

# 6-Sulfatoxymelatonin

## ELISA

EK-M6S 96 tests

Version: 04  
Revision date: 2024-04-13

## ENGLISH

### INTENDED USE

The 6-Sulfatoxymelatonin ELISA Kit provides materials for the direct and quantitative determination of 6-sulfatoxymelatonin (6-SMT) in urine (1-7).

### PRINCIPLE OF THE ASSAY

The 6-SMT ELISA is a competitive immunoassay using a capture antibody technique (8). A polyclonal antibody specific for rabbit immunoglobulin has been coated onto the microtiter plate provided in the kit. During the first 3-hours incubation, 6-SMT present in the pre-diluted urine samples, Controls and ready to use Calibrators, respectively, compete with biotinylated 6-SMT for the binding sites of a highly specific rabbit anti-6-SMT antibody, while the formed (biotinylated) 6-SMT-antibody complexes are captured by the second antibody coated on the wells. After washing, the Enzyme Label, streptavidin conjugated to horseradish peroxidase (HRP) is added which binds during a second 30-minutes incubation step to the 6-SMT-biotin-antibody complexes captured on the coated wells. Unbound Enzyme Label is then removed by a second washing step and TMB substrate (Tetramethylbenzidine) is added to the wells. In a third 30-minutes incubation step, a colored product is formed in inverse proportion to the amount of 6-SMT originally present in the sample. The color turns from blue to yellow after the addition of an acidic Stop Solution and can be measured at 450 nm.

### REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantities	Code	Reconstitution
<b>Microtiter Plate</b> precoated with goat anti-rabbit Ig	8x12 wells	B-M6S-MP	Wash 2x before use
<b>Plate Sealer</b>	3 pcs.		
<b>Wash Buffer Concentrate (10x)</b> with preservatives	1 bottle 100 ml	B-WB	Dilute with 900 ml of deionized water
<b>Incubation Buffer</b> with preservatives	1 bottle 100 ml	B-M6S-IB	Ready to use
<b>Calibrators A to F<sup>1)</sup></b> 6-SMT in a buffer matrix with preservatives	1 vial 2 ml 5 vials 0.5 ml	B-M6S-CASET	Ready to use
<b>Control Low / High<sup>2)</sup></b> Diluted human urine with preservatives	2 vials 0.5 ml	B-M6S-CONSET	Ready to use
<b>Antiserum</b> Rabbit anti-6-SMT in a buffer matrix with preservatives	1 vial 5.5 ml	B-M6S-AS	Ready to use (yellow solution)
<b>Biotin Conjugate</b> 6-SMT conjugated to biotin in a buffer matrix with preservatives	1 vial 5.5 ml	B-M6S-BC	Ready to use (blue solution)
<b>Enzyme Label</b> Streptavidin-HRP in a protein-based buffer with preservatives	1 vial 11 ml	B-M6S-EL	Ready to use (yellow solution)
<b>TMB Substrate</b> Citrate buffered and with hydrogen peroxide	1 vial 11 ml	B-TMB	Ready to use (colourless)
<b>Stop Solution</b> 0.25 M sulfuric acid	1 vial 11 ml	B-ST5	Ready to use <b>Irritant</b>

Table 1

<sup>1)</sup> The Calibrator A is the Zero Calibrator and does not contain 6-SMT (2 ml/vial). Calibrators B, C, D, E and F effectively contain 4, 10, 25, 62.5 and 200 pg/ml of 6-SMT, respectively (0.5 ml/vial). As the recommended dilution for urine samples is 1 in 200, the Calibrators B, C, D, E and F are labeled as follows: 0.8, 2, 5, 12.5 and 40 ng/ml, respectively. In this way, the sample dilution is already taken into account for the final calculations.

<sup>2)</sup> The Controls contain lot-specific amounts of 6-SMT. Refer to the QC Data Sheet for exact concentrations.

## STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

Unopened Reagents	
All unopened kit components are stable at 2-8°C until the expiration date printed on the labels.	
Opened / Reconstituted Reagents	
Microtiter Plate	Return unused strips to the aluminum pouch and reseal along the entire edge of zip-seal. Store for up to 2 months at 2-8°C.
Wash Buffer	Store at 2-8°C until expiration date printed on the labels.
Incubation Buffer	
Calibrators	
Controls	
Antiserum	
Biotin Conjugate	
Enzyme Label	Store at 18-28°C until expiration date printed on the label
Substrate Solution	
Stop Solution	

Table 2

## PRECAUTIONS

### SAFETY PRECAUTIONS

- The Calibrators (B-M6S-CASET) and the controls (B-M6S-CONSET) of this kit 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.
- The Stop Solution (B-ST5) contains sulfuric acid. It is irritant to eyes, skin and mucous membranes. Avoid contact with eyes, skin and clothing. After contact with eyes or skin, wash immediately with plenty of water.
- Unused solutions should be disposed of according to local State and Federal regulations.

### TECHNICAL PRECAUTIONS

#### Kit components

- 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.
- Concentrated wash buffer may contain salt crystals. Make sure these crystals have completely dissolved after dilution of the concentrate by stirring the diluted buffer at ambient temperature (18-28°C).
- If an automated plate washer is used, "plate mode" should be chosen so that dispensing is performed sequentially on all strips before aspirating.
- Components must not be used after the expiry date printed on the labels.
- Do not mix different lots of reagents.
- Every effort should be made to ensure that no cross contamination occurs between reagents, samples or between wells.
- Microwells cannot be re-used.
- The enzyme used as the label is inactivated by oxygen and is highly sensitive to sodium azide, thimerosal, hypochlorous acid and aromatic chlorohydrocarbons often found in laboratory water supplies. Therefore, use only deionized high quality water.

### Assay Procedure

- Blank reagent, calibrators and controls must be assayed in duplicates. Duplicates for patient samples are also strongly recommended, but many users prefer single determinations. This approach allows to test up to 39 samples in duplicates or 78 samples as singles per microtiter plate.

- If the initial concentration of a sample exceeds the highest calibrator, the urine sample should be further diluted with Incubation Buffer and assayed again according to the assay procedure. The additional dilution must be considered when calculating the final concentration of 6-SMT present in the sample.
- If the initial concentration of a sample is lower than the lowest calibrator, the urine sample should be less diluted with Incubation Buffer (e.g. by a factor of 20 instead of 200) and assayed again according to the assay procedure. The lower dilution factor must be considered when calculating the final concentration of 6-SMT present in the sample.

#### EQUIPMENT REQUIRED

- Precision pipettes with disposable tips: 5 µl, 50 µl, 100 µl and 1 ml pipettes.
- Microtiter plate washer or squeeze bottle for Wash Buffer.
- Refrigerator.
- Microtiter plate rotator.
- Microtiter plate reader for measurement of absorbance at 450 nm.

#### MATERIALS RECOMMENDED BUT NOT PROVIDED

- Disposable polystyrene or polypropylene tubes for the preparation of sample dilutions.
- 1000 ml cylinder for the dilution of the Wash Buffer Concentrate.
- Blotting paper.

#### SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

The procedure calls for <10 µl of urine. Collect urine, centrifuge for 1 minute at 10,000 x g or 5 minutes at 2000 x g and transfer aliquots to fresh micro-tubes. Urinary 6-SMT is stable for several weeks even at ambient temperatures. However, due to potential growth of microorganisms it is recommended to store the urine samples at ≤-20°C. Samples are stable for at least 18 months if stored at ≤-20°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles. Frozen samples should be thawed and mixed thoroughly by vortexing prior to use.

#### ASSAY PROCEDURE

1. Dilute all patient urinary samples 1:200 with Incubation Buffer (e.g. 5 µl of urine + 1 ml of Incubation Buffer).
2. Prepare a plate with sufficient strips to test the desired number of Calibrators, Controls and samples. Remove excess strips from the holder and reseal them in the foil pouch. Store refrigerated.
3. Empty the wells and wash twice using at least 300 µl of Wash Buffer per well. Empty the wells and strike the plate firmly onto blotting paper.
- 4a. Pipet 100 µl of Calibrator A in duplicate into wells A1+A2 (Blank wells).
- 4b. Pipet 50 µl of Calibrator A (Zero Standard) in duplicate into wells B1+B2.  
Pipet 50 µl of Calibrator B in duplicate into wells C1+C2.  
Pipet 50 µl of Calibrator C in duplicate into wells D1+D2.  
Pipet 50 µl of Calibrator D in duplicate into wells E1+E2.  
Pipet 50 µl of Calibrator E in duplicate into wells F1+F2.  
Pipet 50 µl of Calibrator F in duplicate into wells G1+G2.  
Pipet 50 µl of Low Control in duplicate into wells H1+H2.  
Pipet 50 µl of High Control in duplicate into wells A3+A4.
- 4c. Pipet 50 µl of each diluted sample in duplicate into the subsequent wells.
5. Add 50 µl of Biotin Conjugate (blue solution) to all wells.
6. Add 50 µl of Antiserum (yellow solution) to all wells, **except Blank wells** (wells A1+A2). Cover the plate with a plate sealer and place it for 60 seconds on a plate rotator set at 600 rpm.

7. Incubate for 3 hours (± 5 min) at 2-8°C.
8. Remove and discard the Plate Sealer. Empty the wells and wash four times using at least 300 µl of Wash Buffer per well. Empty the wells and strike the plate firmly onto blotting paper.
9. Add 100 µl of Enzyme Label (yellow solution) to all wells.
10. Cover the plate with a Plate Sealer and incubate for 30 minutes (± 5 min) at 2-8°C.  
**Important: Allow the TMB substrate solution to reach 18-28°C.**
11. Remove and discard the Plate Sealer. Empty the wells and wash four times using at least 300 µl of Wash Buffer per well. Empty the wells and strike the plate firmly onto blotting paper.
12. Add 100 µl of the TMB Substrate Solution to each well.
13. Cover the plate with a Plate Sealer, place the plate on a plate rotator set at 600 rpm, protect the plate from direct light and incubate for 30 minutes (± 2 min) at 18-28°C.
14. Add 100 µl of Stop Solution to all wells. Remove air bubbles with a pipette tip. Proceed to step 15. within 30 minutes.
15. Read the absorbance at 450 nm in a microtiter plate reader.

#### RESULTS & STANDARDIZATION

**Standard Curve:** Record the absorbance at 450 nm for each calibrator and blank (NSB) well. Average the duplicate values, subtract the average of the blank wells (NSB) and record averages (=corrected average absorbance). Calculate the binding (B) of each pair of calibrator wells as a percent of Zero Calibrator (B<sub>0</sub>), with the NSB-corrected absorbance of the Zero Calibrator taken as 100 %:

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

Plot the percent bound (vertical axis) versus the concentration of M6S in ng/ml (horizontal axis) using a lin/log graph paper. Draw the best fitting curve or calculate the standard curve using a four parameter logistic (4-PL) algorithm.

**Samples and Controls:** Record the absorbance at 450 nm for each sample well. Average the duplicate values, subtract the average of the blank wells and record the averages (=corrected average absorbance). Calculate, as described above, the binding of each pair of sample wells as a percent of Zero Calibrator (B<sub>0</sub>), with the NSB-corrected absorbance of the Zero Calibrator taken as 100%. Locate the B/B<sub>0</sub> value of the samples on the vertical axis, draw a horizontal line intersecting the standard curve and read the M6S concentration (ng/ml) from the horizontal axis. See Table 11 and Figure 1 for examples of results and standard curves. *These results and standard curves are for demonstration purposes only. A standard curve must be generated for each set of samples to be assayed.*

**Standardization:** The NovoLytiX 6-Sulfatoxymelatonin ELISA is calibrated against a certified Reference Standard (Toronto Research Chemicals # S689050; CAS 2208-40-4), and its correct concentration used to generate the kit Calibrators was confirmed by UV/VIS:

$$\epsilon_{222} = 39'727 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ in H}_2\text{O}.$$

#### 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.

Since there are no controls for urinary 6-SMT commercially available, we recommend to use urine pools containing different levels of 6-SMT for internal quality controls. The reproducibility of standard curve parameters and control values should be within established limits of laboratory acceptability. The confidence limits for the Controls are lot-specific and printed on the QC data sheet.

If the precision of the assay does not correlate with the established limits and repetition excludes errors in technique, check the following issues: i) pipetting, temperature controlling and timing devices ii) ELISA reader settings iii) expiration dates of reagents iv) storage and incubation conditions v) TMB Substrate Solution should be colorless vi) purity of water.

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

**Intra-Assay Precision (Within-Run): 7.1%.** The intra-assay precision was calculated from the results of 24 pairs of values obtained in a single run from three urine samples containing different levels of 6-SMT. The results are presented in Table 12.

**Inter-Assay Precision (Run-to-Run): 11.9%.** From 6 urine samples containing different levels of 6-SMT the inter-assay precision was calculated from the results of 10 pairs of values obtained in 10 different runs. The results are presented in Table 13.

**Dilution Linearity/Parallelism: 97.8%.** Three urine samples containing high levels of 6-SMT were sequentially diluted with Incubation Buffer and assayed according to the assay procedure. The Results are presented in Table 14.

**Spiking Recovery: 119%.** Three human urine samples were spiked with increasing amounts of 6-SMT and assayed according to the assay procedure. The Results are presented in Table 15.

**Analytical Sensitivity (Limit of Blank, LoB): 0.14 ng/ml.** 24 duplicates of Calibrator A (= Zero Calibrator) were assayed in a single run. Mean and standard deviation were calculated for the absorbance values. The minimum detectable dose of 6-SMT was calculated to be 0.14 ng/ml by subtracting two standard deviations from the mean absorbance of the Zero Calibrator and intersecting this value with the standard curve obtained in the same run.

**Functional Sensitivity (Limit of Quantitation, LoQ): 1.5 ng/ml.** The Limit of Quantification is defined as the minimum 6-SMT concentration in urine that can be measured with an inter-assay coefficient of variation (C.V.) of less than 15%. The FLDD was determined from 7 different urinary samples each measured in one duplicate pair of tubes over 10 assays. The Limit of Quantification was calculated to be 1.5 ng/ml (at a sample dilution of 1:200).

**Specificity:** The following cross-reactions of the Rabbit anti-6-SMT antibody have been determined at 50 % binding. The results are presented in Table 16.

**Method Comparison:** 42 urine samples were analyzed using the 6-Sulfatoxymelatonin ELISA versus a commercially available reagent set for measuring 6-SMT by means of an <sup>125</sup>I-radioimmunoassay which is often used and cited in the scientific literature (e.g. 9-11). The linear regression analysis of the data yielded the following statistics (see Figure 2):

$$6\text{-SMT ELISA} = 0.75 \times \text{RIA} + 1.70 \text{ ng/ml}; R^2 = 0.984.$$

## DEUTSCH

### ANWENDUNGSZWECK

Der 6-Sulfatoxymelatonin ELISA Kit wird gebraucht für die direkte und quantitative Bestimmung von 6-Sulfatoxymelatonin (6-SMT) in Urin (1-7).

### PRINZIP DER METHODE

Der 6-SMT ELISA ist ein kompetitiver Immun-Assay mit Fangantikörper Technik (8). Die Mikrotiterplatten wurden mit einem polyklonalen Antikörper, welcher spezifisch Immunglobuline von Kaninchen erkennt, beschichtet. Während der ersten Inkubation, konkurriert das 6-SMT, welches in den vorverdünnten Proben, den Kontrollen und den Kalibratoren vorhanden ist, mit biotinyliertem 6-SMT um die hoch spezifischen Bindungsstellen der Kaninchen anti-6-SMT Antikörper. Gleichzeitig werden die gebildeten 6-SMT-Antikörper Komplexe über den zweiten Antikörper (anti-Kaninchen) an die Platte gebunden. Nach einem Waschschriff, wird der Enzym-Marker, an Streptavidin gebundene Meerrettich Peroxidase (HRP), für 30 Minuten den gebundenen 6-SMT-Biotin-Antikörper Komplexen zugegeben. Ungebundener Enzym-Marker wird durch einen zweiten Waschschriff entfernt und das TMB Substrat (Tetramethylbenzidin) wird zugegeben. Im nachfolgenden Inkubationsschriff wird das Substrat zu einem farbigen Produkt umgewandelt, welches umgekehrt proportional zu der 6-SMT Menge der Proben ist. Nach Zugabe der sauren Stopp-Lösung wechselt die Farbe von Blau nach Gelb und kann bei 450 nm gemessen werden.

### GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Menge	Art.-Nr.	Rekonstitution
<b>Mikrotiter-Platte</b> mit Ziege anti-Kaninchen Ak beschichtet	8x12 Küvetten	B-M6S- MP	Vor Gebrauch 2x waschen
<b>Abdeckfolie</b>	3 Stück		
<b>Wasch-Puffer Konzentrat (10x)</b> Konservierungsstoffe	1 Flasche 100 ml	B-WB	Mit 900 ml deionisiertem Wasser lösen
<b>Inkubations-Puffer</b> Konservierungsstoffe	1 Flasche 100 ml	B-M6S-IB	Gebrauchsfertig
<b>Kalibratoren A - F<sup>1)</sup></b> 6-SMT in Puffermatrix; Konservierungsstoffe	1 Flasche 2 ml 5 Flaschen 0.5 ml	B-M6S- CASET	Gebrauchsfertig
<b>Kontrolle tief / hoch<sup>2)</sup></b> Verdünnter human Urin; Konservierungsstoffe	2 Flaschen 0.5 ml	B-M6S- CONSET	Gebrauchsfertig
<b>Antiserum</b> Kaninchen anti-6-SMT Ak in Puffermatrix; Konservierungsstoffe	1 Flasche 5.5 ml	B-M6S-AS	Gebrauchsfertig
<b>Biotin-Konjugat</b> 6-SMT-Biotin Konjugat in Puffermatrix; Konservierungsstoffe	1 Flasche 5.5 ml	B-M6S- BC	Gebrauchsfertig
<b>Enzym-Marker</b> Streptavidin-HRP in Protein basiertem Puffer; Konservierungsstoffe	1 Flasche 11 ml	B-M6S-EL	Gebrauchsfertig
<b>TMB-Substrat</b> Gepuffert Zitrat und mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1 Flasche 11 ml	B-TMB	Gebrauchsfertig
<b>Stopp-Lösung</b> 0.25 M Schwefelsäure	1 Flasche 11 ml	B-ST5	Gebrauchsfertig <b>reizend</b>

Table 3

<sup>1)</sup> Kalibrator A ist der Null Kalibrator und enthält kein 6-SMT (2 ml/Flasche). Die Kalibratoren B bis F enthalten tatsächlich 4, 10, 25, 62.5 und 200 pg/ml 6-SMT (0.5 ml/Flasche). Aufgrund der vorgeschlagenen 1:200 Verdünnung sind die Flaschen folgendermaßen angeschrieben: 0.8, 2.5, 12.5, und 40 ng/ml, d.h. die Proben Verdünnung ist in der Kalkulation bereits enthalten.

<sup>2)</sup> Die Kontrollen enthalten Lot-abhängige 6-SMT Konzentrationen. Siehe dazu das QC Datenblatt.

## LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Ungeöffnete Reagenzien	
Bei 2-8°C bis zu Verfallsdatum haltbar.	
Geöffnete / rekonstituierte Reagenzien	
Microtiter-Platte	Ungebrauchte Streifen in den Aluminiumbeutel zurücklegen und diesen wieder verschliessen. Bei 2-8°C für 2 Monate haltbar.
Wasch-Puffer	Bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum haltbar
Inkubations-Puffer	
Kalibratoren	
Kontrollen	
Antiserum	
Biotin-Konjugat	
Enzyme-Marker	
TMB Substrate	
Stopp-Lösung	Bei 18-28°C bis zum Verfallsdatum haltbar

Table 4

## VORSICHTSMASSAHMEN

### SICHERHEITSMASSNAHMEN

- Die Kalibratoren (B-M6S-CASET) und Kontrollen (B-M6S-CONSET) enthalten Komponenten menschlicher Herkunft. Obwohl sie negativ in Tests für HBV Oberflächenantigen, HCV und HIV1/2 Antikörper waren, sollten diese gemäss Good Laboratory Practice als potentiell infektiös behandelt werden, und die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden.
- Die Stop-Lösung (B-ST5) enthält Schwefelsäure. Diese reizt die Augen, die Haut und die Schleimhautmembranen. Berührung mit den Augen, der Haut und die Bekleidung vermeiden. Nach Berührung sofort mit viel Wasser spülen.
- Ungebrauchte Lösungen sollten gemäss der gesetzlichen Bestimmungen entsorgt werden.

### TECHNISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

- 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.
- Der konzentrierte Waschpuffer kann Salzkristalle enthalten. Stellen Sie sicher, dass sich diese Kristalle komplett aufgelöst haben, indem Sie den verdünnten Puffer bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer rühren.
- Wird ein automatischer Mikrotiterplatten-Wascher eingesetzt, soll der sogenannte „Platten-Modus“ gewählt werden. Das heisst, dass das Einfüllen des Waschpuffers erst über die gesamte Platte ausgeführt wird, bevor das Absaugen gestartet wird.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Mischen Sie nicht Reagenzien verschiedener Kit Lots.
- Vermeiden Sie unter allen Umständen, dass es zu einer Kontamination zwischen verschiedenen Reagenzien, Proben und zwischen den Wells kommt.
- Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden.
- Der konzentrierte Waschpuffer kann Salzkristalle enthalten. Stellen Sie sicher, dass sich diese Kristalle komplett aufgelöst haben, indem Sie den verdünnten Puffer bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer rühren. Rühren Sie die Lösung, bevor Sie sie in den Assay einsetzen.
- Das als Marker verwendete Enzym wird durch Sauerstoff inaktiviert und ist hoch sensitive gegenüber Natriumazid, Thimerosal, Hypochlorsäure und aromatischen Chorkohlen-Wasserstoffen, welche oft im Laborwasser auftreten. Deshalb sollte nur deionisiertes Qualitätswasser verwendet werden.

- Blank, Kalibratoren und Kontrollen müssen in Doppelbestimmungen durchgeführt werden. Für Patientenproben werden ebenfalls Duplikate empfohlen, aber viele Anwender ziehen Einzelbestimmungen vor. Mit diesem Vorgehen können bis zu 39 Proben in Duplikaten oder 78 Proben als Einzelbestimmungen pro Mikrotiterplatte getestet werden.
- Falls die Ausgangskonzentration einer unbekannt Probe grösser als der höchste Kalibrator ist, sollte die Probe stärker verdünnt und noch einmal getestet werden. Die zusätzliche Verdünnung muß bei der Berechnung des finalen Resultates berücksichtigt werden.
- Falls die Ausgangskonzentration einer unbekannt Probe kleiner als der tiefste Kalibrator ist, sollte diese Probe mit einem niedrigeren Faktor verdünnt (z.B. Faktor 20 anstelle von 200) und noch einmal getestet werden. Die niedrigere Verdünnung muß bei der Berechnung des finalen Resultates berücksichtigt werden.

## ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen für 5 µl, 50 µl, 100 µl und 1 ml.
- Polystyren oder Polypropylen Einwegröhrchen zur Vorbereitung der Verdünnungsproben.
- 1000 ml Zylinder zur Verdünnung des Waschpuffers.
- Mikrotiter-Platten-Waschgerät oder Spritzflasche für Waschpuffer.
- Saugfähiges Papier.
- Mikrotiter-Platten-Schüttler.
- Mikrotiter-Platten-Photometer; optischer Filter (450 nm).

## PROBENGEWINNUNG UND LAGERUNG

Für die Durchführung werden <10 µl Urin gebraucht. Urin sammeln, für eine Minute bei 10'000 x g oder für 5 Minuten bei 2000 x g zentrifugieren und Proben in ein Röhrchen geben. 6-SMT ist bei Raumtemperatur für mehrere Wochen stabil. Um ein mögliches Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern wird empfohlen die Urinproben bei ≤-20°C zu lagern. Die bei ≤-20°C gelagerten Proben sind für mindestens 18 Monate stabil. Mehrmaliges Auftauen/Einfrieren sollte vermieden werden. Aufgetaute Urinproben sollten durch starkes Vortexen vor dem Gebrauch gut gemischt werden.

## ARBEITSANLEITUNG

1. Die Urinproben werden 1:200 verdünnt (z.B. 5 µl Urin + 1 ml Inkubations-Puffer)
2. Eine Mikrotiter-Platte mit ausreichend Streifen für das Testen der gewünschten Kalibratoren, Kontrollen und Proben vorbereiten. Ungebrauchte Streifen vom Halter entfernen, wieder in die Alufolien-Verpackung einpacken und gekühlt lagern.
3. Mikroküvetten leeren und zweimal mit ≥300 µl Wasch-Puffer waschen. Platte durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.
- 4a. Je 100 µl Kalibrator A in die Küvetten A1+A2 geben (Blank).
- 4b. Je 50 µl Kalibrator A in die Küvetten B1+B2 geben (Null Kalibrator).  
Je 50 µl Kalibrator B in die Küvetten C1+C2 geben.  
Je 50 µl Kalibrator C in die Küvetten D1+D2 geben.  
Je 50 µl Kalibrator D in die Küvetten E1+E2 geben.  
Je 50 µl Kalibrator E in die Küvetten F1+F2 geben.  
Je 50 µl Kalibrator F in die Küvetten G1+G2 geben.  
Je 50 µl Kontrolle hoch in die Küvetten H1+H2 geben.  
Je 50 µl Kontrolle tief in die Küvetten A3+A4 geben.
- 4c. Je 50 µl der verdünnten Proben im Doppel in die darauffolgenden Küvetten geben.

5. Je 50 µl Biotin-Konjugat zu allen Küvetten geben.
6. Je 50 µl Antiserum zu allen Küvetten geben, **ausser zu den Blank Küvetten** (A1+A2). Mikrotiter-Platte mit der Abdeckfolie abdecken und für 60 Sekunden auf einen Mikrotiter-Platten-Schüttler bei 600 rpm stellen.
7. Für 3 Stunden (± 5 Min) bei 2-8°C inkubieren.
8. Abdeckfolie entfernen, die Mikroküvetten entleeren und je viermal mit ≥300 µl Wasch-Puffer waschen. Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.
9. Je 100 µl Enzym-Marker zu allen Küvetten geben.
10. Die Mikrotiter-Platte mit einer Abdeckfolie verschliessen und für 30±5 Minuten bei 2-8°C inkubieren.  
**Wichtig: TMB-Substrat muss auf 18-28°C erwärmt werden.**
11. Abdeckfolie entfernen, die Mikroküvetten entleeren und je viermal mit ≥300 µl Wasch-Puffer waschen. Platte durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.
12. Je 100 µl TMB Substrat zu jeder Küvette geben.
13. Die Mikrotiter-Platte mit einer Abdeckfolie verschliessen, die Platte auf einem Platten-Schüttler bei 600 rpm vor Licht geschützt für 30±2 Minuten bei 18-28°C inkubieren.
14. Je 100 µl Stopp-Lösung zu allen Küvetten geben und allfällige Luftbläschen mit einer Pipettenspitze entfernen.
15. Die Absorption in einem Mikrotiter-Platten-Photometer bei 450 nm messen.

## RESULTATE & STANDARDISIERUNG

**Eichkurve:** Optische Dichte aller mit Kalibrator oder Nullwert-Reagenz (NSB) gefüllten Mikroküvetten bei 450 nm messen. Zur Ermittlung der „korrigierten Absorptionsmittelwerte“ wird der Mittelwert aus den Doppelmessungen berechnet und der Mittelwert des Nullwert-Reagenzes (NSB) von demjenigen der Kalibratoren subtrahiert. Bindung (B) jedes Kalibratorpaares als Prozentsatz des Nullkalibrators (B<sub>0</sub>) berechnen, wobei die NSB-korrigierte Absorption des Nullkalibrators als 100% gesetzt wird:

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

Den Prozentsatz B/B<sub>0</sub> (Vertikalachse) gegen die 6-SMT Konzentration in ng/ml (Horizontalachse) auf semi-logarithmischem (lin/log) Papier auftragen. Optimale „best fitting curve“ (Eichkurve) zeichnen oder mit einem 4-Parameter Logistic (4-PL) oder einem ähnlichen Algorithmus berechnen.

**Proben und Kontrollen:** Optische Dichte der Proben und Kontrollen bei 450 nm messen. Zur Ermittlung der „Netto Absorptionsmittelwerte“ wird der Mittelwert aus den Doppelmessungen berechnet und der Mittelwert des Nullwert-Reagenzes von demjenigen der Proben und Kontrollen subtrahiert. Wie oben beschrieben, die Bindung jedes Probenpaares als Prozentsatz des Nullkalibrators (B<sub>0</sub>) berechnen, wobei die NSB-korrigierte Absorption des Nullkalibrators als 100% gesetzt wird. B/B<sub>0</sub> auf der Eichkurve auftragen und die entsprechende 6-SMT-Konzentration in ng/ml aus der Horizontalachse lesen.

Ein Beispiel für Ergebnisse und Eichkurve ist in Table 1 und Figure 1 dargestellt. *Diese Daten dienen nur der Illustration und sind nicht dazu bestimmt, die Ergebnisse eines anderen Testansatzes danach zu berechnen. Eine Eichkurve muss für jeden Probenansatz jeweils neu ermittelt werden.*

**Standardisierung:** Der NovoLytiX 6-Sulfatoxymelatonin-ELISA ist gegen einen zertifizierten Referenzstandard (Toronto Research Chemicals # S689050; CAS 2208-40-4) kalibriert, und seine korrekte Konzentration, die zur Herstellung der Kit-Kalibratoren verwendet wird, wird durch UV/VIS bestätigt:

$$\epsilon_{222} = 39'727 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ in H}_2\text{O}.$$

## 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.

Da keine 6-SMT-Urinkontrollen kommerziell erhältlich sind, empfehlen wir Urin-“Pools“ mit unterschiedlichen 6-SMT Konzentrationen für die interne Qualitätskontrolle zu verwenden. Die Reproduzierbarkeit der Eichkurvenparameter und der Kontrollwerte sollte innerhalb des vom Labor etablierten Erwartungsbereiches liegen. Die Vertrauensbereiche der Kontrollen sind Lot-spezifisch und sind auf dem QC-Datenblatt angegeben. Falls die Präzision des Testes nicht mit dem etablierten Erwartungsbereich übereinstimmt und wiederholte Messungen ein technisches Problem ausschliessen, sind folgende Bedingungen zu überprüfen: i) Pipettierung, Temperatur- und Zeitmessende Geräte, ii) Photometer Eichung, iii) Verfallsdaten der Reagenzien, iv) Lagerung- und Inkubations-Bedingungen, v) die TMB Substratlösung sollte farblos sein, vi) Wasserreinheit.

## EINSCHRÄNKUNGEN DER LEISTUNGSMERKMALE

Die Ergebnisse sollten in Verbindung mit der Anamnese des Patienten und weiteren diagnostischen Tests verwendet werden.

## LEISTUNGSMERKMALE

**Intra-Assay Präzision: 7.1%.** Die Intra-Assay Präzision wurde aus den Resultaten von 24 Wertepaaren von drei verschiedenen Urinproben, welche im gleichen Ansatz getestet wurden, berechnet. Die Resultate sind in Table 12 dargestellt.

**Inter-Assay Präzision: 11.9%.** Die Inter-Assay Präzision wurde aus 10 Wertepaaren aus 10 unterschiedlichen Testansätzen von 6 Urinproben mit unterschiedlichen 6-SMT Konzentrationen ermittelt. Die Resultate sind in Table 13 dargestellt.

**Verdünnungslinearität: 97.8%.** Drei humane Urinproben mit hohen 6-SMT Konzentrationen wurden mit Inkubations-Puffer sequenziell verdünnt und entsprechend der Arbeitsanleitung gemessen. Die Resultate sind in Table 14 dargestellt.

**Wiederfindung: 119%.** Drei humane Urinproben wurden mit aufsteigender Menge 6-SMT versetzt und anschliessend entsprechend der Arbeitsanleitung getestet. Die Resultate sind in Table 15 dargestellt.

**Nachweisgrenze (Limit of Blank, LoB): 0.14 ng/ml.** 24 Doppelwerte mit Kalibrator A (Null-Kalibrator) wurden in einem einzelnen gleichen Testansatz gemessen. Von den Absorptionswerten wurden Mittelwert und Standardabweichung (SD) berechnet. Die minimale nachweisbare Menge 6-SMT wurde durch die Subtraktion von zwei SD vom Mittelwert und durch Intersektion der im gleichen Ansatz erhaltenen Standardkurve ermittelt.

**Nachweisgrenze (Limit of Quantitation, LoQ): 1.5 ng/ml.** Die LoQ ist definiert als die minimale 6-SMT Konzentration im Urin, die mit einem Inter-Assay Variationskoeffizienten (CV) von <15% gemessen werden kann. Die LoQ wurde mit 7 unterschiedlichen Urinproben in 10 verschiedenen Ansätzen ermittelt und liegt mit einer Probenverdünnung von 1:200 bei 1.5 ng/ml.

**Spécificité:** Für den Kaninchen anti-6-SMT Antikörper wurden die in Table 16 dargestellten Kreuzreaktivitäten bei einer 50% Bindung ermittelt.

**Methoden Vergleich:** 42 Urinproben wurden mit dem NovoLytiX 6-Sulfatoxymelatonin-ELISA im Vergleich zu einem handelsüblichen Radioimmunoassay (RIA) zur Messung von 6-SMT analysiert. Der entsprechende RIA wird in der wissenschaftlichen Literatur häufig verwendet und zitiert (z. B. 9-11).

Die lineare Regressionsanalyse (

Figure 2) der erhaltenen Daten ergibt die folgende Statistik:

$$6\text{-SMT ELISA} = 0.75 \times \text{RIA} + 1.70 \text{ ng/ml}; R^2 = 0.984.$$

## UTILISATION

La trousse 6-Sulfatoxymélatonine ELISA permet la détermination directe et quantitative de la 6-sulfatoxymélatonine (6-SMT) dans les échantillons d'urine (1-7).

## PRINCIPE DU DOSAGE

L'ELISA 6-SMT est un immuno-essai compétitif utilisant la technique de capture (8). Un anticorps polyclonal spécifique à l'immunoglobuline de lapin est coatée sur la microplaque de titration fournie dans la trousse. Au cours des 3 premières heures d'incubation, la 6-SMT présente dans les échantillons d'urine pré-dilués, les contrôles et les calibrateurs prêts à l'emploi, sont en compétition avec la 6-SMT marquée à la biotine pour les sites de liaison de l'anticorps de lapin anti-6-SMT hautement spécifique, alors que les complexes formés (6-SMT-anticorps marqués à la biotine) sont capturés par le second anticorps coaté sur les puits de la microplaque. Après lavage, le marqueur enzymatique, la streptavidine conjuguée à la peroxydase de raifort (HRP), est ajouté et se lie au cours d'une seconde incubation de 30 minutes aux complexes 6-SMT-biotine-anticorps capturés sur la microplaque. Le marqueur enzymatique non lié est éliminé par une seconde étape de lavage et le substrat TMB (tétraméthylbenzidine) est ajouté aux puits. Au cours de la 3<sup>ème</sup> incubation de 30 minutes, un produit coloré se forme en proportion inverse à la quantité de 6-SMT présente à l'origine dans l'échantillon. La couleur passe du bleu au jaune après addition de la solution stop acide et la mesure de l'absorbance se fait à 450 nm.

## RÉACTIFS FOURNIS ET PRÉPARATION

Réactifs	Quantités	Code	Reconstitution
<b>Microplaque</b> Pré-coatée avec un Ac de chèvre anti-lapin	8x12 puits	B-M6S-MP	Laver 2x avant utilisation
<b>Adhésif pour microplaque</b>	3 pcs.		
<b>Concentré de tampon de lavage (10x)</b> Avec conservateurs	1 bouteille 100 ml	B-WB	Diluer avec 900 ml de l'eau déionisée
<b>Tampon d'incubation</b> Avec conservateurs	1 bouteille 100 ml	B-M6S-IB	Prêt à l'emploi
<b>Calibrateurs A à F<sup>1)</sup></b> 6-SMT (matrice tamponnée) Avec conservateurs	1 flacon 2 ml 5 flacons 0.5 ml	B-M6S-CASET	Prêt à l'emploi
<b>Contrôles faible/élevé<sup>2)</sup></b> Urine humaine diluée Avec conservateurs	2 flacons 0.5 ml	B-M6S-CONSET	Prêt à l'emploi
<b>Antisérum</b> lapin anti-6-SMT (matrice tamponnée) Avec conservateurs	1 flacon 5.5 ml	B-M6S-AS	Prêt à l'emploi (solution jaune)
<b>Conjugué Biotine</b> 6-SMT conjuguée à la biotine (matrice tamponnée) Avec conservateurs	1 flacon 5.5 ml	B-M6S-BC	Prêt à l'emploi (solution bleue)
<b>Marqueur enzymatique</b> Streptavidine-HRP (tampon protéiné) Avec conservateurs	1 flacon 11 ml	B-M6S-EL	Prêt à l'emploi (solution jaune)
<b>Substrat TMB</b> Dans un tampon citrate et avec H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1 flacon 11 ml	B-TMB	Prêt à l'emploi (incolore)
<b>Solution Stop</b> Acide sulfurique 0.25 M	1 flacon 11 ml	B-STC	Prêt à l'emploi <b>Réactif irritant</b>

Table 5

<sup>1)</sup> Le calibrateur A est le calibrateur zéro et ne contient pas de 6-SMT (2 ml/flacon). Les calibrateurs B, C, D, E et F contiennent respectivement 4, 10, 25, 62.5 et 200 pg/ml de 6-SMT (0.5 ml/flacon). Comme il est recommandé de procéder à des dilutions au 1:200ème, les calibrateurs sont étiquetés de la façon suivante: 0.8, 2, 5, 12.5 et 40 ng/ml, respectivement. De cette façon, le facteur de dilution est d'ores et déjà pris en considération pour le calcul final des concentrations.

<sup>2)</sup> Les contrôles présentent des concentrations de 6-SMT spécifiques à chaque lot. Veuillez vous reporter aux données de QC pour les valeurs exactes.

## CONSERVATION ET PEREMPTION DES REACTIFS

Réactifs fermés/non entamés	
Tous les réactifs fermés sont stables à 2-8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur chaque étiquette.	
Réactifs ouverts/reconstitués	
Microplaque	Remettre les barrettes non utilisées dans la pochette. Refermer la pochette au moyen du zip et la placer au réfrigérateur. Elle se conserve durant 2 mois à 2-8°C.
Tampon de lavage	Conserver à 2-8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette des flacons.
Tampon d'incubation	
Calibrateurs	
Contrôles	
Antisérum	
Conjugué Biotine	
Marqueur enzymatique	
Solution Substrat	
Solution Stop	Conserver à 18-28°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette.

Table 6

## PRECAUTIONS

### PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ

- Les calibrateurs (B-M6S-CASET) et les contrôles (B-M6S-CONSET) de cette trousse contiennent des composants d'origine humaine. Bien que les tests de détection de l'antigène de surface du VHB et des anticorps des virus VHC et VIH1/2 se soient révélés négatifs, il convient de considérer les réactifs comme capables de transmettre des maladies infectieuses, et de les manipuler conformément aux bonnes pratiques de laboratoire, en prenant les précautions appropriées.
- La Solution stop (B-STs) contient de l'acide sulfurique. Elle irrite les yeux, la peau ainsi que les muqueuses. Éviter tout contact avec les yeux, la peau et les habits. En cas de contact accidentel avec les yeux ou la peau, il faut impérativement rincer à grande eau.
- Pour en savoir plus sur les précautions pour la manipulation et l'élimination des réactifs du kit, nous vous recommandons fortement de consulter l'organisme réglementaire compétent pour votre pays.

### PRÉCAUTIONS TECHNIQUES

- Lire attentivement les instructions avant de réaliser le test. Test ne donnera pas les résultats escomptés en cas de dilution incorrecte ou de modification des réactifs, ou de stockage dans des conditions autres que celles détaillées dans le présent mode d'emploi.
- Il est possible que le tampon de lavage contienne des cristaux de sel. Veuillez-vous assurer de la dissolution complète de ces cristaux par agitation de la solution diluée à température ambiante. Agiter la solution à température ambiante avant l'utilisation.
- Pour les laveurs des microplaques automatiques, utilisez le mode "plate mode" i.e. chaque étape du processus (distribution ou "dispense") est réalisée séquentiellement pour toutes les barrettes, avant de procéder à l'étape suivante du processus (aspiration).
- Les composants ne doivent pas être utilisés au-delà de la date d'expiration imprimée sur les étiquettes.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- Il convient de prendre toutes les précautions requises pour empêcher toute contamination croisée entre réactifs, entre échantillons ou entre puits.
- L'enzyme (HRP) utilisé comme marqueur est inactivé par l'oxygène et est hautement sensible à l'azote de sodium, au thimerosal, à l'acide hypochlorique, ainsi qu'aux hydrocarbures chlorés fréquemment présents dans l'eau

utilisée en laboratoire. N'utiliser par conséquent que de l'eau déionisée ou distillée de bonne qualité.

- Les blancs, les calibrateurs et les contrôles doivent être réalisés en double. Pour les échantillons de patients, les duplicatas sont également recommandés, mais de nombreux utilisateurs préfèrent les déterminations individuelles. Cette procédure permet de tester jusqu'à 39 échantillons en double ou 78 échantillons en simple par microplaque.
- Si la concentration initiale d'un échantillon présente un signal plus élevé que le calibrateur le plus haut, l'échantillon doit être dilué à l'aide de tampon d'incubation et dosé à nouveau selon la procédure standard. Le facteur de dilution doit être pris en compte lors du calcul de la concentration de 6-SMT finale.
- Si la concentration initiale d'un échantillon est inférieure à celle du calibrateur le plus bas, il convient de moins diluer l'échantillon avec le tampon d'incubation (ex : en utilisant un facteur de dilution de 20 au lieu de 200) puis en analysant l'échantillon ainsi dilué, une nouvelle fois, d'après la procédure standard. Il convient de tenir compte du changement de facteur de dilution lors de l'expression finale du résultat.

### MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

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

### PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS ET CONSERVATION

La procédure nécessite <10 µl d'urine. Collecter l'urine, centrifuger durant 1 minute à 10'000 x g ou 5 minutes à 2000 x g puis transférer des aliquots dans de nouveaux micro-tubes. La 6-SMT urinaire est stable durant plusieurs semaines à température ambiante. Cependant en raison de la croissance potentielle de micro-organismes, nous recommandons de conserver les échantillons à une température ≤-20°C. Les échantillons peuvent être conservés ainsi pendant au moins 18 mois. Il convient d'éviter les cycles répétés de congélation/décongélation. Les échantillons congelés doivent être décongelés et bien mélangés (vortex) avant d'être pipetés.

### PROCEDURE

1. Diluer tous les échantillons urinaires de patients au 1:200 avec du tampon d'incubation (ex: 5 µl d'urine + 1 ml de tampon d'incubation).
2. Préparer une microplaque avec suffisamment de barrettes pour pouvoir analyser tous les calibrateurs, contrôles et échantillons prévus. Remettre l'excédent de barrettes dans la pochette prévue à cet effet. Conserver au réfrigérateur.
3. Vider les puits et laver 2 fois avec au moins 300 µl de tampon de lavage / puits. Vider les puits et taper la microplaque fermement sur du papier absorbant.
- 4a. Pipeter 100 µl de calibrateur A en double dans les puits A1+A2 (blancs).



- 4b. Pipeter 50 µl de calibrateur A (calibrateur zéro) en double dans les puits B1+B2.  
Pipeter 50 µl de calibrateur B en double dans les puits C1+C2.  
Pipeter 50 µl de calibrateur C en double dans les puits D1+D2.  
Pipeter 50 µl de calibrateur D en double dans les puits E1+E2.  
Pipeter 50 µl de calibrateur E en double dans les puits F1+F2.  
Pipeter 50 µl de calibrateur F en double dans les puits G1+G2.  
Pipeter 50 µl de contrôle bas en double dans les puits H1+H2.  
Pipeter 50 µl de contrôle élevé en double dans les puits A3+A4.
- 4c. Pipeter 50 µl de chaque échantillon urinaire dilué en double dans les puits suivants.
5. Ajouter 50 µl de conjugué biotine (solution bleue) à tous les puits.
6. Ajouter 50 µl d'antisérum (solution jaune) à tous les puits, **à l'exception des blancs** (puits A1+A2). Couvrir la microplaque avec un adhésif et la placer sur le mélangeur durant 60 secondes à 600 rpm.
7. Incuber durant 3 h (± 5 min) à 2-8°C.
8. Enlever et jeter l'adhésif. Vider les puits et laver 4 fois avec au moins 300 µl de tampon de lavage / puits. Vider les puits et taper fermement la microplaque sur du papier absorbant.
9. Ajouter 100 µl de marqueur enzymatique (solution jaune) à tous les puits.
10. Couvrir la microplaque avec un adhésif et incuber durant 30 minutes (± 5 min) à 2-8°C.  
**Important: veiller à ce que le substrat TMB soit à température ambiante 18-28°C.**
11. Enlever et jeter l'adhésif. Vider les puits et laver 4 fois avec au moins 300 µl de tampon de lavage / puits. Vider les puits et taper fermement la microplaque sur du papier absorbant.
12. Ajouter 100 µl de substrat TMB à chaque puits.
13. Couvrir la microplaque avec un adhésif et la placer sur un mélangeur programmé à 600 rpm, en veillant à ce qu'elle soit protégée de la lumière directe et durant 30 minutes (± 2 min) à 18-28°C.
14. Ajouter 100 µl de solution Stop à tous les puits. Enlever toutes les bulles d'air au moyen d'une pointe de pipette. Passer à l'étape 15 dans les 30 minutes.
15. Mesurer l'absorbance à 450 nm au moyen d'un lecteur de microplaque.

## RESULTATS & STANDARDISATION

Courbe d'étalonnage : Mesurer l'absorbance à 450 nm des puits contenant les calibrateurs et le réactif blanc (NSB). Calculer la moyenne des deux valeurs d'absorbance obtenues, soustraire la moyenne des blancs (NSB) et enregistrer les valeurs d'absorption moyenne nette. Calculer la liaison (B) en pourcentage du calibrateur zéro (B<sub>0</sub>) pour chaque paire de calibrateur en fixant l'absorbance NSB-corrigée du calibrateur zéro à 100%:

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

Reporter le pourcentage de liaison (axe vertical) contre la concentration de M6S en ng/ml (axe horizontal) sur un papier millimétré (lin/log).

Tracer la courbe d'étalonnage ou la calculer au moyen d'un algorithme de régression à 4 paramètres logistique (4-PL) ou un algorithme similaire.

**Echantillons et contrôles:** Mesurer l'absorbance à 450 nm de chaque échantillon. Calculer la moyenne des deux valeurs obtenues, soustraire la moyenne des blancs et enregistrer les valeurs d'absorption moyenne nette. Calculer le pourcentage de liaison par rapport au calibrateur zéro (B<sub>0</sub>) comme décrit plus haut, en fixant l'absorbance NSB-corrigée du calibrateur zéro à 100%.

Reporter le rapport B/B<sub>0</sub> sur la courbe d'étalonnage et lire la concentration de M6S correspondante (en ng/ml) sur l'axe horizontal.

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

**Standardisation:** La trousse NovoLytiX 6-Sulfatoxymélatonine ELISA est étalonné par rapport à un étalon de référence certifié (Toronto Research Chemicals # S689050 ; CAS 2208-40-4) et sa concentration correcte, utilisée pour la préparation des calibrateurs du kit, est confirmée par UV/VIS:

$$\epsilon_{222} = 39\,727 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ in H}_2\text{O}.$$

## CONTROLE DE QUALITE

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

Comme il n'existe pas de contrôles urinaires 6-SMT commercialement disponibles, nous recommandons d'utiliser des pools urinaires présentant différents taux de 6-SMT. Tous les contrôles doivent avoir une valeur comprise entre les limites de confiance établies. Les limites de confiance des contrôles sont spécifiques à chaque lot et sont indiquées sur la feuille de QC contenue dans chaque trousse.

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

## LIMITATIONS

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

**Précision Intra-essai (Within-Run) : 7.1%.** Elle a été calculée à partir des résultats de 24 paires de valeurs de 3 échantillons d'urine présentant des concentrations différentes de 6-SMT au cours d'un même essai. Les résultats sont présentés en Table 12.

**Précision Inter-essai (Run-to-Run): 11.9%.** Elle a été calculée à partir des résultats de 10 paires de valeurs de 6 échantillons d'urine présentant des concentrations différentes de 6-SMT au cours de 10 essais différents. Les résultats sont présentés en Table 13.

**Linéarité de la dilution/Parallélisme: 97.8%.** 3 échantillons d'urine présentant des concentrations élevées de 6-SMT furent

dilués en série avec du tampon d'incubation puis analysés d'après la procédure standard. Les résultats sont présentés en Table 14.

**Test de récupération: 119%.** A 3 échantillons d'urine humaine furent ajoutées des concentrations croissantes de 6-SMT avant d'être analysés d'après la procédure standard. Les résultats sont présentés en Table 15.

**Limite de blanc (LoB) : 0.14 ng/ml.** 24 doubles du calibrateur A (calibrateur Zero) furent analysés au cours d'un même essai. La moyenne et la déviation standard furent calculées à partir des absorbances lues. La plus petite concentration de 6-SMT détectable est par cette méthode de calcul de 0.14 ng/ml en retranchant 2 déviations standard à la moyenne des mesures et en reportant cette valeur sur la courbe standard générée au cours du même essai.

**Limite de quantification (LoQ): 1.5 ng/ml.** Le limite de quantification pour ce dosage est la plus petite concentration de 6-SMT dans l'urine pouvant être mesurée avec un coefficient de variation inter-essai (C.V.) inférieur à 15%. Elle a été définie à partir de 7 échantillons d'urine différents mesurés en double au cours de 10 essais différents. Elle est de 1.5 ng/ml (avec une dilution au 1:200).

**Spécificité:** Les réactions croisées de l'anticorps de lapin anti-6-SMT ont été déterminées à 50 % de liaison. Les résultats sont présentés en Table 16.

**Comparaison de méthodes:** 42 échantillons d'urine ont été analysés à l'aide de la trousse NovoLytiX 6-sulfatoxymélatonine ELISA en comparaison avec un test radio-immunologique (RIA) disponible dans le commerce pour mesurer la 6-SMT. Le RIA correspondant est souvent utilisé et cité dans la littérature scientifique (par ex. 9-11). L'analyse de régression linéaire obtenue est la suivante (

Figure 2) :

$$6\text{-SMT ELISA} = 0.75 \times \text{RIA} + 1.70 \text{ ng/ml}; R^2 = 0.984.$$

## ITALIANO

### USO

Il kit 6-Sulfatoximelatonina ELISA fornisce materiali per la determinazione diretta e quantitativa della 6-sulfatoximelatonina (6-SMT) nell'urina (1-7).

### PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il dosaggio 6-SMT ELISA è un immunodosaggio competitivo che utilizza un anticorpo a cattura (8). Un anticorpo policlonale specifico per l'immunoglobulina di coniglio è stato coattato sulla micropiastra fornita con il kit. Durante le prime 3 ore di incubazione, rispettivamente il 6-SMT presente nei campioni di urina pre-diluata, i Controlli ed i Calibratori pronti all'uso, competono con il 6-SMT biotinilato per i siti di legame di un anticorpo di coniglio anti-6-SMT altamente specifico, mentre i complessi formati (biotinilati) di anticorpo 6-SMT sono catturati da un secondo anticorpo coattato ai pozzetti. Dopo il lavaggio, viene aggiunto il Marcato Enzimatico, streptavidina coniugata con 10er ossidasi di rafano (HRP) che si lega, durante una seconda incubazione da 30 minuti con i complessi anticorpo 6-SMT-biotina catturati sui pozzetti coattati. Il Marcato Enzimatico Non Legato viene quindi rimosso attraverso un secondo lavaggio e viene aggiunto ai pozzetti il substrato TMB (tetrametilbenzidina). In una terza incubazione da 30 minuti, si forma un prodotto colorato in proporzione inversa rispetto al quantitativo di 6-SMT originariamente presente nel campione. Il colore cambia da blu a giallo dopo l'aggiunta di Soluzione Bloccante acida e può essere misurato a 450 nm.

### REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
<b>Micropiastra</b> Precoattata con Ig di capra anti-coniglio	pozzetti 8x12	B-M6S-MP	Lavare 2x prima dell'utilizzo
<b>Foglio Sigillante</b>	3 pezzi		
<b>Tampone di Lavaggio Concentrato (10x)</b> con conservanti	1 flacone 100 ml	B-WB	Diluire con 900 ml di acqua deionizzata
<b>Tampone di Incubazione</b> Con conservanti	1 flacone 100 ml	B-M6S-IB	Pronto all'uso
<b>Calibratori A – F<sup>1)</sup></b> 6-SMT in una matrice tampone con conservanti	1 flacone 2 ml 5 flaconi 0.5 ml	B-M6S-CASET	Pronto all'uso
<b>Controllo Basso/ Alto<sup>2)</sup></b> Siero umano diluito con conservanti	2 flaconi 0.5 ml	B-M6S-CONSET	Pronto all'uso
<b>Antisiero</b> anti-6-SMT di coniglio in una matrice tampone con conservanti	1 flacone 5.5 ml	B-M6S-AS	Pronto all'uso (soluzione gialla)
<b>Coniugato Biotina</b> 6-SMT di coniugato alla biotina in una matrice tampone con conservanti	1 flacone 5.5 ml	B-M6S-BC	Pronto all'uso (soluzione blu)
<b>Marcato Enzimatico</b> Streptavidina-HRP in un tampone a base proteica con conservanti	1 flacone 11 ml	B-M6S-EL	Pronto all'uso (soluzione gialla)
<b>Substrato TMB</b> Tampone citrato con perossido di idrogeno	1 flacone 11 ml	B-TMB	Pronto all'uso (incolore)
<b>Soluzione Bloccante</b> 0.25 M di acido solforico	1 flacone 11 ml	B-ST5	Pronto all'uso agente irritante

Table 7

<sup>1)</sup> Il Calibratore A è il Calibratore Zero e non contiene 6-SMT (2 ml/flacone). I calibratori B, C, D, E ed F contengono effettivamente 4, 10, 25, 62.5 e 200 pg/ml di 6-SMT (0.5 ml/flacone). Poiché la diluizione consigliata per i campioni di urina è 1:200, i calibratori B,C,D,E ed F sono etichettati come segue: rispettivamente 0.8, 2, 5, 12.5 e 40 ng/ml. In questo modo, la diluizione dei campioni è già stata presa in considerazione per i calcoli finali.

<sup>2)</sup> I Controlli contengono quantitativi lotto specifici di 6-SMT. Fare riferimento ai dati contenuti nel foglio di QC per le concentrazioni esatte.

## CONSERVAZIONE ED EMIVITA DEI REAGENTI

Reagenti non aperti	
Tutti i componenti non aperti sono stabili a 2-8°C fino alla data di scadenza stampata sulle etichette.	
Reagenti Aperti / Ricostituiti	
Micropiastra	Riporre le strip non utilizzate nella busta di alluminio e risigillarle. Conservarle fino a 2 mesi a 2-8°C.
Tampone di Lavaggio	Conservare a 2-8°C fino alla data di scadenza stampata sulle etichette.
Tampone di Incubazione	
Calibratori	
Controlli	
Antisiero	
Coniugato Biotina	
Marcato Enzimatico	
Soluzione di Substrato	Conservare a 18-28°C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta
Soluzione Bloccante	

Table 8

## PRECAUZIONI

### PRECAUZIONI DI SICUREZZA

- I calibratori (B-M6S-CASET) ed i controlli (B-M6S-CONSET) di questo kit 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.
- La Soluzione Bloccante (B-STs) contiene acido solforico. Il questo reagente è irritante per gli occhi, la pelle e le mucose. Evitare il contatto con gli occhi, la pelle ed il vestiario. Se viene a contatto con gli occhi, la pelle e gli indumenti lavarsi immediatamente con molta acqua.
- In merito alle precauzioni adeguate per lo smaltimento di reagenti del kit, consigliamo vivamente di consultare prima le normative locali speciali del proprio paese.

### PRECAUZIONI TECNICHE

- 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.
- Residui rimasti nei pozzetti sono causati dal processo di produzione. Questi residui vengono completamente eliminati dai lavaggi durante la procedura descritta e non compromettono in alcun modo i risultati. (fare riferimento al punto 3 delle istruzioni per l'uso).
- Il tampone di lavaggio concentrato può contenere dei cristalli di sale. Si prega di accertarsi che questi cristalli siano completamente dissolti dopo la diluizione mescolando il tampone a temperatura ambiente (agitatore magnetico). Mescolare il tampone a temperatura ambiente prima di uso.
- Punto 3, 6, 9: Dopo l'ultimo ciclo di lavaggio delle strip, assicurarsi che i pozzetti siano completamente vuoti.
- Punto 10: Assicurarsi prima dell'uso che il substrato TMB raggiunga 18-28°C.
- Punto 12: Assicurarsi una buona agitazione della micropiastra durante l'incubazione con il Substrato TMB bene. A seconda del tipo di agitatore è consigliata una velocità di 400-600 rpm. La micropiastra deve essere agitata efficacemente, ma facendo in modo di evitare la fuoriuscita di liquido.
- Usando dispositivi automatici per lavaggio/ aspirazione della micropiastra, consiglia l'utilizzo della modalità: "plate mode"; dispensazione sequenziale in tutte le strip e successiva aspirazione.
- I componenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza riportata sulle etichette.
- Non miscelare reagenti appartenenti a lotti diversi.

- Fare ogni tentativo per assicurarsi che tra i reagenti, i campioni o tra i pozzetti non vi siano contaminazioni incrociate.
- I micropozzetti non possono essere riutilizzati.
- L'enzima utilizzato come marcato è inattivato attraverso l'ossigeno ed è altamente sensibile alla sodio azide, al thimerosal, all'acido ipocloroso ed al cloridrocarbonio aromatico che spesso si trovano nell'acqua che afferrisce ai laboratori. Quindi, utilizzare solo acqua deionizzata di elevata qualità.
- I blank, i calibratori e i controlli devono essere eseguiti in duplicato. I duplicati sono consigliati anche per i campioni dei pazienti, ma molti utenti preferiscono le determinazioni singole. Con questa procedura è possibile analizzare fino a 39 campioni in duplicato o 78 campioni come determinazioni singole per micropiastra.
- Se la concentrazione iniziale di un campione è superiore al calibratore più elevato, il campione deve essere ulteriormente diluito con il Tampone di Incubazione e dosato ancora. Quando viene calcolata la concentrazione reale del 6-SMT presente nel campione occorre considerare un'ulteriore diluizione.
- Se la concentrazione iniziale di un campione è inferiore al calibratore più basso, il campione deve essere diluito meno con il Tampone di Incubazione (e.g. con un fattore di 20 invece che 200) e dosato ancora secondo procedura. Occorre calcolare un fattore di diluizione più basso nel calcolo della concentrazione reale del 6-SMT presente nel campione non noto.

## MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Pipette di precisione con puntali monouso per: 5 µl, 50 µl, 100 µl e 1 ml.
- Provette monouso di polistirene o polipropilene, per la preparazione delle diluizioni dei campioni.
- Cilindro 1000 ml per la diluizione del Tampone di Lavaggio Concentrato.
- Lavatore per micropiastra o erogatore a spruzzo per il Tampone di Lavaggio.
- Carta blottante
- Frigorifero.
- Rotatore per micropiastra
- Lettore per micropiastra per la misurazione dell'assorbanza a 450 nm.

## RACCOLTA DEL CAMPIONE E CONSERVAZIONE

La procedura richiede <10 µl di urina. Raccogliere l'urina, centrifugare per 1 minuto a 10,000 x g o 5 minuti a 2000 x g e trasferire le aliquote in micro-provette pulite. L' 6-SMT urinario è stabile per diverse settimane anche a temperatura ambiente. Tuttavia, a causa di una potenziale crescita microbica, si consiglia di conservare i campioni di urina a ≤-20°C. I campioni sono stabili per >18 mesi se conservati a ≤-20°C. Evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento. I campioni congelati devono essere scongelati e mescolati completamente vortexandoli prima dell'utilizzo.

## PROCEDURA DEL DOSAGGIO

1. Diluire tutti i campioni urinari 1:200 con il Tampone di Incubazione (e.g. 5 µl di urina + 1 ml di Tampone di Incubazione).
2. Preparare una piastra con strip sufficienti per testare il numero desiderato di Calibratori, Controlli e campioni. Eliminare le strip in eccesso dal supporto e risigillarle nella busta di alluminio. Conservarle refrigerate.
3. Svotare i pozzetti e lavarli due volte utilizzando almeno 300 µl di Tampone di Lavaggio per pozzetto. Svotare i

- pozzetti e scuotere energicamente la piastra su carta blottante.
4. Dispensare 100 µl di Calibratore A in duplicato nei pozzetti A1+A2 (pozzetti Bianchi).
  - 4b. Dispensare 50 µl del Calibratore A (Standard Zero) in duplicato nei pozzetti B1+B2.  
Dispensare 50 µl del Calibratore B in duplicato nei pozzetti C1+C2.  
Dispensare 50 µl del Calibratore C in duplicato nei pozzetti D1+D2.  
Dispensare 50 µl del Calibratore D in duplicato nei pozzetti E1+E2.  
Dispensare 50 µl del Calibratore E in duplicato nei pozzetti F1+F2.  
Dispensare 50 µl del Calibratore F in duplicato nei pozzetti G1+G2.  
Dispensare 50 µl del Controllo Basso in duplicato nei pozzetti H1+H2.  
Dispensare 50 µl del Controllo Alto in duplicato nei pozzetti A3+A4.
  - 4c. Dispensare 50 µl di ciascun campione diluito in duplicato nei pozzetti successivi.
  5. Aggiungere 50 µl di Coniugato Biotina (soluzione blu) a tutti i pozzetti.
  6. Aggiungere 50 µl di Antisiero (soluzione gialla) a tutti i pozzetti, **eccetto i pozzetti Bianchi** (pozzetti A1+A2). Coprire la piastra con un foglio sigillante e collocarla per 60 secondi su di un mixer settato a 600 rpm.
  7. Incubare per 3 ore (± 5 min) a 2-8°C.
  8. Togliere ed eliminare il Foglio che sigilla la Piastra. Svuotare i pozzetti e lavarli quattro volte utilizzando almeno 300 µl di Tampone di Lavaggio per pozzetto. Svuotare i pozzetti e scuotere energicamente la piastra su carta blottante.
  9. Aggiungere 100 µl di Marcato Enzimatico (soluzione gialla) a tutti i pozzetti.
  10. Coprire la piastra con un Foglio Sigillante ed incubarla per 30 minuti (± 5 min) a 2-8°C.  
**Importante: Fare in modo che la soluzione substrato TMB raggiunga 18-28°C.**
  11. Togliere ed eliminare il Foglio Sigillante. Svuotare i pozzetti e lavarli quattro volte utilizzando almeno 300 µl di Tampone di Lavaggio per pozzetto. Svuotare i pozzetti e scuotere energicamente la piastra su carta blottante.
  12. Aggiungere 100 µl di Soluzione di Substrato TMB ad ogni pozzetto.
  13. Coprire la piastra con un Foglio Sigillante, collocare la piastra su un mixer settato a 600 rpm, proteggere la piastra dalla luce diretta ed incubare per 30 minuti (± 2 min) a 18-28°C.
  14. Aggiungere 100 µl di Soluzione Bloccante a tutti i pozzetti. Eliminare le bolle d'aria con una pipetta. Procedere al punto 15 entro 30 minuti.
  15. Leggere l'assorbanza a 450 nm in un lettore di micropiastra.

## RISULTATI & STANDARDIZZAZIONE

**Curva Standard:** Annotare l'assorbanza a 450 nm per ciascun calibratore e pozzetto bianco (NSB). Calcolare la media dei valori in duplicato, sottrarre la media dei pozzetti bianchi (NSB) ed annotare le medie (=assorbanza media corretta). Calcolare il legame (B) di ciascuna coppia di pozzetti dei calibratori come percentuale del Calibratore Zero (B<sub>0</sub>), con l'assorbanza corretta con NSB del Calibratore Zero preso al 100%:

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

Tracciare il legame percentuale (asse verticale) verso la concentrazione di M6S in ng/ml (asse orizzontale) utilizzando carta per grafici lin/log. Disegnare la curva migliore o calcolare la curva standard utilizzando un algoritmo a quattro parametri logistic (4-PL) o di un algoritmo analogo.

**Campioni e Controlli:** Annotare l'assorbanza a 450 nm per ciascun pozzetto dei campioni. Calcolare la media dei valori in duplicato, sottrarre la media dei pozzetti bianchi ed annotare le medie (=assorbanza media corretta). Calcolare, come più sopra descritto, il legame di ciascuna coppia di pozzetti dei campioni come percentuale del Calibratore Zero (B<sub>0</sub>), con l'assorbanza corretta con NSB del Calibratore Zero al 100%. Collocare il valore B/B<sub>0</sub> dei campioni sull'asse verticale, tracciare una linea orizzontale che interseca la curva standard e leggere la concentrazione M6S (ng/ml) dall'asse orizzontale.

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

**Standardizzazione:** Il kit NovoLytiX 6-Sulfatoxymelatonin ELISA è calibrato rispetto a uno standard di riferimento certificato (Toronto Research Chemicals # S689050; CAS 2208-40-4) e la sua corretta concentrazione, utilizzata per preparare i calibratori del kit, è confermata da UV/VIS:

$$\epsilon_{222} = 39'727 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ nel H}_2\text{O}.$$

## CONTROLLO DI QUALITÀ

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

Poiché non ci sono controlli disponibili in commercio per il 6-SMT urinario, consigliamo di utilizzare pool di urina contenente livelli diversi di 6-SMT per i controlli qualità interni. La riproducibilità dei parametri della curva standard ed i valori dei controlli devono essere entro limiti di accettabilità stabiliti dal laboratorio. I limiti di confidenza per i Controlli sono lotto-specifici e stampati sul Foglio Dati del CQ 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) Lettori ELISA iii) date di scadenza dei reagenti iv) condizioni di conservazione e di incubazione v) La Soluzione del Substrato TMB deve essere incolore; vi) purezza dell'acqua.

## LIMITI DELLE PRESTAZIONI

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

## CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

**Precisione Intra-Dosaggio (All'interno della seduta): 7.1%.** La precisione intra-dosaggio è stata calcolata dai risultati di 24 coppie di valori ottenuti in un'unica seduta da tre campioni di urina con differenti quantitativi di 6-SMT. I risultati sono presentati in Table 12.

**Precisione Inter-Dosaggio (Da seduta a seduta): 11.9%.** Da 6 campioni di urina con quantitativi diversi di 6-SMT la precisione inter-dosaggio è stata calcolata dai risultati di 10 coppie di valori ottenuti in 10 sedute diverse. I risultati sono presentati in Table 13.

**USO PREVISTO**

El Kit ELISA 6-Sulfatoximelatonina proporciona materiales para la determinación directa y cuantitativa de 6-sulfatoximelatonina (6-SMT) en orina (1-7).

**PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO**

El ELISA 6-SMT es un inmunoanálisis competitivo que utiliza una técnica de captura de anticuerpos (8). Un anticuerpo policlonal específico para inmunoglobulina de conejo recubre la placa de microtitulación suministrada con el kit. Durante las primeras 3 horas de incubación, la 6-SMT presente en las muestras prediluidas de orina, los controles y los calibradores listos para su uso, compete con 6-SMT ligada a biotina por los sitios de unión de un anticuerpo anti-6-SMT de conejo altamente específico, mientras los complejos anticuerpo-6-SMT (ligada a biotina) formados son capturados por el segundo anticuerpo que recubre los pocillos. Después del lavado, se añade el marcador de enzima, estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP), el cual se une durante un segundo paso de incubación de 30 minutos a los complejos anticuerpo-6-SMT-biotina capturados en los pocillos recubiertos. Después se elimina el marcador de enzima sin unir con un segundo paso de lavado y se añade el sustrato de TMB (tetrametilbenzidina) a los pocillos. En un tercer paso de incubación de 30 minutos se forma un producto coloreado en proporción inversa a la cantidad de 6-SMT presente originalmente en la muestra. El color vira de azul a amarillo con la adición de una solución de interrupción ácida y puede medirse a 450 nm.

**REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN**

Reactivos	Cantidades	Código	Reconstitución
<b>Placa de microtitulación</b> recubierta con Ac de cabra anti-Ig de conejo	8x12 pocillos	B-M6S-MP	Lavar dos veces antes de usar
<b>Sellador de placas</b>	3 uds.		
<b>Tampón de lavado concentrado (10x)</b> con conservantes	1 botella 100 ml	B-WB	Diluir con 900 ml de agua desionizada
Tampón de incubación con conservantes	1 botella 100 ml	B-M6S-IB	Listo para usar
<b>Calibradores A a F<sup>1)</sup></b> 6-SMT en una matriz de tampón con conservantes	1 vial 2 ml 5 viales 0,5 ml	B-M6S-CASET	Listo para usar
<b>Controles Bajo / Alto<sup>2)</sup></b> Orina humana diluida con conservantes	2 viales 0,5 ml	B-M6S-CONSET	Listo para usar
<b>Antisuero</b> Anti-6-SMT de conejo en una matriz de tampón con conservantes	1 vial 5,5 ml	B-M6S-AS	Listo para usar (solución amarilla)
<b>Conjugado de biotina</b> 6-SMT conjugada con biotina en una matriz de tampón con conservantes	1 vial 5,5 ml	B-M6S-BC	Listo para usar (solución azul)
<b>Marcador de enzima</b> estreptavidina conjugada con HRP en un tampón de proteínas con conservantes	1 vial 11 ml	B-M6S-EL	Listo para usar (solución amarilla)
<b>Sustrato TMB</b> citrato tamponado con peróxido de hidrógeno	1 vial 11 ml	B-TMB	Listo para usar (incolore)
<b>Solución de interrupción</b> Ácido sulfúrico 0,25 M	1 vial 11 ml	B-ST5	Listo para usar <b>Agente irritante</b>

Tabla 9

<sup>1)</sup> El Calibrador A es el Calibrador Cero y no contiene 6-SMT (2 ml/vial). Los Calibradores B, C, D, E y F contienen efectivamente 4, 10, 25, 62,5 y 200 pg/ml de 6-SMT, respectivamente (0,5 ml/vial). Como la dilución recomendada para muestras de orina es 1 a 200, los Calibradores B, C, D, E y F se etiquetan como sigue: 0,8, 2, 5, 12,5 y 40 ng/ml, respectivamente. De esta manera, la dilución de la muestra ya se tiene en cuenta en los cálculos finales.

**Linealidad de Diluición/Paralelismo: 97.8%.** Tre campioni di urina con quantitativi elevati di 6-SMT sono stati diluiti sequenzialmente con Tampone di Incubazione e dosati secondo procedura. I Risultati sono presentati in Table 14.

**Recupero: 119%.** Tre campioni di urina umana sono stati diluiti con quantitativi crescenti di 6-SMT e dosati secondo procedura. I risultati sono presentati in Table 15.

**Limite del Bianco (LoB): 0.14 ng/ml.** 24 duplicati di Calibratore A (Calibratore di Zero) sono stati dosati in un'unica seduta. La media e la deviazione standard sono state calcolate dai valori di assorbanza. La dose minima rilevabile di 6-SMT è stata calcolata in 0.14 ng/ml sottraendo due deviazioni standard all'assorbanza media del Calibratore di Zero ed intersecando questo valore con la curva standard ottenuta nella stessa seduta.

**Limite de quantificazione (LoQ): 1.5 ng/ml.** Il limite de quantificazione è la concentrazione minima di 6-SMT nell'urina che può essere misurata con un coefficiente di variazione inter-dosaggio (C.V.) inferiore al 15%. Il limite de quantificazione è stata determinata a partire da 7 campioni di urina diversi ciascuno misurato in una coppia di provette in duplicato su 10 dosaggio con una diluizione del campione di 1:200.

**Specificità:** Le seguenti crossreazioni dell'anticorpo di Coniglio anti-6-SMT sono state determinate al 50 % del legame. I risultati sono presentati in Table 16.

**Comparazione di Metodi:** 42 campioni di urina sono dosati con il kit NovoLytiX 6-Sulfatoximelatonina ELISA rispetto a un test radioimmunologico (RIA) disponibile in commercio per la misurazione della 6-SMT. Il RIA corrispondente è frequentemente utilizzato e citato nella letteratura scientifica (es. 9-11).

L'analisi della regressione lineare dei dati ha prodotto le seguenti statistiche (

Figure 2):

$$6\text{-SMT ELISA} = 0.75 \times \text{RIA} + 1.70 \text{ ng/ml}; R^2 = 0.984.$$

2) Los Controles contienen cantidades de 6-SMT específicas del lote. Consulte la hoja de datos de control de calidad para las concentraciones exactas.

## ALMACENAMIENTO Y DURACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivos sin abrir	
Todos los componentes del kit sin abrir son estables a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.	
Reactivos abiertos / reconstituidos	
Placa de microtitulación	Almacénese a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas
Tampón de lavado	
Tampón de incubación	
Calibradores	
Controles	
Antisuero	
Conjugado de biotina	
Marcador de enzima	
Solución sustrato	
Solución de interrupción	

Tabla 10

## PRECAUCIONES

### PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- Los calibradores (B-M6S-CASET) y los controles (B-M6S-CONSET) de este kit contienen componentes de origen humano. Unque 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.
- La solución de interrupción (B-ST5) contiene ácido sulfúrico. Este reactivo puede irritar los ojos, la piel y las membranas mucosas. Evite el contacto con los ojos, la piel y la ropa. Después del contacto con los ojos o la piel lave inmediatamente con agua abundante.
- Las soluciones/reactivos no utilizados deben eliminarse según la normativa local.

### 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.
- El tampón de lavado concentrado puede cristalizarse. Es necesario asegurar que estos cristales se habían disueltos en agitando el tampón diluido a temperatura ambiente utilizando un agitador magnético. Agitar el tampón diluido a temperatura ambiente antes de usarlo en el ensayo.
- Residuos pueden formarse en los pocillos durante el proceso de la producción. Ellos están eliminados completamente durante lavar los pocillos y no tienen ninguna influencia en los resultados.
- Pasos 3, 6 y 9: Cerciórese de vaciar los pocillos totalmente después del último ciclo que de lavado.
- Paso 10: Cerciórese de utilizar el sustrato de TMB que fue equilibrado a la temperatura ambiente (18-28°C).
- Paso 12: Agite las placas de microtitulación bien durante la incubación con el sustrato. Las RPM dadas (400-600) no solicitan cada rotor. La solución debe moverse en pocillos – evite salpicaduras.
- NovoLytiX utiliza una lavadora de placa automatizada, programada en "modo supuesto de placa" es decir que cada paso de proceso (dispense) se realiza en todas las tiras secuencialmente, antes de procesar al paso siguiente (aspiración).

- Los componentes no deben utilizarse después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.
- No mezcle diferentes lotes de reactivos.
- Debe hacerse todo lo posible para garantizar que no se produzca contaminación cruzada entre reactivos, muestras o entre pocillos.
- Los micropocillos no pueden ser reutilizados.
- La enzima utilizada como marcador se inactiva por oxígeno y es altamente sensible a azida sódica, thimerosal, ácido hipocloroso y cloro hidrocarburos aromáticos, que se encuentran con frecuencia en los suministros de agua de laboratorio. Por tanto, utilice únicamente agua desionizada de alta calidad.
- Los blancos, calibradores y controles deben realizarse por duplicado. También se recomiendan duplicados para las muestras de pacientes, pero muchos usuarios prefieren las determinaciones únicas. Con este procedimiento, pueden analizarse hasta 39 muestras por duplicado o 78 muestras como determinaciones únicas por placa de microtitulación.
- Si la concentración inicial de una muestra desconocida es mayor que el calibrador más alto, la muestra de orina debe diluirse con tampón de incubación y ensayarse de nuevo según el procedimiento del ensayo. La dilución adicional debe considerarse cuando se calcule la concentración real de 6-SMT presente en la muestra desconocida.
- Si la concentración inicial de una muestra desconocida es menor que el calibrador más bajo, la muestra de orina debe diluirse menor con tampón de incubación (por ejemplo, por un factor de 20 en lugar de 200) y ensayarse de nuevo según el procedimiento del ensayo. El factor de dilución más bajo debe considerarse cuando se calcule la concentración real de 6-SMT presente en la muestra desconocida.

## MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

- Pipetas de precisión con puntas desechables: pipetas de 5 µl, 50 µl, 100 µl y 1 ml.
- Tubos desechables de poli estireno o polipropileno para la preparación de las diluciones de muestra.
- Cilindro de 1000 ml para la dilución del tampón de lavado concentrado.
- Lavador de placas de microtitulación o botella flexible para el tampón de lavado.
- Papel secante.
- Nevera
- Agitador de placas de microtitulación.
- Lector de placas de microtitulación para la medición de la absorbancia a 450 nm.

## RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

El procedimiento requiere <10 µl de orina. Recoja la orina, centrifugue durante 1 minuto a 10.000 x g o 5 minutos a 2.000 x g y transfiera partes alícuotas a microtubos nuevos. La 6-SMT urinaria es estable durante varias semanas incluso a temperatura ambiente. Sin embargo, debido al crecimiento potencial de microorganismos se recomienda almacenar las muestras de orina a ≤-20°C. Las muestras son estables durante >18 meses si se almacenan a ≤-20°C. Evite los ciclos repetidos de congelación y descongelación. Las muestras congeladas deben descongelarse y mezclarse completamente con un agitador vortex antes de su uso.

## PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Diluya todas las muestras del paciente 1:200 con el tampón de incubación (p.ej. 5 µl de orina +1 ml de tampón de incubación).
2. Prepare una placa con tiras suficientes para probar el número requerido de calibradores, controles y muestras.

Retire las tiras sobrantes del soporte y guárdelas en la bolsa metalizada. Almacénelo refrigerado.

3. Vacíe los pocillos y lávelos dos veces utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.
- 4a. Pipetee 100 µl de calibrador A por duplicado en los pocillos A1+A2 (pocillos del blanco).
- 4b. Pipetee 50 µl de calibrador A (estándar cero) por duplicado en los pocillos B1+B2.  
Pipetee 50 µl de calibrador B por duplicado en los pocillos C1+C2.  
Pipetee 50 µl de calibrador C por duplicado en los pocillos D1+D2.  
Pipetee 50 µl de calibrador D por duplicado en los pocillos E1+E2.  
Pipetee 50 µl de calibrador E por duplicado en los pocillos F1+F2.  
Pipetee 50 µl de Calibrador F por duplicado en los pocillos G1+G2.  
Pipetee 50 µl del Control bajo por duplicado en los pocillos H1+H2.  
Pipetee 50 µl del Control alto por duplicado en los pocillos A3+A4.
- 4c. Pipetee 50 µl de cada muestra diluida en los pocillos subsiguientes.
5. Añada 50 µl de conjugado de biotina (solución azul) a todos los pocillos.
6. Añada 50 µl de antisuero (solución amarilla) a todos los pocillos, **excepto a los pocillos del blanco** (pocillos A1+A2). Cubra la placa con un sellador de placas y colóquela durante 60 segundos en un mezclador de placas ajustado a 600 rpm.
7. Incube durante 3 horas ( $\pm 5$  min) a 2-8°C.
8. Retire y deseche el sellador de placa. Vacíe los pocillos y lávelos cuatro veces utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.
9. Añada 100 µl de marcador de enzima (solución amarilla) a todos los pocillos.
10. Cubra la placa con un sellador de placa e incube durante 30 minutos ( $\pm 5$  min) a 2-8°C.  
**Importante: Deje que la solución sustrato de TMB alcance 18-28°C.**
11. Retire y deseche el sellador de placa. Vacíe los pocillos y lávelos cuatro veces utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.
12. Añada 100 µl de la solución sustrato de TMB a cada pocillo.
13. Cubra la placa con un sellador de placas, coloque la placa en un mezclador de placas ajustado a 600 rpm, proteja la placa de la luz directa e incube durante 30 minutos ( $\pm 2$  min) a 18-28°C.
14. Añada 100 µl de solución de interrupción a todos los pocillos. Elimine las burbujas de aire con la punta de una pipeta. Continúe con el paso 15 al cabo de 30 minutos como máximo.
15. Lea la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de microtitulación.

## RESULTADOS & ESTANDARIZACIÓN

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

Calibrador cero ( $B_0$ ), considerando la absorbancia del Calibrador cero corregida por el NSB como el 100%:

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

Represente el porcentaje unido (eje vertical) frente a la concentración de 6-SMT en ng/ml (eje horizontal) utilizando un papel gráfico semilogarítmico. Dibuje la mejor curva de ajuste o calcule la curva estándar utilizando un algoritmo de cuatro parámetros logístico (4-PL) o un algoritmo similar.

**Muestras y controles:** Registre la absorbancia a 450 nm para cada pocillo de la muestra. Calcule el promedio de los valores duplicados, résteles el promedio de los pocillos del blanco y registre los promedios (= absorbancia media corregida). Calcule, como se ha descrito anteriormente, la unión de cada par de pocillos de la muestra como un porcentaje del Calibrador cero ( $B_0$ ), considerando la absorbancia del Calibrador cero corregida por el NSB como el 100%. Localice el valor  $B/B_0$  de las muestras en el eje vertical, dibuje una línea horizontal que corte la curva estándar y lea la concentración de 6-SMT (ng/ml) en el eje horizontal.

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

**Estandarización:** El kit NovoLytiX 6-Sulfatoximetatonina ELISA se calibra frente a un estándar de referencia certificado (Toronto Research Chemicals # S689050; CAS 2208-40-4) y su concentración correcta, utilizada para preparar los calibradores del kit, se confirma mediante UV/VIS:

$$\epsilon_{222} = 39'727 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ nel H}_2\text{O}.$$

## 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.

Dado que no hay controles para 6-SMT urinaria disponible comercialmente, recomendamos el uso de reservas de orina que contengan diferentes niveles de 6-SMT para los controles de calidad internos. La reproducibilidad de los parámetros de la curva estándar y de los valores de control debe encontrarse dentro de los límites establecidos de aceptabilidad del laboratorio. Los límites de confianza para los controles son específicos del lote y están impresos en la hoja de datos de control de calidad.

Si la precisión del ensayo no se correlaciona con los límites establecidos y la repetición excluye errores de la técnica, compruebe los siguientes aspectos: i) instrumentos de pipeteado, control de temperatura y tiempo ii) ajustes del lector de ELISA iii) fechas de caducidad de los reactivos iv) condiciones de almacenamiento e incubación v) la solución sustrato con TMB debe ser incolora vi) pureza del agua.

## LIMITACIONES

Los resultados del ensayo deben interpretarse considerando la información disponible de estudios epidemiológicos, la evaluación clínica del paciente y otros procedimientos de diagnóstico.

## CARACTERÍSTICAS DE EFICIENCIA

**Precisión intra-ensayo (dentro de la prueba): 7,1%.** La precisión intra-ensayo se calculó a partir de los resultados de 24 pares de valores obtenidos en una única prueba de tres muestras de orina con cantidades diferentes de 6-SMT. Los resultados se presentan en Table 12.

**Precisión inter-ensayo (prueba a prueba): 11,9%.** La precisión inter-ensayo se calculó a partir de los resultados de 10 pares de valores obtenidos en 10 pruebas diferentes de 6 muestras de orina con distintas cantidades de 6-SMT. Los resultados se presentan en Table 13.

**Linealidad/paralelismo de dilución: 97,8%.** Se diluyeron secuencialmente con tampón de incubación tres muestras de orina con una alta cantidad de 6-SMT y se ensayaron según el procedimiento del ensayo. Los resultados se presentan en Table 14.

**Recuperación del *spiking*: 119%.** Se enriquecieron tres muestras de orina humana con cantidades crecientes de 6-SMT y se ensayaron según el procedimiento del ensayo. Los resultados se presentan en Table 15.

**Límite para el blanco (LoB): 0,14 ng/ml.** Se ensayaron 24 duplicados del calibrador A (calibrador cero) en una única prueba. Se calcularon la media y la desviación estándar de los valores de absorbancia. La dosis mínima detectable de 6-SMT se calculó en 0,14 ng/ml restando dos desviaciones estándar de la absorbancia media del calibrador cero y cortando este valor con la curva estándar obtenida en la misma prueba.

**Límite de quantification (LoQ): 1,5 ng/ml.** El límite de quantification de este ensayo es la concentración mínima de 6-SMT en orina que puede medirse con un coeficiente de variación (C.V.) inter-ensayo menor de 15%. La DMDF determinó a partir de 7 muestras de orina diferentes medida cada una en un par de tubos duplicados durante 10 ensayos. El límite de quantification se calculó en 1.5 ng/ml (a una dilución de la muestra de 1:200).

**Especificidad:** Se han determinado las siguientes reacciones cruzadas del anticuerpo anti-6-SMT de conejo en el 50% de unión. Los resultados se presentan en Table 16.

**Comparación del método:** Se analizaron 42 muestras de orina con el kit NovoLytiX 6-sulfatoximetatonina ELISA en comparación con un radioinmunoensayo (RIA) disponible comercialmente para la medición de 6-SMT. El RIA correspondiente se utiliza con frecuencia y se cita en la literatura científica (p. ej. 9-11).

El análisis de regresión lineal (

Figure 2) de los datos produjo los siguientes estadísticos:

$$6\text{-SMT ELISA} = 0.75 \times \text{RIA} + 1.70 \text{ ng/ml}; R^2 = 0.984.$$



**Table description:** see “Results” (page 3), “Performance Characteristics” (page 4)

**Tabellenbeschreibung:** siehe “Resultate” und “Leistungsmerkmale” (Seite 6)

**Explications relatives aux tableaux:** voir «Résultats» et «Caracteristiques de Performance» (page 9)

**Descrizione tavola:** vedi “Risultati” e “Caratteristiche di Prestazione” (pagina 12)

**Explicaciones relativas a las Tablas:** ver “Resultados” y “Características de Eficiencia” (página 15).

Table 11: **Example of Results**

	Conc. (ng/ml)	Absorbance (OD)	B/B <sub>0</sub> (%)	Calc. Conc. (ng/ml)	CV Conc. (%)
Blank		0.127			
Blank		0.119			
<b>Blank Avg.</b>		<b>0.123</b>			<b>4.6</b>
Cal. A	0.0	2.213	100.0		
Cal. A	0.0	2.176	100.0		
<b>Cal. A Avg.</b>	<b>0.0</b>	<b>2.194</b>	<b>100.0</b>		<b>1.2</b>
Cal. B	0.8	1.960	88.7	0.8	
Cal. B	0.8	1.966	89.0	0.8	
<b>Cal. B Avg.</b>	<b>0.8</b>	<b>1.963</b>	<b>88.8</b>	<b>0.8</b>	<b>2.1</b>
Cal. C	2.0	1.699	76.1	2.0	
Cal. C	2.0	1.705	76.4	2.0	
<b>Cal. C Avg.</b>	<b>2.0</b>	<b>1.702</b>	<b>76.2</b>	<b>2.0</b>	<b>1.0</b>
Cal. D	5.0	1.205	52.2	4.9	
Cal. D	5.0	1.192	51.6	5.1	
<b>Cal. D Avg.</b>	<b>5.0</b>	<b>1.199</b>	<b>51.9</b>	<b>5.0</b>	<b>1.5</b>
Cal. E	12.5	0.719	28.8	12.2	
Cal. E	12.5	0.697	27.7	12.8	
<b>Cal. E Avg.</b>	<b>12.5</b>	<b>0.708</b>	<b>28.2</b>	<b>12.5</b>	<b>3.7</b>
Cal. F	40.0	0.365	11.7	40.0	
Cal. F	40.0	0.365	11.7	40.0	
<b>Cal. F Avg.</b>	<b>40.0</b>	<b>0.365</b>	<b>11.7</b>	<b>40.0</b>	<b>0.0</b>
Ctrl. LOW		1.485		3.1	
Ctrl. LOW		1.444		3.3	
<b>Ctrl. L. Avg.</b>		<b>1.464</b>		<b>3.2</b>	<b>5.1</b>
Ctrl. HIGH		0.593		17.0	
Ctrl. HIGH		0.579		17.7	
<b>Ctrl. H. Avg.</b>		<b>0.586</b>		<b>17.3</b>	<b>3.0</b>
Sample 1		0.808		10.1	
Sample 1		0.794		10.3	
<b>Sam. 1 Avg.</b>		<b>0.801</b>		<b>10.2</b>	<b>2.0</b>
Sample 2		0.392		35.5	
Sample 2		0.411		32.8	
<b>Sam. 2 Avg.</b>		<b>0.401</b>		<b>34.2</b>	<b>5.6</b>

ED<sub>20</sub> = 20.2 ng/ml      ED<sub>50</sub> = 5.3 ng/ml      ED<sub>80</sub> = 1.6 ng/ml

Figure 1: **Example of a Standard Curve**

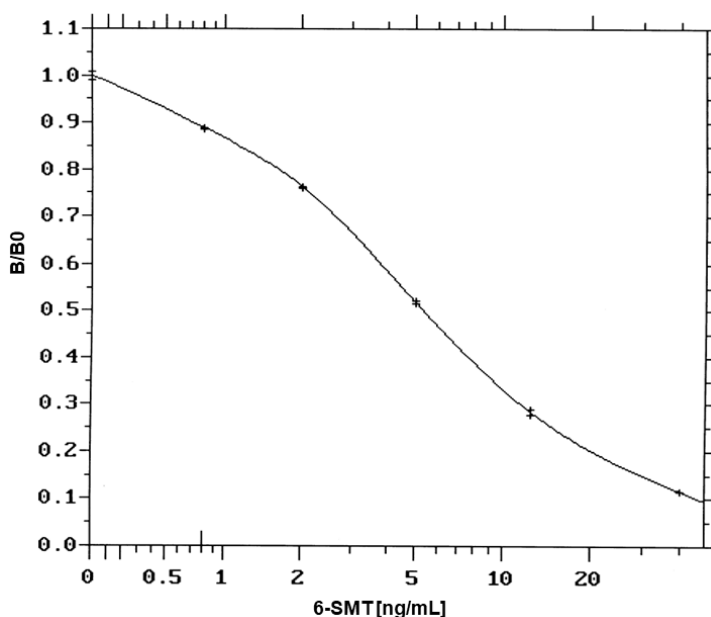


Table 12: **Intra-Assay Precision**

Urine Sample, diluted 1:200	Mean (ng/ml)	S.D. (ng/ml)	C.V. (%)
1	3.09	0.30	9.7
2	11.29	0.70	6.2
3	34.65	1.82	5.3
Mean			<b>7.1%</b>

Table 13: **Inter-Assay Precision**

Urine Sample diluted 1:200	Mean (ng/ml)	S.D. (ng/ml)	C.V. (%)
5	1.58	0.28	17.4
6	1.54	0.24	15.3
7	2.03	0.27	13.2
8	3.16	0.30	9.6
9	10.62	0.79	7.5
10	32.10	2.71	8.4
Mean			<b>11.9%</b>

Table 14: **Dilution Linearity/Parallelism**

Sample	Basic Value (ng/ml)	Dilution Factor	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery O/E (%)
11	29.7	1:200	29.7		
		1:400	15.2	14.8	102
		1:800	7.3	7.4	98
		1:1600	3.7	3.7	100
		1:3200	2.0	1.9	110
12	26.7	1:50	26.7	--	--
		1:100	13.3	13.4	100
		1:200	6.4	6.68	96
		1:400	3.2	3.34	96
		1:800	1.5	1.67	90
13	16.9	1:12.5	16.9	--	--
		1:25	7.5	8.50	89
		1:50	3.8	4.23	89
		1:100	2.1	2.12	97
		1:200	1.2	1.06	112
Mean					<b>97.8%</b>

Table 15: **Spiking Recovery**

Sample	Basic Value (ng/ml)	Spiked with (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery O/E (%)
14	0.88	0.5	1.38	1.43	104
		1.0	1.88	1.89	100
		2.0	2.88	3.53	123
		4.0	4.88	3.76	77
		8.0	8.88	8.58	97
		16.0	16.88	17.32	103
15	6.3	32.0	32.88	28.05	85
		0.5	6.8	6.20	91
		1.0	7.3	6.87	94
		2.0	8.3	7.90	95
		4.0	10.3	10.25	100
		8.0	14.3	17.78	124
16	4.6	16.0	22.3	28.23	127
		32.0	38.3	38.24	100
		0.5	5.1	4.01	79
		1.0	5.6	5.15	92
		2.0	6.6	7.58	115
		4.0	6.6	10.44	122
Mean		8.0	12.6	14.82	118
		16.0	20.6	25.75	125
		32.0	36.6	35.76	98
					<b>119%</b>

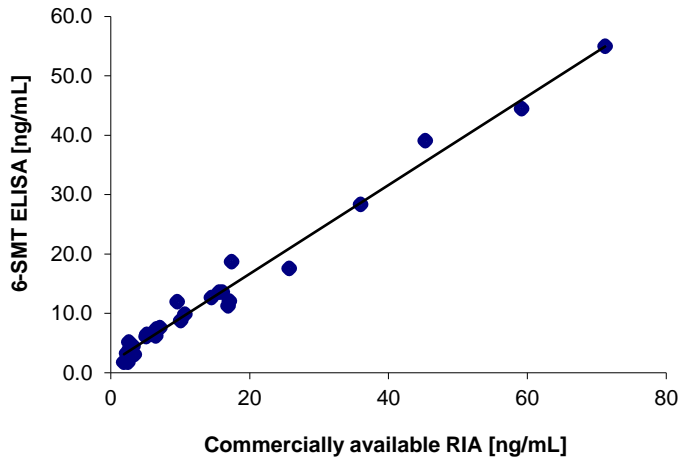
Table 16:

**Specificity**

6-Sulfatoxymelatonin	100 %
N-Acetyl-Serotonin Sulfate	0.01 %
Melatonin	0.007 %
6-Hydroxymelatonin	0.001 %
Related compounds as follows:	< 0.001 %

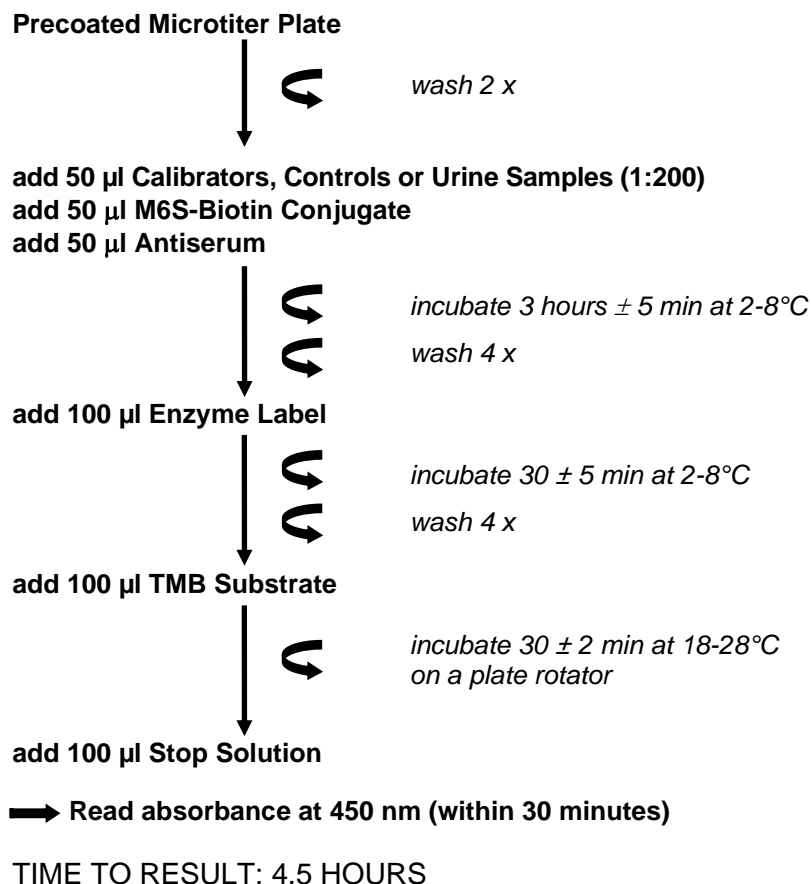
5-Sulfatoxy-N-Acetylserotonin, 5-Glucuronide-N-Acetylserotonin, N-Acetylserotonin, 6-Glucuronidemelatonin, 5-Methoxyindole Acetic Acid, Tryptophan, N-Acetyltryptophan, 5-Methoxytryptophan, 5-Hydroxytryptophol, N-Acetyltryptamine, N-Methyltryptamine, 5-Hydroxytryptamine, 5-Methoxytryptamine.

Figure 2:

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

1. Markey, SP, *et al.* *The correlation between human plasma melatonin levels and urinary 6-hydroxymelatonin excretion.* Clin Chim Acta **150**, 221-5. (1985).
2. Bojkowski, CJ, *et al.* *Melatonin secretion in humans assessed by measuring its metabolite, 6-sulfatoxymelatonin.* Clin Chem **33**, 1343-8. (1987).
3. Brown, GM, *et al.* *Urinary 6-sulphatoxymelatonin, an index of pineal function in the rat.* J Pineal Res **10**, 141-7. (1991).
4. Klante, G, *et al.* *Creatinine is an appropriate reference for urinary sulphatoxymelatonin of laboratory animals and humans.* J Pineal Res **23**, 191-7. (1997).
5. Graham, C, *et al.* *Prediction of nocturnal plasma melatonin from morning urinary measures.* J Pineal Res **24**, 230-8. (1998).
6. Kripke, DF, *et al.* *Melatonin: marvel or marker?* Ann Med **30**, 81-7. (1998).
7. Garfinkel, D, *et al.* *Improvement of sleep quality in elderly people by controlled-release melatonin.* Lancet **346**, 541-4. (1995).
8. Peniston-Bird, JF, *et al.* *An enzyme immunoassay for 6-sulphatoxy-melatonin in human urine.* J Pineal Res **20**, 51-6. (1996).
9. Arendt, J, *et al.* *Immunoassay of 6-hydroxymelatonin sulfate in human plasma and urine: abolition of the urinary 24-hour rhythm with atenolol.* J Clin Endocrinol Metab **60**, 1166-73. (1985).
10. Aldhous, ME and Arendt, J. *Radioimmunoassay for 6-sulphatoxymelatonin in urine using an iodinated tracer.* Ann Clin Biochem **25**, 298-303. (1988).
11. Harthe, C, *et al.* *Direct radioimmunoassay of 6-sulfatoxymelatonin in plasma with use of an iodinated tracer.* Clin Chem **37**, 536-9. (1991).





**6-SULFATOXYMELATONIN ELISA**



APPENDIX IV  
CHANGE LOG

Date	Version	Reason for change
2020-12-23	01	1 <sup>st</sup> tracked NovoLytiX version.
2022-03-26	02	Microtiter Plates are delivered with wells containing 250µL of stabilization buffer instead in a lyophilized form, this IFU is accordingly adapted; the former section <i>MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED</i> is divided into sections <i>EQUIPMENT REQUIRED</i> and <i>MATERIALS RECOMMENDED BUT NOT PROVIDED</i> , starting with lot 3738; a procedural note is added to step 13 of the <i>ASSAY PROCEDURE</i> (incubation with TMB): If the color reaction is slow or not as high as expected the incubation with TMB may be prolonged for another 15 minutes; the accuracy of each actual calibrator lot is assured by comparison against a certified Reference Standard (Toronto Research Chemicals # S689050; CAS 2208-40-4) (see section <i>QUALITY CONTROL</i> ).
2023-07-06	03	Change of Wash Buffer 10x code from B-M6S-WB to B-WB; down rating of B-STS from corrosive agent to irritant according to the latest REACH guidelines; the formulation of TMB solution has been slightly changed (without affecting its performance) and is therefore not anymore regarded irritant according to the latest REACH guidelines.
2024-04-13	04	The use of refrigerated reagents and refrigerated Wash Buffer is not anymore required (see <i>PRECAUTIONS</i> and <i>ASSAY PROCEDURE, steps 3 to 9</i> ) and in <i>ASSAY PROCEDURE, step 13 (incubation with TMB Solution)</i> new for 30±2 min to reach higher OD (optical density), both without affecting the assay performance and the final results, respectively; the standardization of the 6-Sulfatoxymelatonin ELISA and some other statements are clearer formulated; several typing errors are erased.

**APPENDIX V**  
**SYMBOLS/ SYMBOLE/ SYMBOLES/ SIMBOLI/ SIMBOLOS**

Symbol	Explanation
	Use by Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad
<b>REF</b>	Catalogue number Bestellnummer Référence du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo
<b>LOT</b>	Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote
<b>IVD</b>	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device <i>In Vitro</i> Diagnostikum Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Content sufficient for <n> tests Ausreichend für "n" Ansätze Contenu suffisant pour „n“ tests Contenuto sufficiente per „n“ saggi Contenido suficiente para <n> ensayos
	Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura
<b>MP</b>	Microtiterplate Mikrotiter-Platte Microplaque Micropiastra Microplaca
<b>BUF WASH 10X</b>	Wash Buffer Concentrate (10x) Wasch-Puffer Konzentrat (10x) Concentré de tampon de lavage (10x) Tamponne di lavaggio concentrato (10x) Tampón de lavado concentrado (x10)

Symbol	Explanation
<b>BUF INC</b>	Incubation Buffer Inkubations-Puffer Tampon d'incubation Tampone d'incubazione Tampón de incubación
<b>CAL A - CAL F</b>	Calibrator A - F Kalibrator A - F Calibrateur A -F Calibratore A - F Calibrador A - F
<b>CONTROL L</b>	Control Low Kontrolle tief Contrôle bas Controllo basso Control bajo
<b>CONTROL H</b>	Control High Kontrolle hoch Contrôle élevé Controllo alto Control alto
<b>Ab</b>	Antiserum Antiserum Antisérum Antisiero Antisuero
<b>BC</b>	Biotin Conjugate Biotin-Konjugat Conjugué Biotine Coniugato biotinitato Conjugado de Biotina
<b>EL</b>	Enzyme Label Enzym-Marker Marqueur enzymatique Marcato enzimatico Marcador enzimático
<b>SUBS TMB</b>	TMB Substrate TMB-Substrat Substrat TMB Substrato di TMB Substrato de TMB
<b>SOLN STOP</b>	Stop Solution Stopp-Lösung Solution stop Soluzione stoppante Solución de parada

