



Distribuito in ITALIA da
Li StarFish S.r.l.
Via Cavour, 35
20063 Cernusco S/N (MI)
telefono 02-92150794
info@listarfish.it
www.listarfish.it

Instructions for use

Melatonin Direct Saliva ELISA

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

REF**BA E-3400****IVD**

1. INTENDED USE

Enzyme immunoassay for the direct, quantitative determination of melatonin in human saliva.
For *in vitro* use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Melatonin (N-acetyl-5-methoxy-tryptamine) which is synthesized from the amino acid tryptophan is one of the major hormones of the pineal gland.¹ There is a circadian rhythm associated with Melatonin and the highest levels in plasma are observed during nighttime.² Regulation of the melatonin secretion is influenced by light via a pathway that starts in the retina of the eye. The production of melatonin is stopped abruptly upon exposure to light.¹

Levels of Melatonin in plasma and saliva are correlated throughout the circadian rhythm. The concentration of melatonin in saliva corresponds to about one third of the concentration in serum in average.³

Dim-light melatonin onset (DLMO) can be defined by the rise of melatonin concentration in serum/plasma, saliva and urine, respectively. An absolute threshold of melatonin levels is not necessarily the best method to determine DLMO. For our melatonin Saliva assay, we recommend the following procedure according to Benloucif et. al.⁴ : samples should be taken every 30 to 60 minutes under dim light (< 30 lux) for at least one hour prior and throughout the expected rise in melatonin. The DLMO can then be calculated as the first sample to exceed twice the standard deviation (2 SD) of the first three baseline samples.

Studies of melatonin levels are generally performed in healthy human populations.

Changes in the levels of melatonin and alternation in the pattern of secretion have been reported to coincide with: sleep quality,⁵ insomnia,⁶ daytime sleepiness,⁷ jet lag,⁸ depression,⁹ oxidative stress,¹⁰ pregnancy,¹¹ and blindness.¹²

3. TEST PRINCIPLE

The assay procedure follows the basic principle of competitive ELISA whereby there is competition between a biotinylated and a non-biotinylated antigen for a fixed number of antibody binding sites. The amount of biotinylated antigen bound to the antibody is inversely proportional to the analyte concentration of the sample. When the system is in equilibrium, the free biotinylated antigen is removed by a washing step and the antibody bound biotinylated antigen is determined by use of streptavidin-peroxidase as marker and TMB as substrate. Quantification of unknowns is achieved by comparing the enzymatic activity of unknowns with a response curve prepared by using known standards.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. For *in-vitro diagnostic* use only. For professional use only.
2. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
3. In case of severe damage of the kit package please contact the manufacturer or your supplier in written form, latest one week after receiving the kit. Do not use damaged components in test runs, but keep safe for complaint related issues.
4. Broken glass may cause injury. Handle glass vessels with caution.
5. Obey lot number and expiry date. Do not mix reagents of different lots. Do not use expired reagents.
6. Follow good laboratory practice and safety guidelines. Wear lab coats, disposable latex gloves and protective glasses where necessary.
7. Reagents of this kit containing hazardous material may cause eye and skin irritations. See MATERIALS SUPPLIED and labels for details. Material Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from the manufacturer.
8. Chemicals and prepared, used, unused or expired reagents have to be treated as hazardous waste according to national biohazard and safety guidelines or regulations.
9. The cleaning staff should be guided by the professionals regarding potential hazards and handling.
10. All serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user and/or the patient is established.
11. The device contains material of animal origin, which is certified apparently free of infectious or contagious diseases and injurious parasites. Still the material should be handled with extreme caution.
12. Avoid contact with Stop solution. It may cause irritations and burns.

5. STORAGE AND STABILITY

The kit is shipped at ambient temperature and should be stored at 2 - 8 °C. Keep away from heat or direct sunlight. The storage and stability of specimens and prepared reagents is stated in the corresponding chapters.

The microtiter strips are stable up to the indicated expiry after the kit is opened. Make sure that the opened bag is tightly closed when stored at 2 - 8 °C.

6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Specimen collection

The patient should not eat, drink, chew gums or brush teeth for 30 min before sampling.

Do not collect samples when oral diseases, inflammation or lesions exist (blood contamination). Reddish colour is indicating blood contamination and leading to wrong results.

Samples should not be taken from patients that took biotin-containing multivitamins or supplements within last 48 h.

Rinse mouth thoroughly with cold water 5 min prior to sample collection.

Saliva flow can be stimulated by chewing on a piece of Parafilm®.

Saliva can be collected in a suitable sampling device. Sample collection systems which contain cellulose pads should not be used.

A minimum of 0.5 ml liquid should be collected.

It is recommended to freeze samples at -20 °C prior to laboratory testing. After thawing, mix and centrifuge 10 min at 2000 - 3000 x g to remove particulate material.

Specimen storage

Saliva samples can be stored at room temperature for 1 day or at 2 - 8 °C for 7 days.

It is recommended to freeze samples and store at -20 °C for long time storage (< 6 months).

Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Keep away from heat or direct sunlight.

7. MATERIALS SUPPLIED

BA E-3431

96

Microtiter Plate

Contents: Break apart strips. Coated with anti-rabbit IgG (goat, polyclonal).

Volume: 12 x 8 wells

Standards and Controls - ready to use

For exact concentrations see labels or QC-Report.

Cat. no.	Component	Concentration (pg/ml)	Volume /Vial
BA E-3401	STANDARD A	0	10 ml
BA E-3402	STANDARD B	0.5	1 ml
BA E-3403	STANDARD C	1.5	1 ml
BA E-3404	STANDARD D	5.0	1 ml
BA E-3405	STANDARD E	15.0	1 ml
BA E-3406	STANDARD F	50.0	1 ml
BA E-3451	CONTROL 1	Concentrations / acceptable ranges see QC-Report.	1 ml
BA E-3452	CONTROL 2		1 ml

Contents: stabilizers.

BA E-3410

MEL-AS

Melatonin Antiserum - ready to use

Contents: Antiserum (rabbit, polyclonal), stabilizers.

Volume: 1 x 7 ml

BA E-3441

BIOTIN

Melatonin Biotin - ready to use

Contents: Stabilizers.

Volume: 1 x 12 ml

BA E-3440 CONJUGATE **Enzyme Conjugate** - ready to use

Contents: Streptavidin conjugated to HRP, stabilizers.

Volume: 1 x 12 ml

BA E-3430 WASH-CONC 20x **Wash Buffer** - concentrate (20x)

Contents: Phosphate buffer, Tween, stabilizers.

Volume: 1 x 50 ml

BA E-3455 SUBSTRATE **TMB Substrate Solution** - ready to use

Contents: TMB, Buffer, stabilizers.

Volume: 1 x 15 ml

BA E-3480 STOP-SOLN **TMB Stop Solution** - ready to use

Contents: 1 M H₂SO₄

Volume: 1 x 15 ml

Hazard
identification:



H290 May be corrosive to metals.

H314 Causes severe skin burns and eye damage.

3 x Adhesive Foil

8. MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

1. Micropipettes (Multipipette Eppendorf or similar devices, < 3% CV). Volume: 50: 100 µL
2. A suitable sampling device should be used.
3. Orbital shaker (400 - 600 rpm)
4. Vortex mixer
5. 8-Channel Micropipettor with reagent reservoirs
6. Wash bottle, automated or semi-automated microtiter plate washing system
7. Centrifuge (preferably refrigerated) 2000 - 3000 x g
8. Microtiter plate reader capable of reading absorbance at 450 nm (reference wavelength 600 - 650 nm)
9. Bidistilled or deionised water
10. Paper towels, pipette tips and timer
11. Refrigerator (2 - 8 °C)

9. PROCEDURE NOTES

1. Any improper handling of samples or modification of the test procedure may influence the results. The indicated pipetting volumes, incubation times, temperatures and pretreatment steps have to be performed strictly according to the instructions. Use calibrated pipettes and devices only.
2. Once the test has been started, all steps should be completed without interruption. Make sure that required reagents, materials and devices are prepared ready at the appropriate time. Allow all reagents and specimens to reach room temperature (18 - 25 °C) and gently swirl each vial of liquid reagent and sample before use. Mix reagents without foaming.
3. Avoid contamination of reagents, pipettes and wells/tubes. Use new disposable plastic pipette tips for each component and specimen. Do not interchange caps. Always cap not used vials. Do not reuse wells/tubes or reagents.
4. It is advised to determine duplicates to be able to identify potential pipetting errors.
5. Use a pipetting scheme to verify an appropriate plate layout.
6. Incubation time affects results. All wells should be handled in the same order and time sequences. It is recommended to use an 8-channel Micropipettor for pipetting of solutions in all wells.
7. Microtiter plate washing is important. Improperly washed wells will give erroneous results. It is recommended to use a multichannel pipette or an automatic microtiter plate washing system. Do not allow the wells to dry between incubations. Do not scratch coated wells during rinsing and aspiration. Rinse and fill all reagents with care. While rinsing, check that all wells are filled precisely with Wash Buffer, and that there are no residues in the wells.

8. Humidity affects the coated wells/tubes. Do not open the pouch until it reaches room temperature. Unused wells/tubes should be returned immediately to the resealed pouch including the desiccant.
9. The relative centrifugal force (g) is not equivalent to rounds per minute (rpm) but it has to be calculated depending on the radius of the centrifuge.

10. PRE-TEST SETUP INSTRUCTIONS

The contents of the kit for 96 determinations can be divided into 3 separate runs. The volumes stated below are for one run with 4 strips (32 determinations). Thimerosal should be avoided in any case.

10.1 Preparation of concentrated components

Wash Buffer:

Dilute 10 ml of *Wash Buffer* with bidest. water to a final volume of 200 ml (relation 1:20). Mix vigorously. Storage: 2 - 8 °C
Stability: 4 weeks

10.2 Dilution of Samples

Values greater than 50 pg/ml (Standard F) must be diluted with Standard A into the linear range of the standard curve, e.g. by dilution of 1:10 (Example: 50 µL saliva + 450 µL Standard A). Dilution has to be made in glass tubes. Measured results have to be multiplied by dilution factor to obtain corrected results. Values lower than 0 pg/ml should be repeated by an additional measurement. Additional Standard A with 100 ml can be ordered separately.

11. TESTPROCEDURE

1. Pipette 100 µl of each Standard, Control and sample into the respective wells of the microtiter plate.
2. Pipette 50 µl of Antiserum solution into each well. Cover plate with adhesive foil. Shake plate carefully for 10 seconds.
3. Incubate 16 - 20 h at 2 - 8 °C.
4. Remove adhesive foil. Discard incubation solution. Wash plate 4 x with 250 µl of diluted Wash Buffer . Remove excess solution by tapping the inverted plate on a paper towel.
5. Pipette 100 µl of Biotin solution into each well. Cover plate with adhesive foil.
6. Incubate 2 h at RT (18 - 25 °C) on an orbital shaker (500 rpm).
7. Remove adhesive foil. Discard incubation solution. Wash plate 4 x with 250 µl of diluted Wash Buffer . Remove excess solution by tapping the inverted plate on a paper towel.
8. Pipette 100 µl of Enzyme Conjugate into each well. Cover plate with adhesive foil.
9. Incubate 1 h at RT (18 - 25 °C) on an orbital shaker (500 rpm).
10. Remove adhesive foil. Discard incubation solution. Wash plate 4 x with 250 µl of diluted Wash Buffer . Remove excess solution by tapping the inverted plate on a paper towel.
11. Pipette 100 µl of TMB Substrate Solution into each well.
12. Incubate 15 min at RT (18 - 25 °C) on an orbital shaker (500 rpm).
13. Stop the substrate reaction by adding 100 µl of TMB Stop Solution into each well. Shake briefly. Color changes from blue to yellow.
14. Measure optical density with a photometer at 450 nm (Reference-wavelength: 600 - 650 nm) within 15 min after pipetting of the Stop Solution.

12. AUTOMATION

Automated protocols can be provided for open ELISA systems, e.g.: DSX®. For more information please contact the manufacturer.

For the use of products on automated instruments it is absolutely necessary to perform and maintain a validation according to legal requirements. A successful validation of the process is a prerequisite for diagnostic use. The responsibility for the implementation and documentation of validation in accordance with the country-specific requirements is assumed by the organization or institution.

13. QUALITY CONTROL

The test results are only valid if the test has been performed following the instructions. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or comparable standards/laws. User and/or laboratory must have a validated system to get diagnosis according to GLP. All kit controls must be found within the acceptable ranges as stated on the labels and the QC-Report. If the criteria are not met, the run is not valid and should be repeated. Each laboratory should use known samples as further controls. It is recommended to participate at appropriate quality assessment trials.

In case of any deviation the following technical issues should be proven: Expiration dates of (prepared) reagents, storage conditions, pipettes, devices, incubation conditions and washing methods.

14. CALCULATION OF RESULTS

The obtained OD of the standards (y-axis, linear) are plotted against their concentration (x-axis, logarithmic) either on semi-logarithmic graph paper or using an automated method. A good fit is provided with cubic spline, 4 Parameter Logistics or Logit-Log.

For the calculation of the standard curve, apply each signal of the standards (one obvious outlier of duplicates might be omitted and the more plausible single value might be used).

The concentration of the samples can be read directly from the standard curve.

In case of diluted samples the values have to be multiplied with the corresponding dilution factor.

Samples showing concentrations above the highest standard have to be diluted as described in PRE-TEST SETUP INSTRUCTIONS and reassayed.

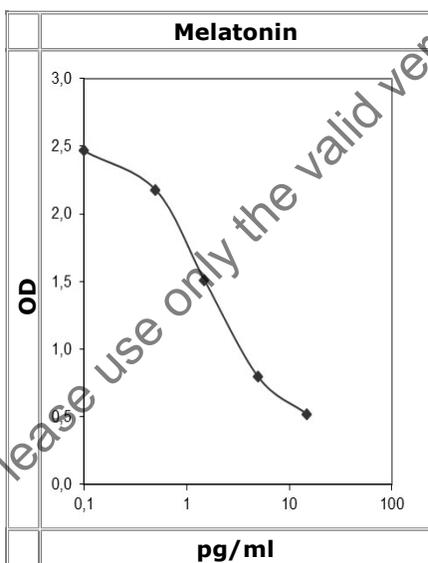
Conversion:

$$\text{Melatonin (pg/ml)} \times 4.30 = \text{pmol/l}$$

Typical Standard Curve

(Example. Do not use for calculation!)

Standard	Melatonin (pg/ml)	OD (Mean)	OD / OD _{max} (%)
A	0	2.666	100
B	0.5	2.464	92
C	1.5	2.176	82
D	5.0	1.506	56
E	15.0	0.794	30
F	50.0	0.519	19



Measuring Range: from 0.854 pg/ml (LoQ) to 50 pg/ml (Standard F)

15. EXPECTED VALUES

The results themselves should not be the only reason for any therapeutical consequences. They have to be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

A study with apparently healthy subjects has shown that the melatonin levels in humans have a marked circadian rhythmicity characterized by very low levels during day-time (0 - 8 pg/ml) and high levels during night-time (10 - 58 pg/ml) and show a considerable inter-individual variation. The nocturnal melatonin peak among healthy individuals varies significantly. It is recommended that each laboratory establishes its own range of normal values.

16. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Samples from patients that took biotin-containing multivitamins or supplements may contain biotin amounts which will cause interference with the assay. Specimen collection and storage have a significant effect on the test results. See SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE for details.

For cross-reactivities, see PERFORMANCE.

Thimerosal should be avoided in any case.

The following substances do not have a significant effect on the test results up to the below stated concentrations (+/- 20 %).

Substance	Conc. in saliva
Blood	0.125 %
BSA	0.125 %
NaN ₃	0.125 %
Citric acid	0.01 %

17. PERFORMANCE

17.1 Analytical Specificity (Cross Reactivity)

The cross-reactivity of the melatonin antiserum has been measured against various compounds.

The percent of cross-reactivity is expressed as the ratios of melatonin concentration to the concentration of the reacting compound at 50 % binding of the zero standard. The results are shown in the following table.

Substance	Cross Reactivity (%)
Serotonin	0.54
5-Methoxytryptamine	< 0.01
N-Acetylserotonin	< 0.01
5-Methoxytryptophol	< 0.01

17.2 Limit of Blank (LoB)

The LoB study was performed with the zero calibrator (Standard A), measured in 28 replicates in one run. Limit of Blank = 0.4 pg/ml

17.3 Limit of Quantitation (LoQ)

The LoQ study was performed with 10 saliva samples, measured in 10 replicates in one run.

Limit of Quantitation = 0.854 pg/ml (CV = 20 %)

17.4 Metrological traceability

Traceability was proved by comparing the results of measurements between Melatonin Direct Saliva ELISA, with LC-MS/MS measurements, performed by a certified independent laboratory (ZRT Laboratory, USA).

The results obtained with the Melatonin Direct Saliva ELISA are metrological traceable to the SI-Unit pg/ml by mass spectrometry using 10 saliva QC samples.

The calculated maximum uncertainty of Melatonin Direct Saliva ELISA is 14.7 %.

y = Melatonin Direct Saliva ELISA	y = 0.938x LC-MS/MS + 0.088	r = 0.991
-----------------------------------	-----------------------------	-----------

17.5 Linearity

The linearity study was performed measuring 5 different samples with different concentrations and a serial dilution up to 1:16. The assay showed a linear behavior up to a 1:16 dilution.

17.6 Recovery

The recovery study was performed measuring four different concentrations in three different saliva samples. Increasing amounts of Melatonin were added to the saliva samples. All samples (spiked and unspiked) were assayed in duplicates. The Melatonin concentrations were measured and the percentage recovery rates were calculated.

The mean recovery of melatonin including all saliva samples was 98 % (range 74 – 114 %). The relation between expected and measured concentrations of melatonin did not significantly deviate over the concentration range studied.

17.7 Method Comparison

A method comparison with a commercial ELISA was performed. 71 saliva samples were measured with the following result: $r = 0.9899$.

A method comparison was performed with the Melatonin RIA. 82 saliva samples were measured with the following result: $r = 0.9539$.

17.8 Precision

The intra/inter assay study was conducted with two day samples and three night samples (3.5 - 25 pg/ml) by using 1 kit lot for 20 days with two runs per day and replicate.

The Intra assay precision showed a mean CV for day samples (< 8 pg/ml) of 17.0 % (15.0 - 19.0 %) and for night samples (> 10 pg/ml) of 13.9 %, Range 13.2 - 14.4 %.

The Inter assay precision showed a mean CV for day samples (< 8 pg/ml) of 20.5 % (17.1 - 23.8 %) and for night samples (> 10 pg/ml) of 18.4 %, Range 16.5 - 19.7 %.

To establish between lot precision the following study design assaying five different samples was used: 3 different reagent lots / 5 days / 1 run per day per lot / 5 replicates per run

The mean between lot variation was 13.4 % (range 8.8 - 17.7 %).

18. PRODUCT LITERATURE REFERENCES

1. Fink, G., Pfaff, D. & Levine, J. Handbook of Neuroendocrinology. Handbook of Neuroendocrinology (Elsevier Inc., 2012). doi:10.1016/C2009-0-04284-6
2. Klein, D. C. Arylalkylamine N-acetyltransferase: 'The timezyme'. Journal of Biological Chemistry 282, 4233–4237 (2007).
3. Voultsios, A., Kennaway, D. J. & Dawson D. Salivary melatonin as a circadian phase marker: validation and comparison to plasma melatonin. J. Biol. Rhythms 12, 457–466 (1997).
4. Benloucif, S. et al. Measuring melatonin in humans. J. Clin. sleep Med. JCSM Off. Publ. 4, 66–69 (2008).
5. Jockovich, M., Cosentino, D., Cosentino, L., Wears, R. L. & Seaberg, D. C. Effect of exogenous melatonin on mood and sleep efficiency in emergency medicine residents working night shifts. Acad. Emerg. Med. 7, 955–958 (2000).
6. Almeida Montes, L. G., Ontiveros Uribe, M. P., Cortés Sotres, J. & Heinze Martin, G. Treatment of primary insomnia with melatonin: a double-blind, placebo-controlled, crossover study. J. Psychiatry Neurosci. 28, 191–6 (2003).
7. Rose, D. A. & Kahan, T. L. Melatonin and sleep qualities in healthy adults: pharmacological and expectancy effects. J. Gen. Psychol. 128, 401–21 (2001).
8. Arendt, J. et al. Some effects of jet-lag and their alleviation by melatonin. Ergonomics 30, 1379–1393 (1987).
9. Beck-Friis, J. et al. Serum melatonin in relation to clinical variables in patients with major depressive disorder and a hypothesis of a low melatonin syndrome. Acta Psychiatr. Scand. 71, 319–330 (1985).
10. Miller, E., Walczak, A., Majsterek, I. & Kedziora, J. Melatonin reduces oxidative stress in the erythrocytes of multiple sclerosis patients with secondary progressive clinical course. J. Neuroimmunol. 257, 97–101 (2013).
11. Tamura, H. et al. Melatonin and pregnancy in the human. Reproductive Toxicology 25, 291–303 (2008).
12. Sack, R. L., Lewy, A. J., Blood, M. L. & Nakagawa, H. Circadian rhythm abnormalities in totally blind people: Incidence and clinical significance. J. Clin. Endocrinol. Metab. 75, 127–134 (1992).

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

 **For updated literature or any other information please contact your local supplier.**

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date		Batch code		For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use		Content		CE labelled
	Caution		Catalogue number		

1. ZWECKBESTIMMUNG

Enzymimmunoassay zur direkten, quantitativen Bestimmung von Melatonin in humanem Speichel.
Nur für *In-vitro Gebrauch*.

2. KLINISCHE BEDEUTUNG

Melatonin (N-Acetyl-5-methoxy-tryptamin), das aus der Aminosäure Tryptophan synthetisiert wird, ist eines der wichtigsten Hormone der Zirbeldrüse.¹ Die Melatonin-Biosynthese unterliegt einem zirkadianen Rhythmus mit hohen Werten in der Nacht und niedrigen am Tage.² Die Regulation der Melatonin-Sekretion wird durch Licht über einen Weg beeinflusst, der in der Netzhaut des Auges beginnt. Die Produktion von Melatonin wird bei Lichteinwirkung abrupt gestoppt.¹

Die Melatoninspiegel im Plasma und im Speichel sind über den gesamten zirkadianen Rhythmus korreliert. Die Melatoninkonzentration im Speichel entspricht im Durchschnitt etwa einem Drittel der Konzentration im Serum.³

Dim-light Melatonin-Onset (DLMO) kann durch den Anstieg der Melatoninkonzentration im Serum/Plasma, Speichel bzw. Urin definiert werden. Ein absoluter Schwellenwert des Melatoninspiegels ist nicht unbedingt die beste Methode zur Bestimmung der DLMO. Für unseren Melatonin-Speichel-Test empfehlen wir das folgende Verfahren nach Benloucif et. al.⁴ : Die Proben sollten alle 30 bis 60 Minuten unter schwachem Licht (< 30 Lux) mindestens eine Stunde lang vor und während des erwarteten Melatonin-Anstiegs entnommen werden. Die DLMO kann dann als die erste Probe berechnet werden, die das Doppelte der Standardabweichung (2 SD) der ersten drei Basislinienproben überschreitet.

Untersuchungen des Melatoninspiegels werden im Allgemeinen an gesunden menschlichen Populationen durchgeführt.

Es wurde berichtet, dass Veränderungen im Melatoninspiegel und Veränderungen im Sekretionsmuster zusammenfallen mit: Schlafqualität,⁵ Schlaflosigkeit,⁶ Tagesschläfrigkeit,⁷ Jetlag,⁸ Depressionen,⁹ oxidativem Stress,¹⁰ Schwangerschaft,¹¹ und Blindheit.¹²

3. TESTPRINZIP

Kompetitiver Enzymimmunoassay (ELISA). Das biotinylierte Antigen (Biotin) und das nicht biotinylierte Antigen (Probe) konkurrieren um die begrenzte Anzahl an Bindungsstellen des an die Wells der Mikrotiterstreifen gebundenen Antikörpers. Nach der Inkubation wird das nicht gebundene biotinylierte Antigen durch Waschen entfernt. Das antikörpergebundene biotinylierte Antigen wird durch Streptavidinperoxidase als Marker und TMB als Substrat bestimmt. Die Intensität der gebildeten Farbe nach der Substratreaktion ist umgekehrt proportional zur Antigen-Konzentration in den Proben. Die Ergebnisse der Proben können direkt anhand der Standardkurve bestimmt werden.

4. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Nur zum In-vitro-Gebrauch. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
2. Vor der Testdurchführung sollte die Arbeitsanleitung vollständig und sorgfältig gelesen werden und verstanden worden sein. Die gültige Version aus dem Kit verwenden.
3. Im Falle einer erheblichen Beschädigung der Testpackung ist der Hersteller bzw. der jeweilige Lieferant innerhalb einer Woche nach Empfang der Ware schriftlich zu benachrichtigen. Beschädigte Komponenten dürfen nicht zur Testdurchführung verwendet werden, sondern sollten solange aufbewahrt werden, bis der Transportschaden endgültig geregelt ist.
4. Zerbrochenes Glas kann zu Verletzungen führen. Vorsicht bei Glasgefäßen.
5. Chargen-Nummer und Verfallsdatum beachten. Es dürfen keine Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen in einem Test verwendet werden. Verfallene Reagenzien dürfen nicht verwendet werden.
6. Gute Laborpraxis und Sicherheitsrichtlinien beachten. Je nach Bedarf sollten Laborkittel, Einmal-Latexhandschuhe und Schutzbrillen getragen werden.
7. Reagenzien dieses Kits, die Gefahrstoffe enthalten, können Reizungen der Augen und der Haut hervorrufen. Siehe Angaben in KOMPONENTEN DES KITS und auf den Etiketten. Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt vom Hersteller erhältlich.
8. Chemikalien und vorbereitete, gebrauchte, ungebrauchte oder ablaufende Reagenzien sind unter Beachtung der jeweiligen nationalen Bestimmungen als Gefahrstoffabfall zu entsorgen.
9. Das Reinigungspersonal ist durch das Fachpersonal bezüglich möglicher Gefahren und Umgang anzuleiten.
10. Alle schwerwiegenden Zwischenfälle im Zusammenhang mit diesem Produkt sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaates zu melden, in dem der Anwender und/oder der Patient niedergelassen ist.

11. Das Produkt enthält Material tierischen Ursprungs, das nachweislich frei von infektiösen oder ansteckenden Krankheiten und schädlichen Parasiten ist. Dennoch sollte das Material mit äußerster Vorsicht gehandhabt werden.
12. Kontakt mit Stopplösung vermeiden. Kann Hautreizungen und Verätzungen hervorrufen.

5. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Der Kit wird bei Umgebungstemperatur angeliefert und sollte bei 2 - 8 °C gelagert werden. Vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung schützen. Hinweise zur Lagerung und Haltbarkeit der Proben und vorbereiteten Reagenzien sind den entsprechenden Kapiteln zu entnehmen.
Die Mikrotiterplatte ist auch nach dem Öffnen der Verpackung bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar, wenn der Beutel sorgfältig wieder verschlossen und bei 2 - 8 °C gelagert wird.

6. PROBENGEWINNUNG UND -AUFBEWAHRUNG

Probengewinnung

Der Patient sollte 30 min vor der Probenahme nicht essen, trinken, Kaugummi kauen oder Zähne putzen. Salivaproben nicht bei Krankheiten, Entzündungen oder Verletzungen der Mundhöhle sammeln (Blutkontamination). Eine rötliche Probe deutet auf Kontamination hin und führt zu falschem Ergebnis. Mindestens 48 Stunden vor der Probenentnahme sollten Patienten keine biotinhaltige Multivitamine oder Nahrungsergänzungsmittel einnehmen.
5 Minuten vor der Probenahme den Mund gründlich mit kaltem Wasser spülen. Der Speichelfluss kann durch Kauen auf Parafilm® stimuliert werden.
Salivaproben können in geeigneten Sammelgefäßen gesammelt werden. Probensammelgefäße, die Zellulose-Pads enthalten, sollten nicht verwendet werden.
Es sollten mindestens 0,5 ml Flüssigkeit gesammelt werden.
Es wird empfohlen, die Speichelproben vor der Testdurchführung bei -20 °C einzufrieren und nach dem Auftauen zu mischen und bei 2000 - 3000 x g zu zentrifugieren (um Partikel zu entfernen).

Probenaufbewahrung

Speichelproben können bei Raumtemperatur für 1 Tag oder bei 2 - 8 °C für 7 Tage gelagert werden. Für längere Lagerung (< 6 Monate) wird empfohlen die Proben bei -20 °C einzufrieren. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden.
Vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung schützen.

7. KOMPONENTEN DES KITS

BA E-3431 96 **Microtiter Platte**

Inhalt: Wells einzeln abbrechbar. Beschichtet mit anti-Kaninchen IgG (Ziege, polyklonal).
Volumen: 12 x 8 Wells

Standards und Kontrollen - gebrauchsfertig
Genaue Konzentrationen siehe Etiketten oder QC-Report.

Art. - Nr.	Komponente	Konzentration (pg/ml)	Volumen / Fläschchen
BA E-3401	STANDARD A	0	10 ml
BA E-3402	STANDARD B	0,5	1 ml
BA E-3403	STANDARD C	1,5	1 ml
BA E-3404	STANDARD D	5,0	1 ml
BA E-3405	STANDARD E	15,0	1 ml
BA E-3406	STANDARD F	50,0	1 ml
BA E-3451	CONTROL 1	Konzentrationen /	1 ml
BA E-3452	CONTROL 2	Akzeptanzbereiche siehe QC-Report.	1 ml

Inhalt: Stabilisatoren.

BA E-3410 MEL-AS **Melatonin Antiserum** - gebrauchsfertig

Inhalt: Antiserum (Kaninchen, polyklonal), Stabilisatoren.

Volumen: 1 x 7 ml

BA E-3441 BIOTIN **Melatonin Biotin** - gebrauchsfertig

Inhalt: Stabilisatoren.

Volumen: 1 x 12 ml

BA E-3440 CONJUGATE **Enzymkonjugat** - gebrauchsfertig

Inhalt: Streptavidin konjugiert mit HRP, Stabilisatoren.

Volumen: 1 x 12 ml

BA E-3430 WASH-CONC 20x **Waschpuffer** - Konzentrat (20x)

Inhalt: Phosphatpuffer, Tween, Stabilisatoren.

Volumen: 1 x 50 ml

BA E-3455 SUBSTRATE **TMB Substratlösung** - gebrauchsfertig

Inhalt: TMB, Puffer, Stabilisatoren.

Volumen: 1 x 15 ml

BA E-3480 STOP-SOLN **TMB Stopplösung** - gebrauchsfertig

Inhalt: 1M H₂SO₄

Volumen: 1 x 15 ml

Mögliche
Gefahren:



H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

3 x Haftklebefolie

8. ZUSÄTZLICHES MATERIAL (NICHT IM KIT ENTHALTEN)

1. Pipetten (Multipipette Eppendorf oder vergleichbare Produkte, < 3 % VK). Volumina: 50: 100 µL
2. Geeignete Probenabnahmegefäße verwenden.
3. Orbitalschüttler (400 - 600 U/min)
4. Vortex-Mischer
5. 8-Kanal Mikropipette mit Reagenziengefäßen
6. Waschflasche, automatisches oder halbautomatisches Waschsysteem für Mikrotiterplatten
7. Zentrifuge (vorzugsweise mit Kühlung) 2000 - 3000 x g
8. Messgerät für Mikrotiterplatten zur Messung der Absorption bei 450 nm (Referenzwellenlänge 600 - 650 nm)
9. Bidest. oder deionisiertes Wasser
10. Papiertücher, Pipettenspitzen, Stoppuhr
11. Kühlschrank (2 - 8 °C)

9. HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG

1. Fehler bei der Handhabung der Proben oder Abweichungen von der beschriebenen Testdurchführung können die Ergebnisse verfälschen. Die angegebenen Pipettier volumina, Inkubationszeiten, Temperaturen und Vorbereitungsschritte sind unbedingt gemäß Arbeitsanleitung einzuhalten. Nur kalibrierte Pipetten und Geräte verwenden.
2. Sobald mit der Testdurchführung begonnen wird, sollten alle Arbeitsschritte ohne Unterbrechung durchgeführt werden. Es ist sicherzustellen, dass alle benötigten Reagenzien, Geräte und Hilfsmittel zur rechten Zeit zur Verfügung stehen. Alle Reagenzien und Proben müssen auf Raumtemperatur (18 - 25 °C) gebracht und vor Gebrauch vorsichtig ohne Schaumbildung gemischt werden.

3. Kontaminationen der Reagenzien, Pipetten und Wells/Röhrchen sind zu vermeiden. Neue Einmal-Pipettenspitzen für jede zu pipettierende Komponente und jede Probe verwenden. Die Deckel der Fläschchen nicht vertauschen. Nicht benötigte Fläschchen immer verschlossen halten. Wells/Röhrchen oder Reagenzien dürfen nicht wiederverwendet werden.
4. Es wird empfohlen, Doppelbestimmungen durchzuführen, um eventuelle Pipettierfehler zu erkennen.
5. Es sollte ein Pipettierschema verwendet werden um die Identifikation der Standards und Proben auf der Platte sicherzustellen.
6. Die Inkubationszeiten beeinflussen die Ergebnisse. Bei jedem Pipettierschritt sollten alle Wells in der gleichen Reihenfolge und im gleichen Zeittakt behandelt werden. Die Verwendung einer 8-Kanal-Mikropipette zum Pipettieren in alle Wells wird empfohlen.
7. Die korrekte Durchführung der Waschschriffe ist entscheidend. Ungenügend gewaschene Wells ergeben falsche Ergebnisse. Die Verwendung einer Multikanalpipette oder eines automatischen Waschsysterns für Mikrotiterplatten wird empfohlen. Zwischen den Inkubationen die Wells nicht austrocknen lassen. Beim Waschen und Ausschütteln dürfen die beschichteten Wells nicht beschädigt werden. Alle Reagenzien müssen daher mit Vorsicht pipettiert werden. Beim Waschvorgang ist es wichtig, dass alle Wells vollständig und gleichmäßig mit Waschpuffer gefüllt werden und nach dem Ausschütteln kein Rückstand an Flüssigkeit zurückbleibt.
8. Feuchtigkeit beeinflusst die beschichteten Wells/Röhrchen. Verpackung nicht öffnen bevor Raumtemperatur erreicht ist. Nicht benötigte Wells/Röhrchen sofort in den wieder verschließbaren Beutel mit Trockenmittel zurückgeben.
9. Die Erdbeschleunigung einer Zentrifuge (g) entspricht nicht der Umdrehungszahl (U/min), sondern muss in Abhängigkeit vom Rotordurchmesser der verwendeten Zentrifuge berechnet werden.

10. TESTVORBEREITUNGEN

Der Inhalt des Kits für 96 Bestimmungen kann in 3 Läufe aufgeteilt werden.
Die unten angegebenen Volumina sind für einen Lauf mit 4 Streifen (32 Bestimmungen).
Die Verwendung von Thimerosal sollte in jedem Fall vermieden werden.

10.1 Vorbereitung konzentrierter Komponenten

Waschpuffer

Verdünne 10 ml *Waschpuffer* mit bidest. Wasser auf ein Endvolumen von 200 ml (Verhältnis 1:20).
Gründlich mischen.
Lagerung: 2 - 8 °C
Haltbarkeit: 4 Wochen

10.2 Probenverdünnung

Werte > 50 pg/ml (Standard F) müssen mit Standard A in den linearen Bereich der Standardkurve hinein verdünnt werden, z.B. durch eine Verdünnung von 1:10 (Beispiel: 50 µL Saliva + 450 µL Standard A). Die Verdünnung sollte in Glasröhrchen erfolgen. Die Messergebnisse müssen mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden, um die tatsächlichen Ergebnisse zu erhalten.
Werte < 0 pg/ml sollten durch eine Bestätigungsmessung wiederholt werden.
Ein zusätzlicher Standard A mit 100 ml kann separat bestellt werden.

11. TESTDURCHFÜHRUNG

1. Je 100 µl der Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Wells der Mikrotiterplatte pipettieren.
2. Je 50 µl Melatonin Antiserum in jedes Well pipettieren. Platte mit Haftklebefolie abdecken und für 10 Sekunden vorsichtig schütteln.
3. 16 - 20 h bei 2 - 8 °C inkubieren.
4. Folie entfernen. Inkubationslösung verwerfen. Platte 4 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Restliche Flüssigkeit auf Papiertüchern ausklopfen.
5. Je 100 µl Melatonin Biotinlösung in jedes Well pipettieren. Platte mit neuer Folie abdecken.
6. 2 h bei RT (18 - 25 °C) auf einem Orbitalschüttler (500 rpm) inkubieren.
7. Folie entfernen. Inkubationslösung verwerfen. Platte 4 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Restliche Flüssigkeit auf Papiertüchern ausklopfen.
8. Je 100 µl Enzymkonjugat in jedes Well pipettieren. Platte mit neuer Folie abdecken.
9. 1 h bei RT (18 - 25 °C) auf einem Orbitalschüttler (500 rpm) inkubieren.
10. Folie entfernen. Inkubationslösung verwerfen. Platte 4 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Restliche Flüssigkeit auf Papiertüchern ausklopfen.
11. Je 100 µl TMB Substratlösung in jedes Well pipettieren.
12. 15 min. bei RT (18 - 25 °C) auf einem Orbitalschüttler (500 rpm) inkubieren.
13. Die Substratreaktion durch Zugabe von 100 µl TMB Stopplösung in jedes Well stoppen. Platte kurz schütteln. Farbumschlag von blau nach gelb.
14. Die optische Dichte mit einem Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 600 - 650 nm) innerhalb von 15 min nach dem Pipettieren der Stopplösung messen .

12. AUTOMATISIERUNG

Für offene ELISA-Systeme können automatisierte Protokolle bereitgestellt werden, z.B.: DSX®.

Für weitere Informationen kontaktieren Sie bitte den Hersteller.

Für den Einsatz von Produkten auf einem Automaten ist zwingend eine dokumentierte Validierung, entsprechend der gesetzlichen Vorgaben, durchzuführen und aufrecht zu erhalten. Eine erfolgreiche Validierung des Prozesses ist die Voraussetzung für die diagnostische Verwendung. Die Verantwortung für die Durchführung und Dokumentation der Validierung in Übereinstimmung mit den länderspezifischen Anforderungen trägt die Organisation bzw. Einrichtung.

13. QUALITÄTSKONTROLLE

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn der Test gemäß der vorliegenden Arbeitsanleitung abgearbeitet wurde. Ferner muss der Anwender die GLP-Regeln (Good Laboratory Practice) oder vergleichbare Normen/Gesetze beachten. Anwender und/oder Labor müssen zur Diagnosestellung ein gemäß GLP validiertes System verwenden. Alle Kit-Kontrollen müssen innerhalb der Akzeptanzbereiche, die auf den Etiketten und dem QC-Report angegeben sind, gefunden werden. Wenn die Kriterien nicht erfüllt sind, sind die Ergebnisse ungültig und der Test sollte wiederholt werden. Jedes Labor sollte darüber hinaus eigene bekannte Proben als weitere Kontrollen mitführen. Es wird empfohlen, an den einschlägigen Ringversuchen teilzunehmen.

Bei Abweichungen sind die folgenden Fehlermöglichkeiten zu überprüfen: Haltbarkeit der (vorbereiteten) Reagenzien, Lagerungsbedingungen, Pipetten, Geräte und Hilfsmittel, Inkubationsbedingungen und Waschmethoden.

14. TESTAUSWERTUNG

Die erhaltenen OD der Standards (y-Achse, linear) gegen deren Konzentration (x-Achse, logarithmisch) auftragen, entweder auf semi-logarithmischem Papier oder durch ein entsprechendes Computerprogramm. Bei Verwendung eines Computerprogramms werden die Cubic-Spline-Methode, 4-Parameter-Analyse (linlog) oder Logit-Log-Berechnung empfohlen.

Zur Berechnung der Standardkurve sollten alle Werte der Standards verwendet werden (bei Doppelwerten kann ein offensichtlicher Ausreißerwert eliminiert und stattdessen der plausiblere Einzelwert verwendet werden).

Die Konzentrationen der Proben können direkt von der Standardkurve abgelesen werden.

Die Werte von verdünnten Proben müssen mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Proben, die oberhalb des höchsten Standards gemessen werden, müssen wie in TESTVORBEREITUNGEN beschrieben verdünnt und erneut analysiert werden.

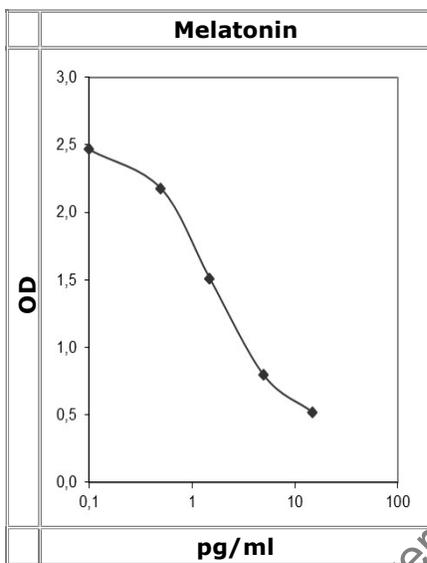
Umrechnung:

Melatonin (pg/ml) x 4,30 = pmol/l

Typische Standardkurve

(Beispiel. Nicht zur Testauswertung verwenden!)

Standard	Melatonin (pg/ml)	OD (Mittelwert)	OD / OD _{max} (%)
A	0	2,666	100
B	0,5	2,464	92
C	1,5	2,176	82
D	5,0	1,506	56
E	15,0	0,794	30
F	50,0	0,519	19



Messbereich: von 0,854 pg/ml (LOQ) bis 50 pg/ml (Standard F)

15. NORMWERTE

Therapeutische Konsequenzen sollten nicht allein aufgrund der mit diesem Test ermittelten Werte getroffen werden, sondern nur unter Berücksichtigung aller klinischen Beobachtungen und weiterer diagnostischer Mittel.

Eine Studie mit offenkundig gesunden Probanden zeigte, dass die Melatonin-Werte durch einem circadianen Rhythmus charakterisiert sind mit sehr geringen Tag-Werten (0 – 8 pg/ml) und hohen Werten während der Nacht (10 – 58 pg/ml). Die Werte zeigten eine ausgeprägte individuelle Variationsbreite. Der nächtliche Melatonin-Gipfel zeigte innerhalb der Individuen erhebliche Unterschiede. Jedes Labor sollte unter Berücksichtigung regionaler Gegebenheiten eigene Normalwertbereiche erstellen.

16. GRENZEN DES VERFAHRENS

Proben von Patienten, die biotinhaltige Multivitamine oder Nahrungsergänzungsmittel einnahmen, können Biotinmengen enthalten, die eine Interferenz mit dem Test verursachen. Die korrekte Durchführung der Probengewinnung und Aufbewahrung ist entscheidend für die Testergebnisse. Näheres siehe PROBENGWINNUNG UND -AUFBEWAHRUNG.

Angaben zu Kreuzreaktivitäten sind im Kapitel TESTCHARAKTERISTIKA zu finden.

Die Verwendung von Thimerosal sollte in jedem Fall vermieden werden.

Die folgenden Substanzen haben bis zu der angegebenen Konzentration keinen signifikanten Einfluss auf die Testergebnisse (+/- 20 %).

Substanz	Konz. in Speichel
Blut	0,125 %
BSA	0,125 %
NaN ₃	0,125 %
Citronensäure	0,01 %

17. TESTCHARAKTERISTIKA

17.1 Analytische Spezifität (Kreuzreaktivität)

Die Kreuzreaktivität des Melatoninantisera wurde gegen verschiedene Verbindungen gemessen.

Die prozentuale Kreuzreaktivität wird als Verhältnis der Melatoninkonzentration, zur Konzentration der reagierenden Verbindung bei 50 % Bindung des Nullstandards angegeben. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Substanz	Kreuzreaktivität (%)
Serotonin	0,54
5-Methoxytryptamine	< 0,01
N-Acetylserotonin	< 0,01
5-Methoxytryptophol	< 0,01

17.2 Nachweisgrenze des Blank (LoB)

Die Studie zur Nachweisgrenze des Blank (LoB) wurde mit dem Nullkalibrator (Standard A) durchgeführt, gemessen in 28-facher Bestimmung in einem Ansatz. Nachweisgrenze des Blank = 0,4 pg/ml.

17.3 Quantifizierungsgrenze (LoQ)

Die Studie zur Nachweisgrenze LoD wurde mit 10 Speichelproben durchgeführt, gemessen in 10-fach Bestimmung in einem Ansatz. Quantifizierungsgrenze = 0,854 pg/ml (VK = 20 %)

17.4 Messtechnische Rückverfolgbarkeit

Die Rückverfolgbarkeit wurde durch den Vergleich der Messergebnisse zwischen dem Melatonin Direct Saliva und LC-MS/MS-Messungen, die von einem zertifizierten, unabhängigen Labor (ZRT-Labor, USA) durchgeführt wurden, nachgewiesen.

Die mit dem Melatonin Direct Saliva ELISA erzielten Ergebnisse sind messtechnisch durch Massenspektrometrie mit 10 Speichel-QC-Proben auf die SI-Einheit pg/ml rückführbar.

Die berechnete maximale Unsicherheit des direkten Melatonin-Speichel-ELISA beträgt 14,7 %.

y = Melatonin Direct Saliva ELISA	y = 0,938x LC-MS/MS + 0,088	r = 0,991
-----------------------------------	-----------------------------	-----------

17.5 Linearität

Die Studie zur Linearität wurde mit fünf verschiedenen Proben, mit unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt, die seriell bis 1:16 verdünnt wurden. Der Assay zeigte ein lineares Verhalten bis zu einer Verdünnung von 1:16.

17.6 Wiederfindung

Die Studie zur Wiederfindung wurde durchgeführt, indem vier verschiedene Konzentrationen in drei verschiedenen Speichelproben gemessen wurden. Den Speichelproben wurden erhöhte Mengen an Melatonin zugesetzt. Alle Proben (aufgestockte und nicht aufgestockte) wurden in Doppelbestimmung untersucht. Die Melatoninkonzentrationen wurden gemessen und die prozentualen Wiederfindungsraten berechnet.

Die mittlere Wiederfindungsrate von Melatonin einschließlich aller Speichelproben betrug 98 % (Bereich 74 - 114 %). Das Verhältnis zwischen erwarteten und gemessenen Melatoninkonzentrationen wich über den untersuchten Konzentrationsbereich nicht signifikant ab.

17.7 Methodenvergleich

Der Vergleich mit einem kommerziellen ELISA ergab, mit 71 gemessenen Speichelproben, eine Korrelation von $r = 0,9899$.

Der Vergleich mit einem Melatonin-RIA ergab, mit 82 gemessenen Speichelproben, eine Korrelation von $r = 0,9539$.

Die Intra-/Interassay-Studie wurde mit zwei Tages- und drei Nacht-Proben (3,5 - 25 pg/ml) unter Verwendung einer Kit-Charge über 20 Tage mit zwei Durchläufen pro Tag und Wiederholung durchgeführt.

Die Intra-Assay-Präzision zeigte einen mittleren CV für Tagesproben (< 8 pg/ml) von 17,0 % (15,0 - 19,0 %) und für Nachtproben (> 10 pg/ml) von 13,9 %, Bereich 13,2 - 14,4 %.

Die Inter-Assay-Präzision zeigte einen mittleren CV für Tagesproben (< 8 pg/ml) von 20,5 % (17,1 - 23,8 %) und für Nachtproben (> 10 pg/ml) von 18,4 %, Bereich 16,5 - 19,7 %.

Zur Bestimmung der Präzision zwischen den Chargen wurde das folgende Studienkonzept mit fünf verschiedenen Proben verwendet: 3 verschiedene Reagenzienchargen / 5 Tage / pro Charge 1 Lauf pro Tag / 5 Wiederholungen pro Lauf

Der Mittelwert zwischen den Chargenschwankungen betrug 13,4 % (Bereich 8,8 - 17,7 %).

18. LITERATUR ÜBER DAS PRODUKT

1. Fink, G., Pfaff, D. & Levine, J. Handbook of Neuroendocrinology. Handbook of Neuroendocrinology (Elsevier Inc., 2012). doi:10.1016/C2009-0-04284-6
2. Klein, D. C. Arylalkylamine N-acetyltransferase: 'The timezyme'. Journal of Biological Chemistry 282, 4233-4237 (2007).
3. Voultsios, A., Kennaway, D. J. & Dawson, D. Salivary melatonin as a circadian phase marker: validation and comparison to plasma melatonin. J. Biol. Rhythms 12, 457-466 (1997).
4. Benloucif, S. et al. Measuring melatonin in humans. J. Clin. sleep Med. JCSM Off. Publ. 4, 66-69 (2008).
5. Jockovich, M., Cosentino, D., Cosentino, L., Wears, R. L. & Seaberg, D. C. Effect of exogenous melatonin on mood and sleep efficiency in emergency medicine residents working night shifts. Acad. Emerg. Med. 7, 955-958 (2000).
6. Almeida Montes, L. G., Ontiveros Uribe, M. P., Cortés Sotres, J. & Heinze Martin, G. Treatment of primary insomnia with melatonin: a double-blind, placebo-controlled, crossover study. J. Psychiatry Neurosci. 28, 191-6 (2003).
7. Rose, D. A. & Kahan, T. L. Melatonin and sleep qualities in healthy adults: pharmacological and expectancy effects. J. Gen. Psychol. 128, 401-21 (2001).
8. Arendt, J. et al. Some effects of jet-lag and their alleviation by melatonin. Ergonomics 30, 1379-1393 (1987).
9. Beck-Friis, J. et al. Serum melatonin in relation to clinical variables in patients with major depressive disorder and a hypothesis of a low melatonin syndrome. Acta Psychiatr. Scand. 71, 319-330 (1985).
10. Miller, E., Walczak, A., Majsterek, I. & Kedziora, J. Melatonin reduces oxidative stress in the erythrocytes of multiple sclerosis patients with secondary progressive clinical course. J. Neuroimmunol. 257, 97-101 (2010).
11. Tamura, H. et al. Melatonin and pregnancy in the human. Reproductive Toxicology 25, 291-303 (2008).
12. Sack, R. L., Lewy, A. J., Blood, M. L. & Nakagawa, H. Circadian rhythm abnormalities in totally blind people: Incidence and clinical significance. J. Clin. Endocrinol. Metab. 75, 127-134 (1992).

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

△ **Aktuelle Literatur oder weitere Informationen zum Test werden Ihnen auf Anforderung von Ihrem Anbieter gerne zu Verfügung gestellt.**

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis	LOT	Chargennummer	IVD	In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	CONT	Inhalt	CE	CE gekennzeichnet
	Achtung	REF	Katalog-Nummer		