

**Instructions for use**  
**Melatonin ELISA**

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

**REF****BA E-3300****IVD****CE**

**1. INTENDED USE**

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of melatonin in human serum and plasma.  
For *in vitro* use only.

**2. SUMMARY AND EXPLANATION**

The pineal gland (corpus pineale) has been called a neuroendocrine transducer because of its important role in photoperiodism. The major hormone of the pineal gland is N-acetyl-5-methoxy-tryptamine or melatonin which is synthesized from the amino acid tryptophane. Melatonin has its highest levels in plasma during nighttime. Its characteristic nocturnal surge appears to encode temporal information such as length of night. Regulation of the melatonin secretion is under neural control. Sympathetic innervation seems to play a major role via its release of noradrenaline. Altered patterns and/or levels of melatonin secretion have been reported to coincide with sleep disorders, jet lag, depression, stress, schizophrenia, hypothalamic amenorrhea, pregnancy, anorexia nervosa, some forms of cancer, immunological disorders as well as control of sexual maturation during puberty.

Most of the circulating melatonin is metabolized in the liver to 6-hydroxymelatonin and subsequently to 6-sulfatoxymelatonin which is excreted into the urine.

The concentration of 6-hydroxymelatonin sulfate in urine correlates well with the total level of melatonin in the blood during the collection period.

**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 streptavidine alkaline phosphatase as marker and p-nitrophenyl phosphate 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. Obey lot number and expiry date. Do not mix reagents of different lots. Do not use expired reagents.
5. Follow good laboratory practice and safety guidelines. Wear lab coats, disposable latex gloves and protective glasses where necessary.
6. Reagents of this kit containing hazardous material may cause eye and skin irritations. See MATERIALS SUPPLIED and labels for details. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from the manufacturer.
7. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to national biohazard and safety guidelines or regulations.
8. The cleaning staff should be guided by the professionals regarding potential hazards and handling.
9. Avoid contact with Stop solution. It may cause skin irritations and burns.
10. All reagents of this kit containing human serum or plasma have been tested and were found negative for anti-HIV I/II, HBsAg and anti-HCV. However, a presence of these or other infectious agents cannot be excluded absolutely and therefore reagents should be treated as potential biohazards in use and for disposal.

**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 sun light. The storage and stability of specimen and prepared reagents is stated in the corresponding chapters.

The microtiter strips are stable up to the expiry date of the kit in the broken, but tightly closed bag when stored at 2 - 8 °C.

After elution with methanol the Extraction Columns may be used for extraction of the next samples or stored at 2 - 8 °C protected from dust. Extraction Columns may be re-used up to 4 times.

## 6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

### Serum, Plasma (EDTA, Heparin)

The usual precautions for venipuncture should be observed. It is important to preserve the chemical integrity of a blood specimen from the moment it is collected until it is assayed. Do not use grossly hemolytic, icteric or grossly lipemic specimens. Samples appearing turbid should be centrifuged before testing to remove any particulate material.

Storage:	2 - 8 °C	≤ -20 °C (aliquots)	≤ -70 °C (aliquots)	Keep away from heat or direct sun light. Avoid repeated freeze-thaw cycles.
Stability:	24 h	3 months	12 months	

## 7. MATERIALS SUPPLIED

▲ The reagents provided with this kit are sufficient for single determinations in the sample preparation (extraction) and duplicates in the assay. Additional reagents are available upon request.

### BA E-3331 96 **Microtiter Plate**

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

Volume: 12 x 8 wells

### BA E-3341 BIOTIN **Melatonin Biotin - lyophilized**

Contents: Stabilizers.

Volume: 3 x 2 ml

### BA E-3310 MEL-AS **Melatonin Antiserum - lyophilized**

Contents: Antiserum (rabbit, polyclonal), stabilizers.

Volume: 3 x 2 ml

### BA E-3340 CONJ CONC 80x **Enzyme Conjugate - concentrate (80x)**

Contents: Streptavidin alkaline phosphatase, Tris buffer, stabilizers.

Volume: 1 x 250 µl

### Standards and Controls - lyophilized

For exact concentrations see vial labels or QC - Report.

Cat. no.	Component	Concentration (pg/ml)	Volume /Vial
BA E-3301	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">A</span>	0.0	2 ml
BA E-3302	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">B</span>	3.0	2 ml
BA E-3303	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">C</span>	10	2 ml
BA E-3304	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">D</span>	30	2 ml
BA E-3305	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">E</span>	100	2 ml
BA E-3306	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span>	300	2 ml
BA E-3351	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CONTROL</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">1</span>	Concentrations / acceptable ranges see QC - Report.	2 ml
BA E-3352	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CONTROL</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">2</span>		2 ml

Contents: Stabilizers.

### BA E-3330 WASH-CONC 10x **Wash Buffer - concentrate (10x)**

Contents: Phosphate buffer.

Volume: 1 x 100 ml

### BA E-3355 SUBSTRATE **PNPP Substrate Solution - ready to use**


Contents: p-nitrophenyl phosphate (PNPP).

Volume: 2 x 13 ml

**BA E-3380**      **STOP-SOLN**      **PNPP Stop Solution** - ready to use

Contents:      1 M NaOH, 0.25 M EDTA

Volume:      1 x 15 ml

Hazard  
identification:      

H290 May be corrosive to metals.  
H303 May be harmful if swallowed.  
H315 Causes skin irritations.  
H319 Causes serious eye irritation.

**BA E-3385**      **EXTR COLM 10x**      **Extraction Columns** - ready to use

Contents:      C18 RP, 1 cm<sup>3</sup> / 100 mg.

Amount:      2 x 10

*Additional extraction columns can be ordered separately.*

3 x Adhesive Foil

**8. MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED**

1. Micropipettes (Multipette Eppendorf or similar devices, < 3 % CV). Volume: 50; 500 µl
2. Disposable glass test tubes or round-bottom polystyrene test tubes (12 x 75 mm)
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; 100-200 x g
8. alternatively: Vacuum manifold (e.g. Mallinckrodt-Baker or Waters)
9. Methanol (HPLC grade)
10. Evaporator centrifuge (Speed-Vac)
11. alternatively: Sample concentrator by use of nitrogen (e.g. Techne)
12. Microtiter plate reader capable of reading absorbance at 405 nm (reference wavelength 600 - 650 nm)
13. Bidistilled or deionised water
14. Paper towels, pipette tips and timer

**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 samples in duplicate 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. Microplate washing is important. Improperly washed wells will give erroneous results. It is recommended to use a multichannel pipette or an automatic microplate 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).

### 10.1 Preparation of lyophilized or concentrated components

#### **Wash Buffer:**

Dilute 15 ml of *Wash Buffer Concentrate* with bidist. water (relation 1:10) to a final volume of 150 ml. Warm up at 37 °C to dissolve crystals, if necessary. Mix vigorously.

Storage: 2 - 8 °C

Stability: 8 weeks

#### **Standards and Controls:**

Dissolve *Standards and Controls* with 2.0 ml bidist. water. Let stand for 15 min. Mix without foaming.

Storage: ≤ -20 °C (aliquots)

Stability: until Exp. date

#### **Biotin:**

Dissolve *Biotin* with 2.0 ml diluted *Wash Buffer*. Let stand for 15 min. Mix without foaming.

Prepare freshly and use only once.

#### **Antiserum:**

Dissolve *Antiserum* with 2.0 ml bidist. water. Let stand for 15 min. Mix without foaming.

Prepare freshly and use only once.

#### **Enzymconjugate:**

Dilute 70 µl *Enzymconjugate* with 5.6 ml diluted *Wash Buffer* (relation 1:81).

Prepare freshly and use only once.

#### **Methanol (diluted)**

Dilute 10 ml *Methanol* (undiluted) with bidest. water to a final volume of 100 ml [relation 10 % (v/v)].

If a larger volume is needed, vials can be pooled. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

### 10.2 Dilution of Samples

Samples suspected to contain concentrations higher than the highest standard have to be diluted with diluted *Wash Buffer* prior to extraction step.

### 10.3 Extraction of Samples, Standards and Controls (Extraction Column)

The yield of extraction with this procedure is approx. 90 - 100 %.

Filter or centrifuge the samples prior to extraction in order to avoid clogging of the columns.

⚠ Each sample, Standard and Control has to be extracted. Extraction may be performed in advance. The dried extracts (after evaporation of methanol) may be stored at 2 - 8 °C or ≤ -20 °C for up to 24 h. After elution with methanol the Extraction Columns may be used for extraction of the next samples or stored at 2 - 8 °C protected from dust. Extraction Columns may be re-used up to 4 times. In case of re-use, start again with A.1 (Column Conditioning).

#### **A. Standard version: Procedure for Centrifuge and Evaporator Centrifuge**

##### **1. Column Conditioning:**

- |   |
|---|
| 1. Place the Extraction Columns into polystyrene or glass tubes (12 x 75 mm).   |
| 2. Add <b>1 x 1 ml</b> of <b>methanol (undiluted)</b> to the columns. Let the solvent pass through the column by centrifugation for 1 min at 120 x g. Discard eluate. |
| 3. Add <b>1 x 1 ml</b> of <b>bidist. water</b> to the columns.<br>Let the solvent pass through the column by centrifugation for 1 min at 120 x g. Discard eluate.     |
| 4. Proceed with sample application without delay in order to avoid the columns getting dry.   |

##### **2. Sample Application:**

- |   |
|---|
| 5. Place the Extraction Columns into correspondingly marked polystyrene or glass tubes (12 x 75 mm).  |
| 6. Add <b>0.5 ml</b> of <b>Standards, Controls and samples</b> to the columns.  |
| 7. Add <b>0.5 ml</b> of <b>bidist. water</b> to the columns.<br>Let pass through the column by centrifugation for 5 min at 120 x g. Discard eluate. |

### 3. Washing:

8. Add **2 x 1 ml** of **10 % methanol in bidist. water (v/v)** to the columns. Let the solvent pass through the column by centrifugation for 5 min at 120 x g. Discard eluate.

### 4. Elution of Extract:

9. Place the Extraction Columns into new, correspondingly marked polystyrene or glass tubes (12 x 75 mm).
10. Add **1 ml of methanol (undiluted)** to the columns.  
Let the solvent pass through the column by centrifugation for 5 min at 120 x g.
11. Remove columns from the tubes. Avoid drops to be left at the columns.  
Use columns for extraction of the next samples or store at 2 - 8 °C protected from dust.  
Extraction Columns may be re-used up to 4 times.

### 5. Evaporation and Reconstitution of Extract:

12. **Evaporate** the methanol **to dryness** by use of evaporator centrifuge.
13. **Reconstitute** samples with **0.15 ml** of **bidist. water**.
14. Vortex at least 1 min and assay immediately.

### B. Alternative version: Procedure for Vacuum Manifold instead of a Centrifuge

For the extraction scheme follow points A 1-5 accordingly. The volumes remain unchanged.

Let the **solvent** pass through the column using vacuum and a flow rate of **≤ 5 ml/min**.

For the **samples** and **extracts** use a flow rate of **≤ 2 ml/min**.

The evaporation of the solvent may be performed by using an evaporator centrifuge or by nitrogen.

## 11. TESTPROCEDURE

1. Pipette **50 µl** of each extracted **Standard**, extracted **Control** and extracted **sample** into the respective wells of the Microtiter Plate.
2. Pipette **50 µl of Melatonin Biotin** into each well.
3. Pipette **50 µl of Melatonin Antiserum** into each well.
4. Cover plate with adhesive foil. Shake plate carefully. **Incubate 14 - 20 h** at **2 - 8 °C**.
5. Remove adhesive foil. Discard incubation solution. Wash plate **3 x** with **250 µl** of diluted **Wash Buffer**. Remove excess solution by tapping the inverted plate on a paper towel.
6. Pipette **150 µl** of freshly prepared **Enzyme Conjugate** into each well.
7. Cover plate with new adhesive foil. **Incubate 120 min** at **RT (18 - 25 °C)** on an orbital shaker (500 rpm).
8. Remove adhesive foil. Discard incubation solution. Wash plate **3 x** with **250 µl** of diluted **Wash Buffer**. Remove excess solution by tapping the inverted plate on a paper towel.
9. For adding of Substrate and Stop Solution use, if available, an 8-channel Micropipettor. Pipetting should be carried out in the same time intervals for Substrate and Stop Solution. Use positive displacement and avoid formation of air bubbles.
10. Pipette **200 µl** of **PNPP Substrate Solution** into each well.
11. **Incubate 40 min** at **RT (18 - 25 °C)** on an orbital shaker (500 rpm).
12. Stop the substrate reaction by adding **50 µl** of **PNPP Stop Solution** into each well. Briefly mix contents by gently shaking the plate.
13. **Measure** optical density with a photometer at **405 nm** (Reference-wavelength: 600 - 650 nm) within **60 min** after pipetting of the Stop Solution.

## 12. 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.

## 13. 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.

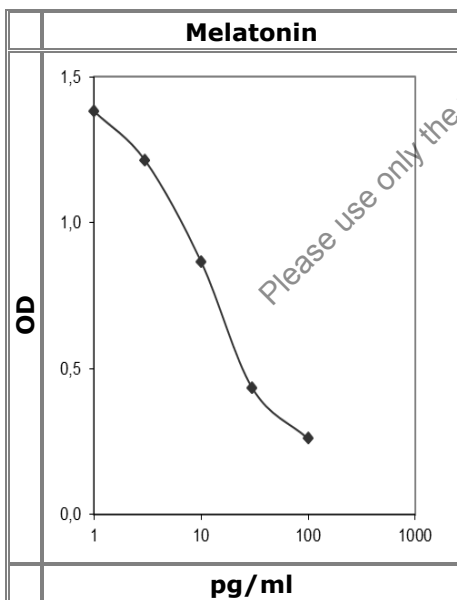
### Conversion:

Melatonin (pg/ml) x 4.30 = pmol/l

### Typical Standard Curve

(Example. Do not use for calculation!)

Standard	Melatonin (pg/ml)	OD (Mean)	OD / OD <sub>max</sub> (%)
A	0.0	1.517	100.0
B	3.0	1.383	91.1
C	10	1.214	80.1
D	30	0.867	57.1
E	100	0.434	28.6
F	300	0.260	17.1



## 14. 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 characterised by very low levels during day-time and high levels during night-time, and show a considerable inter-individual variation. Furthermore, the melatonin concentration is age dependent. The highest concentrations were found in samples of infants (up to 3 years).

In a group of six healthy volunteers the circadian rhythm of melatonin was studied. The mean value reaches a minimum of about 4.6 pg/ml during daytime at 4 p.m. and a maximum of about 77.5 pg/ml during nighttime at 4 a.m. The nocturnal melatonin peak among healthy individuals varies significantly.

### Melatonin in Serum

Apparently healthy subjects show the following values:

Time	n	Mean Melatonin in Serum	90 % percentile
03:00 A.M.	129	78.2 pg/ml	18.5 - 180 pg/ml
08:00 A.M.	128	28.5 pg/ml	3.8 - 80.4 pg/ml

Reference: Terzieva et al. Clin Lab (2009)

It is recommended that each laboratory establishes its own range of normal values.

## 15. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Specimen collection has a significant effect on the test results. See SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE for details.

For cross-reactivities, see PERFORMANCE.

The following blood components do not have a significant effect (+/- 20% of expected) on the test results up to the below stated concentrations:

Hemoglobin	8.0 mg/ml
Bilirubin	0.36 mg/ml

## 16. PERFORMANCE

Analytical Specificity (Cross Reaction)	Substance	Cross Reactivity (%)
		Melatonin
	5-Methoxy-Tryptophole	1.2
	N-Acetyl-Serotonin	1.2
	5-Methoxy-Tryptamine	2.5
Cross-reactivity of other substances tested < 0.01 %		

Analytical Sensitivity (Limit of Detection)	Melatonin
	1.6 pg/ml
	Mean Signal (Zero Standard) - 2 SD

Precision					
Intra-Assay			Inter-Assay		
	Range (pg/ml)	CV (%)		Range (pg/ml)	CV (%)
Melatonin	8.8 - 151.7	3.0 - 11.4	Melatonin	5.6 - 134.3	6.4 - 19.3

Linearity	Range (pg/ml)	Serial dilution up to	Range (%)
	Melatonin	80.7 - 191.4	1:16

Recovery	Mean (%)	Range (%)	% Recovery after spiking
	Melatonin	102.4	

Method Comparison versus RIA	Melatonin	ELISA = 1.01 x RIA + 4.6	r = 0.98; n = 50
------------------------------	-----------	--------------------------	------------------

Method Comparison versus other RIA	Melatonin	ELISA = 0.86 x other RIA + 5.33	r = 0.96; n = 46
------------------------------------	-----------	---------------------------------	------------------









## 17. PRODUCT LITERATURE REFERENCES

1. Terzieva, DD, Mateva ND, Vladimirova-Kitova LG: Melatonin reference limits at 3:00 AM and 8:00 AM in healthy adults. Clin. Lab. 55:359-361 (2009)
2. Iriti, M., Rossoni, M, Faoro F. Melatonin content in grape myth or panacea? J Sci Food Agric 86:1432-1438 (2006)
3. Lahiri, D. K., Ge, Y.-W., Sharman, E. H., Bondy, St. C., Age-related changes in serum melatonin in mice: higher levels of combined melatonin and 6-hydroxymelatonin sulfate in the cerebral cortex than serum, heart, liver and kidney tissues. J. Pineal Res. May 2004, Vol. 36, issue 4, 217-223
4. Sharman E et al. Age-related changes in murine CNS mRNA gene expression are modulated by dietary melatonin. J. Pineal Res. Vol 36, Issue 3: 165ff. (2004)
5. Wagner H.-J. Mattheus U. Pineal organs in deep demersal fish. Cell Tissue Res 307:115-127 (2002)
6. Kunz D et al. Melatonin as a therapy in REM sleep behavior disorder patients: an open-labeled pilot study on the possible influence of melatonin on REM-sleep regulation. Movement Disorders, 14: 507-511 (1999)
7. Pflugler DH, Minder CE. Effects of exposure to 16.7 Hz magnetic fields on urinary 6-hydroxymelatonin sulfate excretion of Swiss railway workers. J. Pineal Res., 21: 91-100 (1996)
8. Follenius M, Weibel L, Brandenberger G. Distinct modes of melatonin secretion in normal men. J. Pineal Res., 18: 135-140 (1995)
9. Dubbels R et al. Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. J. Pineal Res., 18. 28-31 (1995)
10. Czeisler CA et al. Suppression of melatonin secretion in some blind patients by exposure to bright light. N. Engl. J. Med., 332: 6-11 (1995)

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	<b>LOT</b>	Batch code	<b>IVD</b>	For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use	<b>CONT</b>	Content	<b>CE</b>	CE labelled
	Caution	<b>REF</b>	Catalogue number		

## Melatonin ELISA

### 1. ZWECKBESTIMMUNG

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Melatonin in humanem Serum und Plasma.

### 2. KLINISCHE BEDEUTUNG

Das Neurohormon Melatonin gehört zu den Indolaminen und wird im Pinealorgan (= Zirbeldrüse) aus der Aminosäure Tryptophan hergestellt. Die Melatonin-Biosynthese unterliegt einem zirkadianen Rhythmus mit hohen Werten in der Nacht und niedrigen am Tage. Im Dunkeln erfolgt die Ausschüttung von Noradrenalin und dessen Bindung an  $\beta$ -noradrenerge Rezeptoren auf der Pinealocyten-Membran. Da die Enzyme der Melatoninsynthese auch in anderen Geweben auftreten, kann eine Synthese andernorts nicht ausgeschlossen werden. Dennoch wird angenommen, dass der größte Teil des im menschlichen Blut vorliegenden Melatonins aus dem Pinealorgan stammt.

Die Melatoninkonzentration sowie Störungen der Melatonin-Rhythmik werden mit psychischen und Schlafstörungen während Schichtarbeit, jet lag, Depression, Schizophrenie, Anorexia nervosa, malignen Tumoren (Brust-, Blasen- und Prostatakrebs, Zirbeldrüsengeschwulst, Leukämie) sowie der Kontrolle der sexuellen Reifung in der Pubertät in Verbindung gebracht.

Das Hormon wird in der Leber hydroxyliert und als 6-Hydroxymelatonin (-sulfat oder -Glucuronid) im Urin ausgeschieden, wobei auch eine geringe Menge unverändert im Urin nachweisbar ist.

Die Konzentration des Melatonininsulfats im Urin korreliert gut mit der Konzentration von Melatonin im Blut.

### 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 Streptavidin Alkalische Phosphatase als Marker und p-Nitrophenylphosphat 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. Chargen-Nummer und Verfallsdatum beachten. Es dürfen keine Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen in einem Test verwendet werden. Verfallene Reagenzien dürfen nicht verwendet werden.
5. Gute Laborpraxis und Sicherheitsrichtlinien beachten. Je nach Bedarf sollten Laborkittel, Einmal-Latexhandschuhe und Schutzbrillen getragen werden.
6. 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 beim Hersteller erhältlich.
7. Chemikalien und vorbereitete oder gebrauchte Reagenzien sind unter Beachtung der jeweiligen nationalen Bestimmungen als Gefahrstoffabfall zu entsorgen.
8. Das Reinigungspersonal ist durch das Fachpersonal bezüglich möglicher Gefahren und Umgang anzuleiten.
9. Kontakt mit Stopplösung vermeiden. Kann Hautreizungen und Verätzungen hervorrufen.
10. Alle Reagenzien dieses Kits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, ergaben bei der Prüfung auf anti-HCV, HBsAg bzw. Antikörper gegen HIV I/II-Virus ein negatives Ergebnis. Trotzdem kann das Vorhandensein solcher infektiöser Erreger nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.

### 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.

Nach der Elution mit Methanol können die Extraktionssäulen zur Extraktion der nächsten Proben verwendet werden oder bei 2 - 8 °C staubgeschützt gelagert werden. Die Extraktionssäulen können bis zu 4x wiederverwendet werden.

## 6. PROBENGEWINNUNG UND -AUFBEWAHRUNG

### Serum, Plasma (EDTA, Heparin)

Die üblichen Vorsichtsmaßnahmen bei der Blutabnahme sind einzuhalten. Die chemische Integrität der Blutproben muss vom Zeitpunkt der Blutabnahme bis zur Testdurchführung erhalten bleiben. Keine hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben verwenden. Getrübte Proben sollten vor der Testdurchführung zentrifugiert werden, um Partikel zu entfernen.

Lagerung:	2 - 8 °C	≤ -20 °C (aliquotiert)	≤ -70 °C (aliquotiert)	Vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung schützen. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden.
Haltbarkeit:	24 h	3 Monate	12 Monate	

## 7. KOMPONENTEN DES KITS

⚠ Die Reagenzien dieses Kits reichen aus für Einzelbestimmungen in der Probenvorbereitung (Extraktion) und Doppelbestimmungen im Assay. Zusätzliche Reagenzien sind auf Anfrage erhältlich.

**BA E-3331** 96 **Microtiter Platte**  
 Inhalt: Wells einzeln abbrechbar. Beschichtet mit anti-Kaninchen IgG (Ziege, polyklonal).  
 Volumen: 12 x 8 Wells

**BA E-3341** BIOTIN **Melatonin Biotin** - lyophilisiert  
 Inhalt: Stabilisatoren.  
 Volumen: 3 x 2 ml

**BA E-3310** MEL-AS **Melatonin Antiserum** - lyophilisiert  
 Inhalt: Antiserum (Kaninchen, polyclonal), Stabilisatoren.  
 Volumen: 3 x 2 ml

**BA E-3340** CONJ CONC 80x **Enzymkonjugat** - Konzentrat (80x)  
 Inhalt: Streptavidin alkalische Phosphatase, Trispuffer, Stabilisatoren.  
 Volumen: 1 x 250 µl

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

Cat. no.	Komponente	Konzentration (pg/ml)	Volumen /Fläschchen
<b>BA E-3301</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD A</span>	0,0	2 ml
<b>BA E-3302</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD B</span>	3,0	2 ml
<b>BA E-3303</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD C</span>	10	2 ml
<b>BA E-3304</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD D</span>	30	2 ml
<b>BA E-3305</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD E</span>	100	2 ml
<b>BA E-3306</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD F</span>	300	2 ml
<b>BA E-3351</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CONTROL 1</span>	Konzentrationen / Akzeptanzbereiche siehe QC-Report.	2 ml
<b>BA E-3352</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CONTROL 2</span>		2 ml

Inhalt: Stabilisatoren.

**BA E-3330** WASH-CONC 10x **Waschpuffer** - Konzentrat (10x)  
 Inhalt: Phosphatpuffer.  
 Volumen: 1 x 100 ml

**BA E-3355**      **SUBSTRATE**      **PNPP Substratlösung** - gebrauchsfertig

Inhalt:            p-Nitrophenyl-Phosphate (PNPP).

Volumen:        2 x 13 ml

**BA E-3380**      **STOP-SOLN**      **PNPP Stopplösung** - gebrauchsfertig

Inhalt:            1 M NaOH; 0,25 M EDTA

Volumen:        1 x 15 ml

Mögliche  
Gefahren:



H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.  
H303 Kann beim Verschlucken gesundheitsschädlich sein.  
H315 Verursacht Hautreizungen.  
H319 Verursacht schwere Augenreizung.

**BA E-3385**      **EXTR COLM 10x**      **Extraktionssäulen** - gebrauchsfertig

Inhalt:            C18 RP, 1 cm<sup>3</sup> / 100 mg

Menge:            2 x 10

*Zusätzlich benötigte Extraktionssäulen können separat bestellt werden.*

3 x Haftklebefolie

## **8. ZUSÄTZLICHES MATERIAL (NICHT IM KIT ENHALTEN)**

1. Pipetten (Multipette Eppendorf oder vergleichbare Produkte,  $\pm 3$  % VK). Volumina: 50; 500  $\mu$ l
2. Einmal-Glasröhrchen oder Rundboden-Polystyrolröhrchen (12 x 75 mm)
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; 100-200 x g  
*alternativ*: Vakuum Manifold (z.B. Mallinckrodt-Baker oder Waters)
8. Methanol (HPLC-Qualität)
9. Evaporator-Zentrifuge (Speed-Vac)  
*alternativ*: Proben-Konzentrator mit Verwendung von Stickstoff (z.B. Techne)
10. Messgerät für Mikrotiterplatten zur Messung der Absorption bei 405 nm (Referenzwellenlänge 600 - 650 nm)
11. Bidest. oder deionisiertes Wasser
12. Papiertücher, Pipettenspitzen, Stoppuhr

## **9. HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG**

1. Fehler bei der Handhabung der Proben oder Abweichungen von der beschriebenen Testdurchführung können die Ergebnisse verfälschen. Die angegebenen Pipettierolumina, 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 Waschschrirte ist entscheidend. Ungenügend gewaschene Wells ergeben falsche Ergebnisse. Die Verwendung einer Multikanalpipette oder eines automatischen Waschsystems 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).*

### 10.1 Vorbereitung lyophilisierter oder konzentrierter Komponenten

#### **Waschpuffer:**

Verdünne 15 ml *Waschpuffer* mit bidest. Wasser (Verhältnis 1:10) auf ein Endvolumen von 150 ml. Gegebenenfalls auf 37 °C erwärmen, um Kristalle aufzulösen. Gründlich mischen.

Lagerung: 2 - 8 °C

Haltbarkeit: 8 Wochen

#### **Standards und Kontrollen:**

Rekonstituiere die *Standards* und *Kontrollen* mit 2,0 ml bidest. Wasser. 15 Min stehen lassen. Ohne Schaumbildung mischen.

Lagerung: ≤ -20 °C (aliquotiert)

Haltbarkeit: bis Verfalldatum

#### **Biotin:**

Rekonstituiere das *Biotin* mit 2,0 ml *Waschpuffer* (verdünnt). 15 Min stehen lassen. Ohne Schaumbildung mischen.

Frisch herstellen und nur einmal verwenden.

#### **Antiserum:**

Rekonstituiere das *Antiserum* mit 2,0 ml bidest. Wasser. 15 Min stehen lassen. Ohne Schaumbildung mischen.

Frisch herstellen und nur einmal verwenden.

#### **Enzymkonjugat:**

Verdünne 70 µl *Enzymkonjugat* mit 5,6 ml *Waschpuffer* (verdünnt) (Verhältnis 1:81).

Frisch herstellen und nur einmal verwenden.

#### **Methanol (verdünnt):**

Verdünne 10 ml *Methanol* (unverdünnt) mit bidest. Wasser auf ein Endvolumen von 100 ml [Verhältnis 10 % (v/v)].

Wenn eine größere Menge benötigt wird, können Fläschchen gepoolt werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden.


### 10.2 Probenverdünnung

Proben mit einer erwarteten Konzentration über dem höchsten Standard müssen mit verdünntem Waschpuffer vor dem Extraktionsschritt verdünnt werden.

### 10.3 Extraktion der Proben, Standards und Kontrollen (Extraktionssäule)

Die Ausbeute der Extraktion mit diesem Verfahren ist ca. 90 - 100 %.

Die Proben sollten vor der Extraktion filtriert oder zentrifugiert werden, um eine Verstopfung der Säulen zu vermeiden.

 *Jede Probe, jeder Standard und jede Kontrolle muss extrahiert werden. Die Extraktion kann im Voraus durchgeführt werden. Die getrockneten Extrakte (nach Entfernen des Methanols) können bei 2 - 8 °C oder ≤ -20 °C für bis zu 24 h gelagert werden.*

*Nach der Elution mit Methanol können die Extraktionssäulen unmittelbar für die nächsten Proben verwendet oder bei 2 - 8 °C vor Staub geschützt gelagert werden. Die Extraktionssäulen können bis zu 4x wiederverwendet werden. Vor einer Wiederverwendung mit Schritt A1 (Säulenconditionierung) starten.*

## A. Standardversion: Durchführung mit Zentrifuge und Evaporator-Zentrifuge

### 1. Säulenkonditionierung:

1. Eine Extraktionssäule pro Standard, Kontrolle und Probe in ein Glas- oder Polystyrolröhrchen (12 x 75 mm) stecken.
2. Je **1 x 1 ml Methanol (unverdünnt)** auf die Säulen geben. Je 1 min bei 120 x g zentrifugieren. Eluat verwerfen.
3. Je **1 x 1 ml bidest. Wasser** auf die Säulen geben. Je 1 min bei 120 x g zentrifugieren. Eluat verwerfen.
4. Um ein Austrocknen der Säulen zu verhindern, muss sofort nach dem Konditionieren mit dem Auftragen der Proben begonnen werden.

### 2. Auftragen der Proben:

5. Säulen in entsprechend beschriftete Polystyren- oder Glasröhrchen (12 x 75 mm) stecken.
6. **0,5 ml** der Standards, Kontrollen und Proben auf die entsprechenden Säulen geben.
7. **0,5 ml bidest Wasser** auf die Säulen geben. Je 5 min bei 120 x g zentrifugieren. Eluat verwerfen.

### 3. Waschen:

8. **2 x 1 ml 10 % Methanol in bidest. Wasser (v/v)** auf die Säulen geben. Je 5 min bei 120 x g zentrifugieren. Eluat verwerfen.

### 4. Elution des Extrakts:

9. Säulen in saubere, entsprechend beschriftete Polystyren- oder Glasröhrchen (12 x 75 mm) stecken.
10. **1 ml Methanol (unverdünnt)** auf die Säulen geben. Je 5 min bei 120 x g zentrifugieren.
11. Säulen aus den Röhrchen entfernen; dabei eventuell an den Säulen hängende Tropfen des Extrakts an der Röhrchenwand abstreifen.  
Extraktionssäulen unmittelbar für die nächsten Proben verwenden oder bei 2 - 8 °C vor Staub geschützt lagern. Die Extraktionssäulen können bis zu 4 x wiederverwendet werden.

### 5. Evaporation und Rekonstitution der Extrakte:

12. Das Methanol mit Hilfe einer Evaporator-Zentrifuge bis zur Trockne **einengen**.
13. Die Proben in **0,15 ml bidest. Wasser rekonstituieren**.
14. Mind. 1 min. vortexen und sofort im Assay einsetzen.

## B. Alternative Version: Durchführung mit Vakuum-Extraktionssystem statt einer Zentrifuge

Das Extraktionsschema erfolgt analog der Punkte A-5. Die Volumina bleiben unverändert.

Die Durchflussrate für die **Lösungsmittel** sollte **< 5 ml/min** betragen.

Für die **Proben** und **Extrakte** eine Durchflussrate von **< 2 ml/min** verwenden.

Das Verdampfen des Lösungsmittels erfolgt entweder mit Hilfe einer Evaporator-Zentrifuge oder durch Einleiten von Stickstoff.

## 11. TESTDURCHFÜHRUNG

1. Je <b>50 µl</b> der <u>extrahierten Standards</u> , <u>extrahierten Kontrollen</u> und <u>extrahierten Proben</u> in die entsprechenden Wells der Mikrotiterplatte pipettieren.
2. Je <b>50 µl Melatonin Biotin</b> in jedes Well pipettieren.
3. Je <b>50 µl Melatonin Antiserum</b> in jedes Well pipettieren.
4. Platte mit Haftklebefolie abdecken. Platte vorsichtig schütteln. <b>14 - 20 h</b> bei <b>2 - 8 °C inkubieren</b> .
5. Folie entfernen. Inkubationslösung verwerfen. Platte <b>3 x</b> mit je <b>250 µl</b> verdünntem <b>Waschpuffer</b> waschen. Restliche Flüssigkeit auf Papiertüchern ausklopfen.
6. Je <b>150 µl</b> frisch hergestelltes <b>Enzymkonjugat</b> in jedes Well pipettieren.
7. Platte mit neuer Folie abdecken. <b>120 min</b> bei <b>RT (18 - 25 °C)</b> auf einem Orbitalschüttler (500 rpm) <b>inkubieren</b> .
8. Folie entfernen. Inkubationslösung verwerfen. Platte <b>3 x</b> mit je <b>250 µl</b> verdünntem <b>Waschpuffer</b> waschen. Restliche Flüssigkeit auf Papiertüchern ausklopfen.
9. Substrat- und Stopplösung möglichst mit einer 8-Kanal-Pipette pipettieren und Substrat- und Stopplösung in denselben Zeitintervallen zugeben. Mit positivem Vorhub pipettieren, um die Bildung von Luftbläschen zu vermeiden.
10. Je <b>200 µl PNPP Substratlösung</b> in jedes Well pipettieren.
11. <b>40 min</b> bei <b>RT (18 - 25 °C)</b> auf einem Orbitalschüttler (500 rpm) <b>inkubieren</b> .
12. Die Substratreaktion durch Zugabe von <b>50 µl PNPP Stopplösung</b> in jedes Well stoppen. Platte kurz schütteln.
13. Die optische Dichte mit einem Photometer bei <b>405 nm</b> (Referenzwellenlänge: 600 - 650 nm) innerhalb <b>60 min</b> nach dem Pipettieren der Stopplösung <b>messen</b> .

## 12. 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.

## 13. 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 plausible 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.

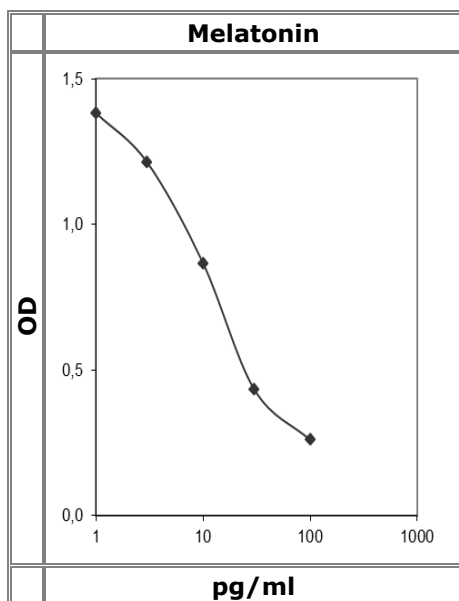
Umrechnung:

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

**Typische Standardkurve**

(Beispiel. Nicht zur Testauswertung verwenden!)

Standard	Melatonin (pg/ml)	OD (Mittelwert)	OD / OD <sub>max</sub> (%)
A	0,0	1,517	100,0
B	3,0	1,383	91,1
C	10	1,214	80,1
D	30	0,867	57,1
E	100	0,434	28,6
F	300	0,260	17,1



**14. 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.

Die Melatoninkonzentrationen im Menschen unterliegen einem circadianen Rhythmus und zeigen eine ausgeprägte individuelle Variationsbreite. Nachtwerte mit einem Maximum zwischen 1 und 4 Uhr liegen in der Regel deutlich höher als Tagwerte. Die Melatoninkonzentration ist zudem abhängig vom Lebensalter. Bei Säuglingen und Kleinkindern (bis 3 Jahren) wurden die höchsten Konzentrationen festgestellt.

In einer Studie wurden 6 gesunde Probanden hinsichtlich ihres circadianen Rhythmus des Melatonins im Serum untersucht. Die Melatoninkonzentration der gesamten Gruppe erreichte ein Minimum um 16 Uhr mit 4,6 pg/ml und ein Maximum um 4 Uhr mit 77,5 pg/ml im Durchschnitt.

Der nächtliche Melatonin-Gipfel zeigte innerhalb der Individuen erhebliche Unterschiede.

**Melatonin in Serum**

Augenscheinlich gesunde Spender zeigten die folgenden Normwerte:

Uhrzeit	n	Mittelwert Melatonin in Serum	90 % Perzentile
03:00 A.M.	129	78,2 pg/ml	18,5 - 180 pg/ml
08:00 A.M.	128	28,5 pg/ml	3,8 - 80,4 pg/ml

Reference: Terzieva et al. Clin Lab (2009)

Jedes Labor sollte unter Berücksichtigung regionaler Gegebenheiten eigene Normalwertbereiche erstellen.



## 15. GRENZEN DES VERFAHRENS

Die korrekte Durchführung der Probengewinnung ist entscheidend für die Testergebnisse. Näheres siehe PROBENGEWINNUNG UND -AUFBEWAHRUNG.

Angaben zu Kreuzreaktivitäten sind im Kapitel TESTCHARAKTERISTIKA zu finden.

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

Hämoglobin	8,0 mg/ml
Bilirubin	0,36 mg/ml

## 16. TESTCHARAKTERISTIKA

Analytische Spezifität (Kreuzreaktivität)	Substanz	Kreuzreaktivität (%)
		Melatonin
	5-Methoxy-Tryptophol	1,2
	N-Acetyl-Serotonin	1,2
	5-Methoxy-Tryptamin	2,5
Kreuzreaktivität aller anderen getesteten Substanzen < 0,01 %		

Analytische Sensitivität (Nachweisgrenze)	Melatonin
	1,6 pg/ml
	Mittleres Signal (Nullstandard) - 2 SD

Präzision					
Intra-Assay			Inter-Assay		
	Bereich (pg/ml)	VK (%)		Bereich (pg/ml)	VK (%)
Melatonin	8,8 - 151,7	3,0 - 11,4	Melatonin	5,6 - 134,3	6,4 - 19,3

Linearität		Bereich (pg/ml)	Höchste Verdünnungsstufe	Bereich (%)
	Melatonin	80,7 - 191,4	1:16	73 - 135

Wiederfindung		Mittelwert (%)	Bereich (%)	% Wiederfindung nach Spiken
	Melatonin	102,4	83 - 125	

Methodenvergleich versus RIA	Melatonin	ELISA = 1,01 x RIA + 4,6	r = 0,98; n = 50
------------------------------	-----------	--------------------------	------------------

Methodenvergleich versus anderer RIA	Melatonin	ELISA = 0,86 x anderer RIA + 5,33	r = 0,96; n = 46
--------------------------------------	-----------	-----------------------------------	------------------







## 17. LITERATUR ÜBER DAS PRODUKT

1. Terzieva, DD, Mateva ND, Vladimirova-Kitova LG: Melatonin reference limits at 3:00 AM and 8:00 AM in healthy adults. Clin. Lab. 55:359-361 (2009)
2. Iriti, M., Rossoni, M, Faoro F. Melatonin content in grape myth or panacea? J Sci Food Agric 86:1432-1438 (2006)
3. Lahiri, D. K., Ge, Y.-W., Sharman, E. H., Bondy, St. C., Age-related changes in serum melatonin in mice: higher levels of combined melatonin and 6-hydroxymelatonin sulfate in the cerebral cortex than serum, heart, liver and kidney tissues. J. Pineal Res. May 2004, Vol. 36, issue 4, 217-223
4. Sharman E et al. Age-related changes in murine CNS mRNA gene expression are modulated by dietary melatonin. J. Pineal Res. Vol 36, Issue 3: 165ff. (2004)
5. Wagner H.-J. Mattheus U. Pineal organs in deep demersal fish. Cell Tissue Res 307:115-127 (2002)
6. Kunz D et al. Melatonin as a therapy in REM sleep behavior disorder patients: an open-labeled pilot study on the possible influence of melatonin on REM-sleep regulation. Movement Disorders, 14: 507-511 (1999)
7. Pflugger DH, Minder CE. Effects of exposure to 16.7 Hz magnetic fields on urinary 6-hydroxymelatonin sulfate excretion of Swiss railway workers. J. Pineal Res., 21: 91-100 (1996)
8. Follenius M, Weibel L, Brandenberger G. Distinct modes of melatonin secretion in normal men. J. Pineal Res., 18: 135-140 (1995)
9. Dubbels R et al. Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. J. Pineal Res., 18. 28-31 (1995)
10. Czeisler CA et al. Suppression of melatonin secretion in some blind patients by exposure to bright light. N. Engl. J. Med., 332: 6-11 (1995)

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	<b>LOT</b>	Chargennummer	<b>IVD</b>	In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	<b>CONT</b>	Inhalt	<b>CE</b>	CE gekennzeichnet
	Achtung	<b>REF</b>	Katalog-Nummer		