b. 400 µl Kalibrator A bis E in die entsprechenden Röhrchen pipettieren.
- 2c. 400 µl extrahierte Patientenproben und Kontrollen in die entsprechenden Röhrchen pipettieren.
3. 100 µl Antiserum zu allen Röhrchen ausser dem NSB und T Röhrchen geben. Vortexen.
4. 100 µl 125I-Melatonin Tracer zu allen Röhrchen geben. Vortexen. T Röhrchen beiseite legen, da dieses vor dem Meßschritt nicht weiter behandelt werden muß.
5. Alle Röhrchen für 20 (± 4) Stunden bei 2-8°C inkubieren.
- 6a. Die Flasche mit dem Festphasen 2. Antikörper mehrmals invertieren, einen Rührstab zugeben und auf einen Magnetrührer stellen.
- 6b. Während des Rührens, 100 µl der 2. Antikörperlösung zu allen Teströhrchen (außer T Röhrchen) zugeben. Vortexen.
7. Für 15 (± 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 aspirieren (außer T Röhrchen) und das Präzipitat für die Messung zurückbehalten.
10. Die Röhrchen für 2 Min in einem Gammastrahlenzähler messen.

RESULTATE UND 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.

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

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

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

2. 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.

3. Die Melatoninkonzentrationen der Patientenproben und der Kontrollen aus der erstellten Standardkurve herauslesen. Alternative Datenverdichtungsmethoden können ebenfalls verwendet werden.

Siehe Table 11 und Figure 1 für ein Zahlenbeispiel und eine Standardkurve. Diese Standardkurve ist nur zu Anschauungszwecken dargestellt. Eine Standardkurve muß für jedes zu testende Probenet erstellt werden.

Standardisierung: 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 (Run-to-Run) des RIA: 7.9%. Die Intra-Assay Präzision wurde aus den Resultaten von 20 Wertepaaren berechnet, welche im gleichen Ansatz getestet wurden. Die Resultate sind in Table 12 dargestellt.

Inter-Assay Präzision (Run-to-Run) des RIA: 11.7%. Die Inter-Assay Präzision wurde aus den Resultaten von 20 Wertepaaren berechnet, welche in 20 aufeinanderfolgenden Ansätzen getestet wurden. Die Resultate sind in Table 13 dargestellt.

Intra-Assay Präzision (Run-to-Run) der Säulenextraktion und des RIA kombiniert: 8.2%. Ein während des Tages entnommenes Humanserum wurde auf 12 Säulen nebeneinander Extrahiert und danach entsprechend der Arbeitsanleitung in einem Ansatz getestet. Die Resultate sind in Table 14 dargestellt.

Nachweisgrenze (LoB): 0.3 pg/ml. Zwanzig Null Kalibratorenpaare (MB) wurden im gleichen Ansatz gemessen. Die kleinste nachweisbare Melatoninmenge in 400 ml nichtextrahiertem Inkubationspuffer wurde durch die Subtraktion von zwei Standardabweichungen (2 SD) vom Mittelwert der ermittelten MB-Werte, als 0.3 pg/ml (1.3 pmol/l) berechnet.

Nachweisgrenze (LoQ): 0.9 pg/ml. Die funktionell tiefste nachweisbare Menge (Limit of Quantitation) wurde als 0.9 pg/ml berechnet (Grenzwert des Intra-Assays; CV = 10%).

Verdünnungs-Linearität: 103.7%. Zwei Humanserumproben mit erhöhter Melatoninkonzentration wurden sowohl unverdünnt wie auch mit Inkubationspuffer verdünnt extrahiert und danach entsprechend der Arbeitsanleitung in einem Ansatz getestet. Die Resultate sind in Table 15 dargestellt.

Extraktionsverdünnungslinearität: 108.8 %. Unterschiedliche Mengen einer Humanserumprobe mit einer erhöhten Melatoninkonzentration wurden auf die Extraktionssäulen gegeben und danach entsprechend der Arbeitsanleitung extrahiert und getestet. Die Resultate sind in Table 16 dargestellt.

Extraktionswiederfindung: 107.9 %. Zwei Serumproben wurden mit aufsteigender Melatoninmenge versetzt und danach entsprechend der Arbeitsanleitung extrahiert und getestet. Die Resultate sind in Table 17 dargestellt.

Spezifität: In Tabelle 18 sind die Kreuzreaktivitäten des Melatoninantisera bei einer Bindung von 50% dargestellt.

DOMAINE D'UTILISATION

La trousse Mélatonine est un RadiolmmunoAssay (RIA) conçu pour la détermination quantitative de mélatonine (1-3) dans les échantillons de sérum, de plasma, d'urine ainsi que d'autres prélèvements biologiques, après une **extraction en phase solide sur C18**.

PRINCIPE DU DOSAGE

La trousse Mélatonine RIA permet la mesure de mélatonine au moyen d'un RIA à double anticorps sur la base de l'anticorps Kennaway G280 anti-mélatonine (4)*. Les échantillons (après extraction), les contrôles et les calibrateurs reconstitués sont incubés avec l'anticorps anti-mélatonine et de la mélatonine marquée à l'¹²⁵I. La ¹²⁵I-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 ¹²⁵I-mélatonine liée à l'anticorps est mesurée.

* cette publication rapporte l'utilisation de chloroforme (CHCl₃) pour l'extraction des échantillons, avant de procéder au ¹²⁵I-RIA. Différents autres réactifs sont utilisés en plus d'un second anticorps en phase liquide. En conséquence, les caractéristiques de performances des deux méthodes ne peuvent se substituer l'une à l'autre.

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Reconstitution
Colonnes d'extraction¹⁾ C18 reverse phase extraction columns 1 ml	20 pcs.	B-MEC	
Tampon d'incubation	2 flacons 100 ml	B-MEL-IB	Prêts à l'emploi
Antisérum anti-mélatonine	2 flacons 11 ml	B-MEL-AS	Prêts à l'emploi
Traceur ¹²⁵ I- mélatonine	2 flacons 11 ml	B-MEL-TR	Prêts à l'emploi
Calibrateurs²⁾ mélatonine 50x conc.	5 flacons lyoph.	B-MEL- CASET	A reconstituer avec 5.0 ml de tampon d'incubation
Contrôles faible/ élevé³⁾ mélatonine dans une matrice tampon protéique	2 flacons 5.5 ml	B-MEL- CONSET	Prêts pour l'extraction
2ème anticorps phase solide	2 flacons 11 ml	B-AB2	Prêts à l'emploi

Table 5

¹⁾ Chaque colonne d'extraction fournie peut être utilisée 5 fois en suivant les instructions du protocole d'extraction.

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

³⁾ Concentration de mélatonine spécifique à chaque lot (cf. données de QC). Extraire les contrôles selon le protocole (voir pages 10ff).

STOCKAGE ET PEREMPTION DES REACTIVES

Réactifs fermés / non entamés	
Stocker à 2-8°C. Ne pas dépasser la date de péremption Les colonnes doivent être conservées à 18-28°C	
Réactifs ouverts / reconstitués	
Colonnes d'extraction	Les colonnes utilisées devraient être conservées à 18-28°C, à l'abri de la lumière et de la poussière
Tampon d'incubation	Stables à 2-8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette
Antisérum	
Traceur radioactif	
Calibrateurs	Stable à 2-8°C durant 4 mois après reconstitution.
Contrôles	Après extraction, conserver le contrôle sans le reconstituer à -20°C

Second anticorps	A conserver réfrigéré (Ne pas congeler!) Stable à 2-8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette
------------------	---

Table 6

AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

PRECAUTIONS 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'¹²⁵Iode; le radionucléide est 125-Iode, ¹²⁵I). L'activité de la matière radioactive dans cette trousse ne dépasse pas 74 kBq (2 µCi) d'¹²⁵Iode.
- 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).
- Matériel d'origine humaine : Les contrôles de cette trousse (B-MEL-CONSET) contiennent des composants d'origine humaine. Bien que les tests de détection de l'antigène de surface du VHB et des anticorps des virus VHC et VIH1/2 se soient révélés négatifs, il convient de considérer les réactifs comme capables de transmettre des maladies infectieuses, et de les manipuler conformément aux bonnes pratiques de laboratoire, en prenant les précautions appropriées.

PRECAUTIONS 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 (calibrateurs, contrôles échantillons). **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.

ÉQUIPMENT REQUIS

- Pipettes de précision réglables avec pointes jetables pour 100, 1000 et 5000 µl.
- Pompe à extraction sous vide pour les colonnes (option)
- Concentrateur sous vide – ou dispositif pour azote exempt de particules
- Centrifugeuse réfrigérée
- Vortex
- Agitateur magnétique et support
- Système d'aspiration
- Compteur – Gamma.

MATERIEL RECOMMANDÉ MAIS NON FOURNI

- Tubes jetables pour RIA en polystyrène (*par ex.* tubes coniques Sarstedt; n° 57.477)
- Tubes jetables en verre borosilicate pour l'extraction des échantillons sériques (*Par ex.* tubes à essai CW glass Baxter; n° 451296)
- Méthanol (**HPLC grade**)
- Hexane (**p.a.**)
- Eau doublement distillée déionisée (ultrapure ne contenant pas de résidus organiques).

PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

En cas de prélèvement nocturne, une lumière faible, jaune (≤ 100 lux) devrait être allumée afin d'éviter d'influencer la sécrétion de mélatonine.

Sérum : Il faut environ 2.5 ml de sang ou 1 ml de sérum par extraction (si l'échantillon n'est pas dilué après extraction). Prélever le sang dans des tubes vides prévus à cet effet en évitant l'hémolyse. Laisser sédimenter durant 45 minutes à température ambiante (18-28°C) et à l'abri de la lumière. Centrifuger à 1800 x g pdt 15 minutes à température ambiante puis recueillir le sérum. Ne pas utiliser d'échantillons hémolysés, lipémiques ou ictériques pour ce dosage. Les échantillons lipémiques peuvent être évités en demandant au patient de jeûner durant les douze heures qui précèdent le prélèvement.

Plasma : Il faut environ 2.5 ml de sang ou 1 ml de plasma par extraction (si l'échantillon n'est pas dilué après extraction). Recueillir le sang dans des tubes contenant de l'EDTA ou de l'héparine, centrifuger pendant 15 min à 18-28° et recueillir le plasma. Ne pas utiliser d'échantillons présentant une hémolyse importante.

Conservation des échantillons : Si l'on ne procède pas immédiatement à l'extraction, les échantillons de sérum et de plasma doivent être congelés et peuvent être conservés ainsi durant 6 mois. Les cycles répétés de congélation/décongélation devraient être évités.

EXTRACTION DES ECHANTILLONS ET DES CONTROLES

- Chaque colonne d'extraction fournie dans cette trousse peut être utilisée jusqu'à 5 fois, en respectant la procédure d'extraction qui suit. Les colonnes utilisées doivent être conservées à l'abri de la lumière et de la poussière.
- Veiller à utiliser du méthanol et de l'hexane de qualité HPLC AINSI QUE DE L'EAU BIDESE. (ne contenant pas de résidus organiques tels que les graisses ou les détergents) pour la procédure d'extraction.
- Afin d'éviter de boucher les colonnes, il convient de **FILTRE** les échantillons présentant des particules en solution (*par ex.* fibrine dans les échantillons de plasma hépariné congelé) avant l'extraction.
- La méthode d'extraction permet d'obtenir un rendement > 90% que ce soit avec la ^{125}I -mélatonine ou ^3H -mélatonine en utilisant des échantillons de sérum, plasma ou de urine humain.
- Si les taux de mélatonine sont >50 pg/ml, le volume d'échantillon sera réduit à 0.125 ml sans changement notable au niveau du rendement de l'extraction.
- Ceci indique également qu'il est possible d'effectuer le dosage avec SEULEMENT 0.125 ml d'échantillon (≈ 0.3 ml de sang) (*cf.* page 12 Linéarité extractive de dilution).
- La procédure d'extraction a été TESTEE ET VALIDEE AVEC DES ECHANTILLONS DE SERUM, PLASMA, URINE ET DE LA SALIVA HUMAINES. L'utilisation d'échantillons d'un autre type devra être préalablement validée en déterminant le rendement d'extraction par addition ^{125}I -melatonin aux échantillons.

Procédure d'Extraction par Centrifugation

PREPARATION DES COLONNES & CONDITIONNEMENT

- Identifier 1 colonne d'extraction pour chaque échantillon à traiter et la placer dans un tube en polypropylène ou en verre.
- Ajouter 1 ml de méthanol à chaque colonne, centrifuger pdt 1 min à 200 x g. Répéter cette étape 1 fois.
- Ajouter 1 ml de H_2O à la chaque colonne, centrifuger pdt 1 min à 200 x g. Répéter cette étape 1 fois.
- Ajouter les échantillons sans délai.

ADDITION DES ECHANTILLONS

- Ajouter 1 ml d'échantillon à la colonne identifiée préalablement, centrifuger pdt 1 min à 200 x g.

LAVAGE

- Ajouter 1 ml de méthanol dilué à 10% dans H_2O (v/v) aux colonnes, centrifuger pdt 1 min à 500 x g. Répéter cette étape 1 fois.
- Ajouter 1 ml d'hexane aux colonnes, centrifuger pdt 1 min à 500 x g.

ELUTION DE L'EXTRAIT

- Placer les colonnes dans les tubes borosilicate propres, préalablement identifiés.
- Ajouter 1 ml de méthanol aux colonnes, centrifuger pdt 1min à 200 x g.
- Chaque colonne peut être utilisée jusqu'à 4 fois. Il est possible de les réutiliser immédiatement pour une nouvelle extraction. Il convient de les stocker à 18-28°C en veillant à les protéger de la lumière et de la poussière.

EVAPORATION & RECONSTITUTION DE L'EXTRAIT

- Evaporer le méthanol jusqu'à assèchement complet en utilisant une pompe à vide. Il est également possible d'utiliser des blocks chauffants ou un bain-marie pour évaporer le méthanol sous un flux d'azote exempt de particules.
- Reconstituer les échantillons avec 1 ml de tampon d'incubation, vortexer.
- Equilibrer les extraits pdt 30 min à 18-28°C, vortexer. Conserver les échantillons fermés et congelés s'ils ne sont pas immédiatement analysés.

Procédure d'Extraction sous vide

Remarque: Si vous ne disposez pas d'autres indications, il convient de faire passer le solvant au travers de la colonne à la vitesse de $\leq 5\text{ml/min}$.

PREPARATION DES COLONNES & CONSERVATION

- Identifier 1 colonne d'extraction par échantillon et la placer dans un tube en polypropylène ou en verre.
- Ajouter 2 x 1 ml de méthanol aux colonnes, laisser passer le solvant sous vide.
- Ajouter 2 x 1 ml de H_2O aux colonnes, laisser passer sous vide.
- Procéder à l'addition des échantillons avant que les colonnes ne sèchent.

ADDITION DES ECHANTILLONS

- Ajouter 1 ml d'échantillon à la colonne préalablement identifiée et laisser passer le solvant doucement ($\leq 2\text{ ml/min}$).
- Procéder au lavage avant que les colonnes ne sèchent.

LAVAGE

- Ajouter 2 x 1 ml de méthanol dilué à 10% dans l' H_2O (v/v) aux colonnes, laisser passer le solvant sous vide.
- Ajouter 1 ml d'hexane aux colonnes, laisser passer le solvant sous vide.
- Evaporer sous vide durant une minute supplémentaire.

ELUTION DE L'EXTRAIT

- Placer les colonnes dans les tubes borosilicate propres correspondants.
- Ajouter 1 ml de méthanol aux colonnes, laisser passer le solvant sous vide à une vitesse $\leq 2\text{ ml/min}$.

- Chaque colonne peut être utilisée jusqu'à 5 fois. Il est possible de les réutiliser immédiatement pour une nouvelle extraction. Il convient de les stocker à 18-28°C en veillant à les protéger de la lumière et de la poussière.

EVAPORATION & RECONSTITUTION DE L'EXTRAIT

- Evaporer le méthanol jusqu'à assèchement complet en utilisant une pompe à vide. Il est également possible d'utiliser des blocks chauffants ou un bain-marie pour évaporer le méthanol sous un flux d'azote exempt de particules.
- Reconstituer les échantillons avec 1 ml de tampon d'incubation, vortexer.
- Equilibrer les extraits pdt 30 min à 18-28°C. Conserver les échantillons fermés et congelés s'ils ne sont pas immédiatement analysés.

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 activité). 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, 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 des extraits 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 ¹²⁵I-melatonin 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 ET STANDARDISATION

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

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

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

$$\text{percent bound} = \frac{\text{net cpm}}{\text{net MB cpm}} \times 100$$
2. 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 logistique (4-PL), «spline smoothed» ou équivalent).
3. 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 11 et Figure 1 pour des exemples de courbes d'étalonnage. Ces éléments ne sont donnés qu'à titre d'exemple. Il convient d'effectuer une courbe d'étalonnage lors de chaque dosage.

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

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. La reproductibilité des paramètres de la courbe d'étalonnage et des valeurs des contrôles devrait être comprise dans le domaine des valeurs attendues établies par chaque laboratoire. 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 contrôle contenue dans chaque trousse.

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) calibration des instruments, iii) date de péremption des réactifs, iv) 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 replicata.

Précision Intra-essai (Run-to-Run) du RIA : 7.9%. La précision intra-essai a été définie sur la base de la mesure de 20 paires de chaque échantillons lors d'un seul et même essai. Cf. Table 12 pour les résultats obtenus.

Précision Inter-essai (Run-to-Run) du RIA : 11.7%. La précision inter-essai a été définie sur la base de la mesure de 20 paires d'échantillons lors de 20 essais différents. cf. Table 13 pour les résultats obtenus.

Précision Intra-essai (Run-to-Run) de l'extraction et du RIA combinés : 8.2%. Elle a été établie sur la base de l'extraction en parallèle et au moyen de 12 colonnes différentes d'un échantillon sérique diurne humain. Dans une seconde étape, les extraits obtenus furent analysés au cours d'un seul et même essai, selon la procédure standard. Cf Table 14 pour les résultats.

Limite de détection (LoB) : 0.3 pg/ml. 20 tubes de calibrateurs zéro (MB) ont été dosés au cours d'un seul et même essai. La dose minimale de mélatonine détectable dans 400 µl de tampon d'incubation a été calculée à 0.3 pg/ml (1.3 pmol/l) en enlevant 2 déviations standard à la moyenne des 200 MB reportée sur la courbe d'étalonnage.

Limite de détection (LoQ) : 0.9 pg/ml. Elle a été définie à 0.9 pg/ml (Cut-off intra-essai CV = 10%).

Dilution Linearité / Parallélisme : 103.7%. Deux échantillons sériques humains dilués et non-dilués avec le tampon d'incubation présentant une concentration élevée de mélatonine ont été utilisés pour l'extraction puis analysés selon la procédure standard. Cf. Table 15 pour les résultats obtenus.

Dilution-Linéarité extractive : 108.8 %. Analyse de différentes concentrations de sérum humain contenant des taux élevés de mélatonine après extraction et dosage selon le protocole standard (cf. Table 16 pour les résultats obtenus).

Rendement de l'extraction : 99.9 %. Des concentrations croissantes de mélatonine furent ajoutées à 2 échantillons sériques puis analysés (extraction + RIA standards ; cf. Table 17 pour les résultats obtenus).

Spécificité: cf. Table 18 pour les réactions croisées de l'anticorps anti-mélatonine à 50% de liaison.

Il Radioimmunosaggio (RIA) Melatonina è stato concepito per la determinazione quantitativa della melatonina (1-3) nel siero, plasma, urina ed altri campioni biologici **con estrazione C18 in fase solida**.

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il kit melatonina RIA misura la melatonina in un radioimmunosaggio a doppio anticorpo basato su un anticorpo Kennaway anti-melatonina G280. (4)*.

I campioni ed i controlli estratti con colonna in fase inversa ed i controlli ricostituiti sono incubati con un anticorpo anti-melatonina e con melatonina marcata con I^{125} . La melatonina marcata con I^{125} 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^{125} .

* Questa pubblicazione utilizza un'estrazione dei campioni con cloroformio ($CHCl_3$), prima del doppio anticorpo marcato con I^{125} -RIA e coinvolge altri reagenti minori oltre al secondo anticorpo in fase liquida utilizzato nel report. Quindi, le specifiche relative alle prestazioni di seguito riportate non sostituiscono quelle riportate in questa metodica.

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
Colonne per estrazione¹⁾ C18 colonne per estrazione in fase inversa 1 ml	20 pz.	B-MEC	
Tampone di incubazione	2 flaconi 100 ml	B-MEL-IB	Pronto all'uso
Antisiero Anticorpi anti-melatonina	2 flaconi 11 ml	B-MEL-AS	Pronto all'uso
Tracciante Melatonina marcata con I^{125}	2 flaconi 11 ml	B-MEL-TR	Pronto all'uso
Calibratore²⁾ Melatonina 50x conc.	5 flaconi a liophil.	B-MEL- CASET	Ricostituire con 5.0 ml di tampone di incubazione
Controlli basso / alto³⁾ Melatonina in una matrice/tampone proteica	2 flaconi 5.5 ml	B-MEL- CONSET	Pronti per l'estrazione
Secondo anticorpo Secondo anticorpo legato alla fase solida.	2 flaconi 11 ml	B-AB2	Pronto all'uso

Table 7

¹⁾ Ciascuna colonna di estrazione fornita in questo kit può essere usata fino a cinque volte se utilizzata secondo le procedure di estrazione descritte in questa metodica.

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

³⁾ Quantitativi specifici di melatonina, vedi foglio dei dati di QC aggiunto al kit. Estrarre i controlli secondo il protocollo descritto a pagina 13ff.

CONSERVAZIONE ED EMIVITA DEI REAGENTI

Reagenti non Aperti	
Conservare a 2-8°C. Non utilizzare il kit oltre la data di scadenza. Le colonne devono essere conservate a 18-28°C.	
Reagenti aperti / ricostituiti	
Colonne per estrazione	Le colonne utilizzate devono essere conservate a 18-28°C e protette dalla polvere e dalla luce.
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	Dopo estrazione conservare i controlli non ricostituiti a -20°C.

Secondo anticorpo	Conservare refrigerato (Non congelare!) Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta.
-------------------	---

Tabella 8

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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, I^{125}). L'attività del materiale radioattivo in questo kit non supera i 74 kBq (2 μ Ci) 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.
- **Reagenti Contenenti Materiale di Origine Umana:** I controlli (B-MEL-CONSET) contengono componenti di origine umana. Benché testati e risultati negativi all'antigene di superficie HBV e agli anticorpi HCV e HIV1/2, i reagenti devono essere maneggiati come potenzialmente infettivi e secondo le buone pratiche di laboratorio utilizzando le dovute precauzioni.

TECHNICAL PRECAUTIONSPRECAUZIONI 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 o 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%.

• ATTREZZATURE RICHIESTI

- Pipette di precisione con puntali monouso per 100, 1000 e 5000 μ l (o preferibilmente una multipipetta regolabile da 100–1000 μ l).
- Dispositivo per l'estrazione a vuoto delle colonne di estrazione (opzionale).
- Concentratore a vuoto per nitrogeno libero in particelle.
- Centrifuga refrigerata.
- Vortex mixer.
- Barra agitatrice ed agitatore magnetico.
- Dispositivo per l'aspirazione.
- Gamma-Counter.

MATERIALI RACCOMANDATI MA NON FORNITI

- Provette monouso di polistirene o polipropilene per il RIA (e.g. provette coniche della Sarstedt; no. 57.477).

- Provette di vetro borosilicato monouso per la preparazione degli estratti di (siero) (e.g. provette monouso CW di vetro della Baxter; no. 451296).
- Metanolo (grado HPLC).
- Esano (p.a.).
- Acqua deionizzata distillata due volte (ultrapura; che non contiene residui organici).

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Se il prelievo del sangue avviene di notte, utilizzare una luce fioca o una luce gialla (≤ 100 lux) per evitare la possibile influenza della luce sul profilo della melatonina.

Siero: La procedura richiede circa 2.5 ml di sangue o 1 ml di siero per l'estrazione (se il campione non è diluito dopo estrazione). Prelevare il sangue in provette semplici, evitando l'emolisi, lasciar coagulare per 45 minuti a temperatura ambiente (18-28°C) protetto dalla luce. Centrifugare a 1800 x g per 15 minuti a temperatura ambiente (18-28°C) e prelevare il sangue. Non utilizzare campioni lipemici, emolizzati ed itterici. I campioni lipemici possono essere evitati chiedendo al paziente di digiunare per almeno 12 ore prima del prelievo del campione.

Plasma: La procedura richiede circa 2.5 ml di sangue o 1 ml di plasma per l'estrazione (se il campione non è diluito dopo estrazione). Prelevare il sangue in provette EDTA o eparinizzate, centrifugare per 15 min a 18-28°C ed a 1800 x g, prelevare il plasma. Non utilizzare campioni grossolanamente emolizzati.

Conservazione dei Campioni: Se non immediatamente estratti, i campioni di siero o di plasma devono essere congelati e possono essere conservati per almeno 6 mesi a -20°C. Evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento.

ESTRAZIONE DEI CAMPIONI E DEI CONTROLLI

- Ciascuna colonna di estrazione fornita in questo kit può essere utilizzata fino a cinque volte secondo le procedure di estrazione di seguito descritte. Le colonne utilizzate devono essere conservare a 18-28°C e protette dalla luce e dalla polvere.
- Utilizzare sempre METANOLO ED ESANO a GRADO HPLC ed ACQUA DEIONIZZATA ULTRAPURA (priva di residui organici quali oli o detergenti) per la procedura di estrazione.
- Per evitare ostruzioni delle colonne, FILTRARE O CENTRIFUGARE I CAMPIONI CONTENENTI PARTICELLE quali coaguli di fibrina prima dell'estrazione (e.g. plasma eparinizzato che sia stato congelato).
- Il metodo estrattivo produce RECUPERI di >90% sia con la melatonina marcata con I¹²⁵ che con la melatonina marcata con H³ utilizzando campioni di siero, plasma, e urina umani.
- Se i campioni da dosare contengono >50 pg/ml di melatonina, il volume del campione può essere ridotto a 0.125 ml senza cambiamenti di rilievo nei recuperi estrattivi. Ciò indica che con questo metodo possono essere utilizzati anche VOLUMI DI CAMPIONE DELL'ORDINE DI 0.125 ML (≈ 0.3 ml di sangue) (cf. pagina 4 per la linearità della diluizione estrattiva).
- Questa procedura di estrazione è stata TESTATA E VALIDATA PER CAMPIONI DI SIERO, PLASMA, URINA E SALIVA UMANI. Se vengono utilizzati altri campioni, si consiglia di validare il recupero dell'estrazione utilizzando campioni cui è stata aggiunta melatonina marcata con I¹²⁵.

Procedura di estrazione che utilizza la centrifugazione

PREPARAZIONE DELLA COLONNA & CONDIZIONAMENTO

- Contrassegnare 1 colonna di estrazione per ciascun campione da estrarre e collocarla in una provetta di polistirene o vetro.

- Aggiungere 1 ml di metanolo alle colonne, centrifugare per 1 min. a 200 x g. Ripetere questo passaggio una volta.
- Aggiungere 1 ml di H₂O alle colonne, centrifugare per 1 min. a 200 x g. Ripetere questo passaggio una volta. Procedere senza indugio all'aggiunta del campione.

AGGIUNTA DEL CAMPIONE

- Aggiungere 1 ml di campione alla colonna contrassegnata in maniera corrispondente, centrifugare per 1 min. a 200 x g.

LAVAGGIO

- Aggiungere 1 ml 10% di metanolo in H₂O (v/v) alle colonne, centrifugare per 1 min. a 500 x g. Ripetere questo passaggio una volta.
- Aggiungere 1 ml di esano alle colonne, centrifugare per 1 min. a 500 x g.

ELUIZIONE DELL'ESTRATTO

- Collocare le colonne nelle provette di vetro borosilicato contrassegnate in maniera corrispondente.
- Aggiungere 1 ml di metanolo alle colonne, centrifugare per 1 min. a 200 x g.
- Utilizzare una colonna per estrarre il campione successivo (fino a 5 volte) o conservare la colonna a 18-28°C. Proteggere dalla luce e dalla polvere.

EVAPORAZIONE & RICOSTITUZIONE DELL'ESTRATTO

- Far evaporare il metanolo utilizzando un **concentratore a vuoto con una trappola a freddo**. In alternativa, utilizzare un bagnetto riscaldato a 37°C e far evaporare il metanolo con un getto di nitrogeno privo di particelle.
- Ricostituire i campioni con 1 ml di tampone di incubazione, vortexare.
- Equilibrare gli estratti per 30 min. a 18-28°C, vortexare. Conservare gli estratti ricostituiti ben sigillati e congelati se non dosati immediatamente.

Procedura di estrazione utilizzando un collettore a vuoto

Nota: Se non diversamente indicato, passare sempre il solvente attraverso la colonna utilizzando il collettore a vuoto ad un flusso di ≤ 5 ml/min.

PREPARAZIONE DELLA COLONNA & CONDIZIONAMENTO

- Contrassegnare 1 colonna di estrazione per ciascun campione da estrarre e collocarla nelle provette di polipropilene o vetro.
- Aggiungere 2 x 1 ml di metanolo alle colonne, lasciare che il solvente passi attraverso il vuoto.
- Aggiungere 2 x 1 ml di H₂O alle colonne, lasciare che il solvente passi attraverso il vuoto.
- Procedere con l'aggiunta del campione prima che la colonna si asciughi.

AGGIUNTA DEL CAMPIONE

- Aggiungere 1 ml di campione alla colonna contrassegnata in maniera corrispondente, lasciare che il solvente passi lentamente (≤ 2 ml/min).
- Procedere con il lavaggio prima che la colonna si asciughi.

LAVAGGIO

- Aggiungere 2 x 1 ml di metanolo al 10% in H₂O (v/v) alle colonne, lasciare che il solvente passi attraverso il vuoto.
- Aggiungere 1 ml di esano alle colonne, lasciare che il solvente passi attraverso il vuoto.
- Creare il vuoto per più di 1min per far evaporare l'esano rimanente nella colonna.

ELUIZIONE DELL'ESTRATTO

- Collocare le colonne in provette di borosilicato contrassegnate in maniera corrispondente.
- Aggiungere 1 ml di metanolo alle colonne, lasciare che il solvente passi lentamente utilizzando il collettore a vuoto ad un flusso di ≤ 2 ml/min.

- Utilizzare la colonna per estrarre il campione successivo (fino a 5 volte) o conservare la colonna a 18-28°C e proteggerla dalla luce e dalla polvere.

EVAPORAZIONE & RICOSTITUZIONE DELL'ESTRATTO

- Far evaporare il metanolo utilizzando un collettore a vuoto con una trappola a freddo. In alternativa, utilizzare una piastra riscaldata a 37°C o un bagnetto ad acqua per far evaporare il metanolo con un getto di nitrogeno privo di particelle.
- Ricostituire i campioni con 1 ml di tampone di incubazione, vortexare.
- Equilibrare gli estratti per 30 min a 18-28°C, vortexare. Conservare gli estratti ricostituiti ben sigillati e congelati se non dosati immediatamente.

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 estratti 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 ¹²⁵I 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 (± 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 (± 2) min a 2-8°C.
8. Aggiungere 1 ml di acqua fredda, bidestillata 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 E 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.

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

1. 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%.

$$\text{percent bound} = \frac{\text{net cpm}}{\text{net MB cpm}} \times 100$$
2. 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).

3. 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 11 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: 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 (da seduta a seduta): 7.9%. La precisione intradosaggio è stata calcolata dai risultati di 20 coppie di valori per ciascun campione in un'unica seduta. I risultati sono presentati in Table 12.

Precisione interdosaggio (da seduta a seduta): 11.7%. La precisione interdosaggio è stata calcolata dai risultati di 20 coppie di valori in 20 sedute diverse. I risultati sono presentati in Table 13.

Precisione intradosaggio (da seduta a seduta) della colonna di estrazione e del RIA combinati: 8.2%. Un siero umano è stato estratto nell'arco di un giorno 12 volte in parallelo utilizzando 12 colonne per estrazione separate. Successivamente, tutti gli estratti sono stati analizzati in un'unica seduta secondo la procedura del dosaggio. I risultati sono presentati in Table 14.

Limite del Bianco (LoB): 0.3 pg/ml. Sono stati dosati venti replicati del calibratore 0 (MB) in un'unica seduta. La concentrazione minima rilevabile di melatonina in 400 ml del tampone di incubazione non estratto è stato calcolato in 0.3 pg/ml (1.3 pmol/l) sottraendo le 2 deviazioni standard della media dei duplicati del calibratore 0 dalle conte al legame massimo ed intersecando questo valore con la curva standard ottenuta nella stessa seduta.

Limite di Quantificatione (LoQ): 0.9 pg/ml. La più piccola dose funzionale rilevabile (limite di quantificazione) è stata calcolata in 0.9 pg/ml (cut-off dei CV intradosaggio = 10%).

Diluizione/linearità-parallelismo: 103.7%. Sono stati estratti due campioni di siero umano contenenti un'elevata concentrazione di melatonina sia diluiti che non diluiti con tampone di incubazione e successivamente dosati secondo la procedura del dosaggio. I risultati sono presentati in Table 15.

Linearità della diluizione estrattiva: 108.8 %. Diversi quantitativi di siero umano contenenti un'elevata concentrazione di melatonina sono stati aggiunti alle colonne di estrazione, estratti secondo il protocollo e successivamente dosati secondo metodica. I risultati sono presentati in Table 16.

Recupero dell'estrazione: 99.9 %. Due campioni di siero sono stati diluiti con quantitativi crescenti di melatonina, estratti ed analizzati secondo quanto previsto in metodica. I risultati sono presentati in (pg/ml) in Table 17.

Specificità: In Table 18 le crossreattività dell'antisiero melatonina sono state riscontrate al 50% del legame.

USO PREVISTO

El radioinmunoanálisis (RIA) de Melatonina ha sido diseñado para realizar la determinación cuantitativa de melatonina (1-3) en suero, plasma, orina y otros especímenes biológicos mediante extracción en fase sólida C18.

PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO

El kit de RIA de Melatonina mide la melatonina por un radioinmunoanálisis de doble anticuerpo que se basa en el anticuerpo anti-melatonina Kennaway G280 (4)*. Las muestras y controles extraídos con columna de fase inversa y los calibradores reconstituidos se incuban con el anticuerpo anti-melatonina y 125I-melatonina. La 125I-melatonina compete 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 125I-melatonina unida al anticuerpo.

* Esta publicación utiliza una extracción de muestras con cloroformo (CHCl₃), previa a un RIA de 125I, e incluye algunos reactivos auxiliares distintos, además de los segundos anticuerpos de fase líquida utilizados en el informe. Por lo tanto, las especificaciones del rendimiento detalladas allí no sustituyen a las descritas en estas instrucciones.

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Código	Reconstitución
Columnas de extracción¹⁾ columnas de extracción C18 de fase inversa (1 ml)	20 uds.	B-MEC
Tampón de incubación	2 viales 100 ml	B-MEL-IB
Antisero anticuerpo anti-melatonina	2 viales 11 ml	B-MEL-AS
Trazador 125I-melatonina	2 viales 11 ml	B-MEL-TR
Calibradores²⁾ Calibradores de melatonina	5 viales liofil.	B-MEL-CASET
Controles bajo / alto³⁾ melatonina en una matriz de tampón de proteínas	2 viales 5.5 ml	B-MEL-CONSET
Segundo anticuerpo segundo anticuerpo unido a una fase sólida	2 viales 11 ml	B-AB2

Tabla 9

¹⁾ Cada columna de extracción suministrada con este kit puede utilizarse hasta cuatro veces si se usa de acuerdo con los procedimientos de extracción descritos en estas instrucciones de uso.

²⁾ Después de la reconstitución los calibradores contienen 0,5, 1,5, 5, 15 y 50 pg/ml de melatonina. Reconstituya cada calibrador con 5.0 ml de tampón de incubación, agite. Déjelo durante al menos 10 minutos a 2-8°C y agítelo suavemente varias veces antes de utilizarlo.

³⁾ Cantidad de melatonina específica del lote, consulte la hoja de datos de control de calidad adicional del kit. Extraiga los controles según el protocolo como se describe en las págs. 18 y sig.

ALMACENAMIENTO Y DURACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivos sin abrir	
Almacénese a 2-8°C. No utilice el kit pasada la fecha de caducidad. Las columnas deben almacenarse a 18-28°C	
Reactivos abiertos / reconstituidos	
Columnas de extracción	Las columnas utilizadas deben almacenarse a 18-28°C protegidas del polvo y de la luz.
Tampón de incubación	Estable a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.
Antisero	
Trazador	
Calibradores	
Controles	Después de la extracción almacene los controles sin reconstituir a -20°C
Segundo anticuerpo	Almacene refrigerado (¡No lo congele!) Estable a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

Tabla 10

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- Material radiactivo: Este kit contiene un emisor gamma ionizante con una vida media de 59,4 días (melatonina yodada 125; el radionúclido es yodo 125, 125I). 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.
- Los controles (B-MEL-CONSET) contienen material de origen humano: Aunque se ha comprobado y encontrado negativo para el antígeno de superficie de HBV y anticuerpos HCV y VIH1/2, los reactivos deben manipularse como si fueran capaces de transmitir infecciones y deben manejarse de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio, tomando las precauciones adecuadas.

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 antisero, 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%.

EQUIPOS NECESARIOS

- Pipetas de precisión de 100, 1000 y 5000 µl (o preferiblemente una pipeta múltiple ajustable de 100–1000 µl) con tapones desechables
- Colector de vacío de extracción para aplicación a las columnas de extracción (opcional)
- Concentrador de vacío o dispositivo para nitrógeno libre de partículas
- Centrífuga refrigerada
- Mezclador vortex
- Barra de agitación y agitador magnético
- Dispositivo de aspiración
- Contador gamma.

MATERIALES RECOMENDADOS NO INCLUIDOS

- Tubos desechables de poliestireno para el RIA (p. ej. tubos cónicos de Sarstedt; nº 57.477)

- Tubos desechables de vidrio de borosilicato para la preparación de los extractos (suero) (*p. ej.* tubos de ensayo desechables de cristal CW de Baxter; nº 451296)
- Metanol (*tipo HPLC*)
- Hexano (*p.a.*)
- Agua bidestilada desionizada (ultrapura, sin contenido de residuos orgánicos).

RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

Cuando se extraiga sangre por la noche se debe utilizar una linterna suave o una luz amarilla (≤ 100 lux) para evitar una posible influencia de la luz sobre el perfil de melatonina.

Suero: El procedimiento requiere unos 2,5 ml de sangre o 1 ml de suero por extracción (si la muestra no se diluye después de la extracción). Recoja la sangre en tubos limpios, evite la hemólisis, deje coagular durante 45 minutos a temperatura ambiente (18-28°C) protegido de la luz. Centrifugue a 1800 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-28°C) y recoja el suero.

No deben utilizarse muestras lipémicas, hemolíticas o ictericas en este ensayo. Se pueden evitar las muestras lipémicas pidiendo a los pacientes que no coman como mínimo durante las 12 horas anteriores a la toma de la muestra.

Plasma: El procedimiento requiere unos 2,5 ml de sangre o 1 ml de suero por extracción (si la muestra no se diluye después de la extracción). Recoja la sangre en tubos con EDTA o heparina, centrifugue durante 15 min a 18-28°C y 1800 x g, recoja el plasma. No utilice muestras excesivamente hemolizadas.

Almacenamiento de las muestras: Si no se extraen inmediatamente, las muestras de suero o plasma deben congelarse y pueden almacenarse como mínimo 6 meses a -20°C. Debe evitarse la congelación y descongelación repetida de las muestras.

EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS Y CONTROLES

- Cada columna de extracción suministrada con este kit puede utilizarse hasta cinco veces si se usa de acuerdo con los procedimientos de extracción descritos a continuación. Las columnas usadas deben almacenarse a 18-28°C protegidas de la luz y del polvo.
- Para el procedimiento de extracción utilice siempre METANOL Y HEXANO DE TIPO HPLC, así como AGUA DESIONIZADA DE CALIDAD ULTRAPURA (sin residuos orgánicos como aceites o detergentes).
- Para evitar el atasco de las columnas FILTRE O CENTRIFUGUE LAS MUESTRAS QUE CONTENGAN PARTÍCULAS, como coágulos de fibrina, antes de la extracción (*p. ej.* plasma con heparina que se congeló).
- El método de extracción produce RECUPERACIONES de >90% con ¹²⁵I-melatonina o ³H-melatonina cuando se utilizan muestras de suero y/o plasma humanos.
- Si las muestras que han de medirse contienen >50 pg/ml de melatonina, el volumen de la muestra puede reducirse hasta 0,125 ml sin un cambio importante en las recuperaciones de la extracción. Esto significa también que con este método se pueden utilizar VOLUMENES DE MUESTRA TAN PEQUEÑOS COMO 0,125 ML ($\approx 0,3$ ml de sangre) (*cf.* página 4 para la linealidad de la dilución de la extracción).
- El procedimiento de extracción se PROBÓ Y VALIDÓ PARA MUESTRAS DE SUERO, PLASMA, ORINA Y SALIVA HUMANOS. Si se utilizan otras muestras se recomienda validar la recuperación de la extracción utilizando muestras enriquecidas con ¹²⁵I-melatonina.

Procedimiento de extracción utilizando centrifugación

PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA COLUMNA

- Marque 1 columna de extracción para cada muestra que se deba extraer y colóquelas en tubos de polipropileno o vidrio.

- Añada 1 ml de metanol a las columnas, centrifugue durante 1 min a 200 x g. Repita este paso una vez.
- Añada 1 ml de H₂O a las columnas, centrifugue durante 1 min a 200 x g. Repita este paso una vez.
- Proceda con la aplicación de la muestra sin demora.

APLICACIÓN DE LA MUESTRA

- Añada 1 ml de la muestra a la columna marcada de la forma correspondiente, centrifugue durante 1 min a 200 x g.

LAVADO

- Añada 1 ml de metanol al 10% en H₂O (v/v) a las columnas, centrifugue durante 1 min a 500 x g. Repita este paso una vez.
- Añada 1 ml de hexano a las columnas, centrifugue durante 1 min a 500 x g.

ELUCIÓN DEL EXTRACTO

- Coloque las columnas en tubos limpios de borosilicato marcados de la forma correspondiente.
- Añada 1 ml de metanol a las columnas, centrifugue durante 1 min a 200 x g.
- Utilice la columna para la extracción de la siguiente muestra (hasta 5 veces) o almacene la columna a 18-28°C Protéjala de la luz y del polvo.

EVAPORACIÓN Y RECONSTITUCIÓN DEL EXTRACTO

- Evapore el metanol hasta la sequedad utilizando un concentrador de vacío con una trampa de frío. Alternativamente, utilice una estufa o baño maría a 37°C y evapore el metanol hasta la sequedad con una corriente de nitrógeno libre de partículas.
- Reconstituya las muestras con 1 ml de tampón de incubación, agite con el vortex.
- Deje equilibrar los extractos durante 30 min a 18-28°C, agite con el vortex. Almacene los extractos reconstituidos tapados y congelados si no se realizan los ensayos inmediatamente.

Procedimiento de extracción utilizando colector de vacío

Nota: Si no se indica lo contrario, pase siempre el solvente a través de la columna mediante vacío y con un flujo de ≤ 5 ml/min.

PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA COLUMNA

- Marque 1 columna de extracción para cada muestra que se deba extraer y colóquelas en tubos de polipropileno o vidrio.
- Añada 2 x 1 ml de metanol a las columnas, deje que el solvente pase por ellas mediante vacío.
- Añada 2 x 1 ml de H₂O a las columnas, deje que el solvente pase por ellas mediante vacío.
- Proceda con la aplicación de la muestra antes de que la columna se seque.

APLICACIÓN DE LA MUESTRA

- Añada 1 ml de la muestra a la columna marcada de la forma correspondiente, deje que el solvente pase por ella lentamente (≤ 2 ml/min).
- Proceda con el lavado antes de que la columna se seque.

LAVADO

- Añada 2 x 1 ml de metanol al 10% en H₂O (v/v) a las columnas, deje que el solvente pase por ellas mediante vacío.
- Añada 1 ml de hexano a las columnas, deje que el solvente pase por ellas mediante vacío.
- Aplique vacío durante 1 min. más para evaporar el hexano que quede en la columna.

ELUCIÓN DEL EXTRACTO

- Coloque las columnas en tubos limpios de borosilicato marcados de la forma correspondiente.
- Añada 1 ml de metanol a las columnas, deje que el solvente pase lentamente por ellas mediante vacío y un flujo de ≤ 2 ml/min.

- Utilice la columna para la extracción de la siguiente muestra (hasta 5 veces) o almacene la columna a 18-28°C y protegida de la luz y del polvo.

EVAPORACIÓN Y RECONSTITUCIÓN DEL EXTRACTO

- Evapore el metanol hasta la sequedad utilizando un concentrador de vacío con una trampa de frío. Alternativamente, utilice una estufa o baño maría a 37°C y evapore el metanol hasta la sequedad con una corriente de nitrógeno libre de partículas.
- Reconstituya las muestras con 1 ml de tampón de incubación, agite con el vortex.
- Deje equilibrar los extractos durante 30 min a 18-28°C, agite con el vortex. Almacene los extractos reconstituidos tapados y congelados si no se realizan los ensayos inmediatamente.

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 ¹²⁵I-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:

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

1. 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%.

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

2. 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 logistic (4-PL), «spline smoothed» o equivalente.

3. 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 11 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: Melatonina 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): 7.9%. La precisión intra-ensayo se calculó a partir de los resultados de 20 pares de valores obtenidos de cada muestra en una única prueba. Los resultados se presentan en Table 12.

Precisión inter-ensayo (prueba a prueba): 11.7%. La precisión inter-ensayo se calculó a partir de los resultados de 20 pares de valores obtenidos en 20 pruebas diferentes. Los resultados se presentan en Table 13.

Precisión intra-ensayo (prueba a prueba) de la extracción de la columna y del RIA combinados: 8.2%. Un suero humano diurno se extrajo 12 veces en paralelo utilizando 12 columnas de extracción distintas. A continuación se analizaron todos los extractos en una única prueba siguiendo el procedimiento del ensayo. Los resultados se presentan en Table 14.

Límite del blanco (LoB): 0.3 pg/ml. Se ensayaron veinte duplicados del calibrador cero (MB) en una única prueba. La concentración mínima detectable de melatonina en 400 ml de tampón de incubación sin extraer se calculó en 0.3 pg/ml (1.3 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: (LoQ): 0.9 pg/ml. La dosis mínima detectable funcional (límite de cuantificación) se calculó en 0.9 pg/ml (valor de corte de intra-ensayo CV = 10%).

Linealidad/paralelismo de dilución: 103.7%. Se extrajeron dos muestras de suero humano que contenían una elevada concentración 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 15.

Linealidad de dilución de la extracción: 108.8 %. Se aplicaron a las columnas de extracción cantidades variables de una muestra de suero humano que contenía una elevada concentración de melatonina, se extrajeron según el protocolo y se ensayaron a continuación siguiendo el procedimiento del ensayo. Los resultados se presentan en Table 16.

Recuperación de la extracción: 99.9 %. Se enriquecieron dos muestras de suero con cantidades crecientes de melatonina, se extrajeron y se analizaron siguiendo el procedimiento del ensayo. Los resultados se presentan en Table 17.

Especificidad: En Table 18 las reacciones cruzadas del antisuero de la melatonina se encontraron en la unión al 50%.

Table 11 Examples of results

	cpm	B/T [%]	B/B ₀ [%]	Conc. [pg/ml]	cpm _{CV} [%]
Total	17145.9	100.0			
Total	16942.3	100.0			
Total Avg	17044.1	100.0			0.8
NSB	479.1	2.81			
NSB	434.6	2.55			
NSB Avg	456.9	2.7			6.9
MB	5501.7	32.28	100.0		
MB	5478.6	32.14	100.0		
MB Avg	5490.2	32.2	100.0		0.8
Cal A	5029.2	29.51	91.0		
Cal A	5020.7	29.46	90.9		
Cal A Avg	5025.0	29.5	90.9	0.5	0.1
Cal B	4218.6	24.75	74.9		
Cal B	4285.2	25.14	76.2		
Cal B Avg	4251.9	25.0	75.5	1.5	1.1
Cal C	3020.9	17.72	51.0		
Cal C	2949.6	17.31	49.6		
Cal C Avg	2985.3	17.5	50.3	5.0	1.7
Cal D	1921.1	11.27	29.1		
Cal D	1866.2	10.95	28.1		
Cal D Avg	1893.6	11.1	28.6	15.0	2.1
Cal E	950.6	5.58	9.8		
Cal E	1006.9	5.91	10.9		
Cal E Avg	978.8	5.7	10.4	50.0	4.1
Con L	3666.3		63.8	2.69	
Con L	3669.6		63.8	2.68	
Con L Avg	3668.0		63.8	2.7	0.2
Con H	1607.7		22.9	21.20	
Con H	1580.4		22.3	21.96	
Con H Avg	1594.1		22.6	21.6	2.5

ED₂₀ = 25.6 pg/ml ED₅₀ = 5.0 pg/ml ED₈₀ = 1.1 pg/ml

Figure 1 Example of Standard Curve

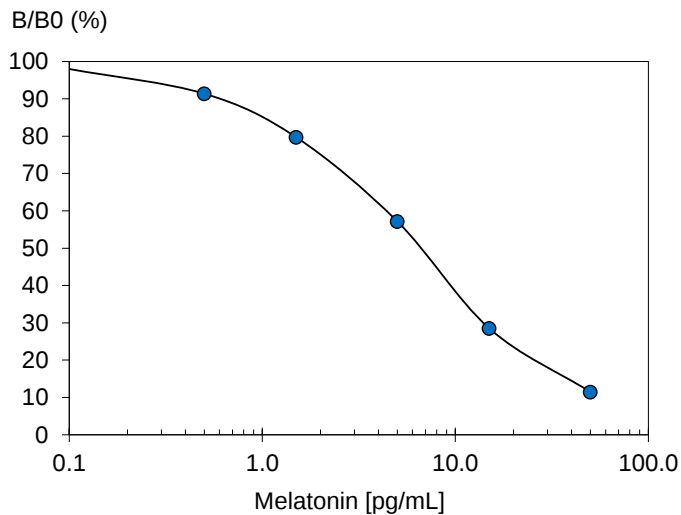


Table 12 Intra Assay Precision

Sample	Mean [pg/ml]	SD [pg/ml]	CV [%]
Low Control	4.6	0.31	6.7
High Control	14.3	1.08	7.5
Low Serum	1.9	0.19	10.0
High Serum	21.9	1.58	7.2
Mean			9.7

Table 13 Inter-Assay Precision

Sample	Mean [pg/ml]	SD [pg/ml]	CV [%]
Low Control	2.3	0.38	16.2
High Control	18.7	1.35	7.2
Mean			11.7

Table 14 Intra-Assay Precision Column Extraction and RIA

Sample	Mean [pg/ml]	SD [pg/ml]	CV [%]
Low Serum1	1.6	0.22	14.0
Low Serum2	2.8	0.17	6.1
High Serum	19.5	0.88	4.5
Mean			8.2

Table 15 Dilution/Linearity-Parallelism

Sample	Dilution	Obs. (O) [pg/ml]	Exp. (E) [pg/ml]	% O/E
High Control	1:1	18.9	-	-
	1:2	9.6	9.5	101.4
	1:4	5.2	4.7	109.0
	1:8	2.7	2.4	114.3
	1:16	1.4	1.2	119.7
High Serum	1:1	36.3	-	-
	1:2	16.8	18.2	92.7
	1:4	8.3	9.1	91.6
	1:8	4.3	4.5	95.4
	1:16	2.3	2.3	100.7
Mean				103.7

Table 16 Extractive Dilution-Linearity

Sample	Volume applied [ml]	Obs. (O) [pg/ml]	Exp. (E) [pg/ml]	% O/E
High Serum	1	29.1	-	-
	0.5	15.1	14.6	103.8
	0.25	7.8	7.3	107.2
	0.125	4.2	3.6	115.4
Mean				108.8

Table 17 Extraction Recovery

Sample	Basic Value	Added [pg/ml]	Observed [pg/ml]	Expected [pg/ml]	Recovery [%]
A	0.46	1	1.2	1.5	83
		2	2.2	2.5	88
		5	5.2	5.5	95
		10	10.5	10.5	100
		20	21.7	20.5	106
		40	41.0	40.5	101
B	0.61	1	1.9	1.6	120
		2	2.3	2.6	87
		5	5.5	5.6	98
		10	11.8	10.6	111
		20	22.1	20.6	107
		40	41.3	40.6	102
Mean					99.9

Table 18 Specificity

Compound	Crossreactivity [%]
melatonin	100
6-sulfatoxymelatonin	0.002
serotonin	< 0.001
5-hydroxy-indoleacetic acid	< 0.001
N-acetylserotonin	0.027
5-methoxytryptamine	0.003
5-methoxytryptophan	0.001
5-methoxytryptophol	0.001

Table description: cf. "Results" and "Performance Characteristics" (page 4). **Tabellenbeschreibung:** siehe "Resultate" und "Leistungsmerkmale" (Seite 7). **Explications relatives aux tableaux:** voir "Resultats" et "Caractéristiques de Performance" (page 11). **Descrizione tavola:** cf. "Risultati" e "Caratteristiche di Prestazione" (15). **Explicaciones relativas a las Tablas:** ver "Resultados" y "Características de Eficiencia" (página 19).

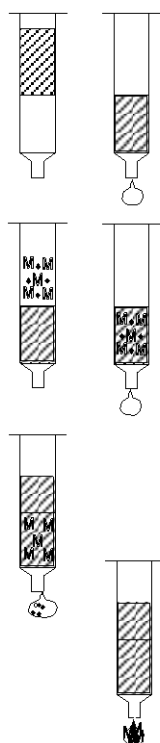
1. Cajochen C. et al. *Role of melatonin in the regulation of human circadian rhythms and sleep*. J Neuroendocrinol 15, 432-7 (2003).
2. Luboshitzky R. et al. *Daily and seasonal variations in the concentration of melatonin in the human pineal gland*. Brain Res Bull 47, 271-6 (1998).
3. Danilenko K. et al. *Phase advance after one or three simulated dawns in humans*. Chronobiol Int 17, 659-68 (2000).
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).

Change Log

Date	Version	Reason for change
2020-12-22	01	1 st NovoLytiX version
2022-03-26	02	Calibrators (B-MEL-CASET) are delivered as 50x concentrates and need to be reconstituted with 4.9 mL of B-MEL-IB each; section MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED is separated into sections EQUIPMENT REQUIRED and MATERIALS RECOMMENDED BUT NOT PROVIDED
2022-12-05	03	Calibrators (B-MEL-CASET) are delivered as 50x lyophilized concentrates and need to be reconstituted with 5.0 mL of B-MEL-IB each

EXTRACTION PROCEDURE

C18 column



Conditioning

2 x 1 ml methanol
2 x 1 ml water

aspirate or centrifuge

Load column

1 ml of sample

aspirate or centrifuge

Wash column

2 x 1 ml 10% (v/v) methanol
1 ml hexane

aspirate or centrifuge

Elute Melatonin

1 ml methanol

aspirate or centrifuge

Evaporate to dryness
and reconstitue in 1 ml of
Incubation Buffer

Figure 2

RADIOIMMUNOASSAY PROCEDURE							
Polystyrene tubes in duplicate	Incubation Buffer (μl)	Calibrator, Control, Sample (μl)	Antiserum (μl)	Tracer (μl)		Second Antibody (μl)	
Total	--	--	--	100		--	Vortex and incubate for 15 minutes (± 1 min) at 2-8°C
NSB	500	--	--	100		100	
MB	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 A 0.5 pg/ml	--	400	100	100		100	
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	
Sample	--	400	100	100	Vortex and incubate at 2-8°C for 20 hours (± 4 hours)	100	Aspirate supernatant (except T tubes) and count for 2 minutes in a Gamma counter

Table 19

Symbol	Explanation
	Use by Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad
REF	Catalogue number Bestellnummer Référence du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo
LOT	Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote
IVD	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device <i>In Vitro</i> Diagnostikum Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura
	Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso
	Contains sufficient for <n> tests Ausreichend für „n“ Ansätze Contenu suffisant pour „n“ tests Contenuto sufficiente per „n“ saggi Contenido suficiente para <n> ensayos
	Radioactive Material Radioaktives Material Matériel radioactif Materiale radioattivo Material radiactivo

Symbol	Explanation
MEC	Extraction Columns Extraktionssäulen Colonne d'extraction Colonne d' estrazione Columnas de extracción
BUF INC	Incubation Buffer Inkubations-Puffer Tampon d'incubation Tampone d'incubazione Tampón de incubación
Ab	Antiserum Antiserum Antisérum Antisiero Antisuero
TR	Tracer Tracer Traceur Tracciante Trazador
CALA - CALE	Calibrator A - E Kalibrator A - E Calibrateur A - E Calibratore A - E Calibrador A - E
CONTROL L	Control Low Kontrolle tief Contrôle bas Controllo basso Control bajo
CONTROL H	Control High Kontrolle hoch Contrôle élevé Controllo alto Control alto
Ab2	2 nd Antibody 2. Antikörper 2 ^{ème} Anticorps Secondo anticorpo Segundo anticuerpo



Printing Date
2022-12-06