

Інструкція з використання



IBL International GmbH

Flughafenstraße 52 a
22335 Гамбург,
Німеччина

Тел. +49 (0) 40 53 28 91-0
Факс +49 (0) 40 53 28 91-11

IBL@tecan.com
www.tecan.com/ibl

Мелатонін прямий, слина ІФА

Імуноферментний аналіз для прямого кількісного визначення мелатоніну в слині людини.



REF RE54041

 **96**

  **2°C**  **8°C**

EU: **IVD** **CE**
2797

Уповноважений представник: ТОВ «АЙ ВІ СЕТ», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@ivset.ua www.ivset.ua



IBL International GmbH
Flughafenstrasse 52a
22335 Гамбург, Німеччина

Always there for you



ІСТОРІЯ ПЕРЕГЛЯДУ ІНСТРУКЦІЇ З ВИКОРИСТАННЯ**Зміни від попередньої версії 2020-10 до актуальної версії 2023-11**

| Титульна сторінка | Зміна макету | |
|-------------------|---------------------------------------|--|
| Розділ 2 | Додатковий розділ: ПРИЗНАЧЕННЯ | |
| Розділ 3 | Оновлення до наукової обґрунтованості | |
| Розділ 5 | Додаткова інформація | |
| Розділ 6 | Оновлення / Додаткова інформація | |
| Розділ 7 | Оновлення / Додаткова інформація | |
| Розділ 8 | Оновлення / Додаткова інформація | |
| Розділ 15 | оновлення | |
| Розділ 16 | Оновлення та додаткові дані | |
| Розділ 17 | оновлення | |
| Розділ 18 | оновлення | |
| Розділ 20 | Актуалізація літератури | |
| Сторінка символів | Зміна макету | |

1. ВИКОРИСТАННЯ ЗА ПРИЗНАЧЕННЯМ

Імуноферментний аналіз для прямого кількісного визначення мелатоніну в слині людини.

2. ПРИЗНАЧЕННЯ

Імуноферментний аналіз для прямого кількісного визначення мелатоніну в слині людини. Кількісне визначення мелатоніну вказує на фізіологічні функції або стан шишкоподібної залози, яка регулює цикли сну та неспання. Цей тест використовується як допоміжний засіб для діагностики розладів сну. Популяція пацієнтів включає здорових осіб та осіб, у яких є підозра на розлади сну. Аналіз не слід проводити із зразками пацієнтів, на які може вплинути екзогенний мелатонін, або зразками, на які можуть впливати препарати, які взаємодіють з метаболізмом мелатоніну.

Тест-набір призначений для професійного лабораторного використання навченим персоналом. Тестовий набір не призначений для використання вдома чи непрофесіоналом. Тест-набір призначений для ручного використання або може бути адаптований до різних відкритих платформних процесорів ІФА та може застосовуватися до відкритих автоматизованих платформ.

3. ПІДСУМКИ ТА ПОЯСНЕННЯ

Мелатонін є проміжним продуктом метаболізму триптофану і вивільняється в кров з епіфіза. Виробництво мелатоніну регулюється системою циркадного часу. У здорових людей він виробляється синхронно з циклом світло/темрява, суворо обмежуючись ніччю, якщо темно. Світловий подразник (переважно синього кольору) пригнічує синтез мелатоніну. Роль як фізіологічного маркера була задокументована в оглядових статтях [1-7] і підручниках [8-10]. Концентрація мелатоніну відіграє важливу роль у регуляції режиму сну. Початок вироблення мелатоніну в організмі людини можна оцінити за допомогою приглушеного світла мелатоніну (DLMO). DLMO дозволяє охарактеризувати секрецію циркадного ритму в кількох матрицях (таких як слина). У практично здорових людей DLMO виникає за 2-3 години до сну.

Порушення здорового режиму сну (вплив яскравого світла в нічний час або участь у нічній зміні) може змінити DLMO та призвести до випередження або затримки фази концентрації мелатоніну в зразку. Мелатонін слини є корисним біомаркером циркадної дисрегуляції через позмінну роботу або вплив яскравого світла вночі. Крім того, кількісне визначення рівня мелатоніну з визначенням часу може надати інформацію про денний тип (ранок проти вечора).[11]

Концентрація мелатоніну в кровообігу сильно варіює. Протягом дня рівень мелатоніну дуже низький. Вночі концентрація мелатоніну підвищується. Ілюстративні приклади концентрації мелатоніну можна знайти в науковій літературі, наприклад, у публікаціях Ба-Алі та ін. [12]. та Wiesner та ін. [13].

Велика різноманітність методів оцінки початку вироблення мелатоніну призвела до формування експертної групи для розробки рекомендацій щодо розрахунку початку секреції мелатоніну. Лабораторії повинні дотримуватися узгоджених рекомендацій щодо отримання даних для циркадної стимуляції ритму. Benloucif та ін. опублікували консенсусну заяву щодо вимірювання мелатоніну в організмі людини в різних матрицях (таких як слина).[3] Кілька методів отримання DLMO у консенсусній заяві Benloucif та ін.[3] Наприклад, DLMO можна визначити за допомогою порогового значення, розрахованого на 2 стандартні відхилення вище середнього базового рівня трьох або більше зразків до підйому.

Клініцистам слід враховувати вплив факторів, що не підлягають модифікації (наприклад, вік) і факторів, які можна модифікувати (освітлення, сезонна зміна, фізична активність) на вимірювання концентрації мелатоніну, що виробляється в організмі людини, що детально обговорюється в рецензованій літературі.[11] Рекомендації щодо умов відбору проб наведені в консенсусній заяві Benloucif та ін. [3]. Клініцистам слід враховувати вплив супутніх захворювань (офтальмологічних захворювань, травм спинного мозку, захворювань і розладів печінки, захворювань і розладів нирок) на вимірювання концентрації мелатоніну, що виробляється у людей, що детально обговорюється в рецензованій літературі. [11] Клініцистам слід враховувати вплив ліків або харчових добавок, які підвищують (мелатонін, антидепресанти, інгібітори MAO) або зменшують (1-адреноблокатори, альфа-2-агоністи адренорецепторів, бензодіазепіни) на вимірювання концентрації мелатоніну, що виробляється у людей, які детально обговорюється в рецензованій літературі. [11] Лабораторії повинні враховувати вплив перехресної реактивності на денні концентрації мелатоніну, які встановлюють базову лінію для кількісного визначення початку мелатоніну.

4. ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Процедура аналізу відповідає основному принципу конкурентного ІФА, згідно з яким існує конкуренція між біотинільованим і небіотинільованим антигеном за фіксовану кількість сайтів зв'язування антитіл. Кількість біотинільованого антигену, зв'язаного з антитілом, обернено пропорційна концентрації аналіту в зразку. Коли система перебуває в рівновазі, вільний біотинільований антиген видаляють шляхом промивання, а біотинільований антиген, зв'язаний з антитілом, визначають за допомогою стрептавідинпероксидази як маркера та ТМБ як субстрату. Кількісне визначення невідомих досягається шляхом порівняння ферментативної активності невідомих із кривою відповіді, отриманою за допомогою відомих стандартів.

5. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Тільки для діагностики in vitro. Тільки для професійного використання фахівцями, які пройшли навчання НЛП.
2. Перед початком аналізу уважно прочитайте інструкцію. Використовуйте дійсну версію вкладиша, що надається в наборі. Переконайтеся, що все зрозуміло.
3. У разі серйозного пошкодження упаковки набору, будь ласка, зв'яжіться з IBL або своїм постачальником у письмовій формі не пізніше ніж через тиждень після отримання набору. Не використовуйте пошкоджені компоненти під час тестування, але зберігайте їх у безпечному місці для вирішення проблем, пов'язаних зі скаргами.
4. Розбите скло може призвести до травм. Обережно поводьтеся зі скляним посудом.
5. Дотримуйтеся номера партії та терміну придатності. Не змішуйте реагенти різних партій. Не використовуйте прострочені реагенти.
6. Дотримуйтеся належної лабораторної практики та правил безпеки. Одягайте лабораторні халати, одноразові латексні рукавички та захисні окуляри, якщо це необхідно.
7. Реагенти цього набору, що містять небезпечний матеріал, можуть викликати подразнення очей і шкіри. Додаткову інформацію див. у МАТЕРІАЛАХ, ЩО ПОСТАЧАЮТЬСЯ, і на етикетках. Паспорти безпеки для цього продукту доступні на домашній сторінці IBL або за запитом безпосередньо від IBL.
8. Хімікати та підготовлені, використані, невикористані або прострочені реагенти повинні розглядатися як небезпечні відходи відповідно до національних вказівок чи правил біологічної небезпеки та безпеки.
9. Персонал з прибирання повинен керуватися професіоналами щодо потенційної небезпеки та поводження.
10. Про всі серйозні інциденти, пов'язані з пристроєм, слід повідомляти виробника та компетентний орган держави-члена, у якій проживає користувач та/або пацієнт.
11. Пристрій містить матеріал тваринного походження, який сертифіковано вільний від інфекційних або заразних захворювань і шкідливих паразитів. Проте з матеріалом слід поводитися вкрай обережно.
12. Уникайте контакту зі стоп-розчином. Це може викликати подразнення та опіки.
13. Деякі реагенти містять ProClin 300 як консервант. У разі потрапляння в очі або на шкіру негайно промийте водою. Утилізуючи реагенти, промийте їх великою кількістю води, щоб уникнути накопичення.

6. ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

Набір транспортується при температурі навколишнього середовища і повинен зберігатися при температурі 2-8°C. Тримайте подалі від тепла або прямих сонячних променів. Зберігання та стабільність зразків і підготовлених реактивів описано у відповідних розділах.

Невідкриті реагенти стабільні до закінчення зазначеного терміну придатності. Набір стабільний протягом 6 місяців після першого відкриття (не перевищуючи терміну придатності), якщо мікропланшет упакований у щільно закритий пакет, флакони закриті кришками, що закручуються, і набір зберігається при вказаній температурі зберігання.

7. ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ**Збір зразків**

Пацієнт не повинен їсти, пити, жувати жуйку або чистити зуби протягом 30 хвилин перед забором. Ретельно прополощіть рот холодною водою за 5 хвилин до взяття зразка.

Не відбирайте зразки, якщо є захворювання ротової порожнини, запалення або ураження (зараження крові).

Червонуватий колір вказує на зараження крові та призводить до неправильних результатів.

Необхідно зібрати мінімум 0,5 мл рідини. Відтік слини можна стимулювати, пожувавши шматочок Parafilm®.

Рекомендується заморожувати зразки при -20°C перед лабораторним дослідженням. Після розморожування перемішайте та центрифугуйте 10 хвилин при 2000–3000 xg, щоб видалити тверді частинки.

Зразки не слід брати у пацієнтів, які приймали полівітаміни, які містять біотин або добавки протягом останніх 48 годин.
















Пристрій для збору зразків

Слину можна зібрати у відповідний пристрій для взяття зразків. Не можна використовувати системи збору зразків, які містять целюлозні прокладки.

Зберігання зразків

Зразки слини можна зберігати при кімнатній температурі протягом 1 дня або при $2-8^{\circ}\text{C}$ протягом 7 днів. Мелатонін у слині стабільний принаймні протягом 1 місяця при -20°C . Рекомендується, щоб кожна лабораторія проводила та оцінювала подальшу стабільність зразка та встановлювала власне зберігання зразків. Уникайте повторних циклів заморожування-розморожування. Тримайте подалі від тепла або прямих сонячних променів.

8. МАТЕРІАЛИ НАДАНІ

| Кількість | символ | Походження | компонент |
|---------------------------|--|---|---|
| 1 x 12 x 8 |  | | Мікротитраційна пластина Розбірні стріпи. МТР (12 стріпів по 8 лунок у кожній), покритий козячим антикролячим антитілом в розчині, що містить бичачий сироватковий альбумін, антикролячі IgG (козячий, поліклональний). Висушені під вакуумом. |
| 1 x 10 мл 1 x 5 x 1 мл |   |  | Стандарт А – F Готовий до використання. 0,0; 0,5; 1,5; 5,0; 15; 50; пг/мл Містить: мелатонін і $\leq 0,1\%$ азиду натрію (мас./мас.). |
| 1 x 2 x 1 мл |   | | Контроль 1+2 Готовий до використання. Містить: мелатонін (низький і високий) і $\leq 0,1\%$ натрію азид (в/в). Точні концентрації дивіться на етикетках або сертифікаті якості. |
| 1 x 7 мл |  | | Антисироватка мелатоніну Готовий до використання. Містить: антисироватку (кролячу, поліклональну), бичачий сироватковий альбумін та $\leq 0,1\%$ ProClin (мас./мас.). |
| 1 x 12 мл |  |  | Мелатонін Біотин Готовий до використання. Містить бичачий сироватковий альбумін і $\leq 0,1\%$ ProClin (w/w). |
| 1 x 12 мл |  |  | Ферментний кон'югат Готовий до використання. Містить: стрептавідин, кон'югований з HRP, $\leq 0,02\%$ метилізотіазолінону (мас./мас.) і $\leq 0,02\%$ бромонітродіоксану (мас./мас.). |
| 1 x 50 мл |  | | Промивний буфер Концентрат (20x) Фосфатний буфер, що містить $\leq 0,2\%$ Tween 20 (w/w) та $\leq 0,02\%$ ProClin (w/w). |
| 1 x 15 мл |  | | Розчин субстрату ТМБ Готовий до використання. Містить розчин 3,3',5,5' тетраметилбензидину. |
| 1 x 15 мл |  | | ТМБ стоп розчин Готовий до використання. Містить 1 М сірчаної кислоти |
| 3 x |  | | Клейка фольга |

9. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

1. Мікропіпетки (Multipette Eppendorf або аналогічні пристрої, < 3 % CV). Об'єм: 50: 100 мкл
2. Необхідно використовувати відповідний пристрій для відбору зразків.
3. Орбітальний шейкер (400 - 600 об/хв)
4. Вихровий змішувач
5. 8-канальна мікропіпетка з резервуарами для реагентів
6. Пляшка для промивання, автоматизована або напівавтоматична система промивання мікропланшетів
7. Центрифуга (бажано охолоджена) 2000 - 3000 хг
8. Зчитувач мікропланшетів, здатний зчитувати поглинання при 450 нм (еталонна довжина хвилі 600–650 нм)
9. Бідистильована або дейонізована вода
10. Паперові рушники, наконечники піпеток і таймер
11. Холодильник (2 - 8°C)

10. ПРИМІТКИ ПРО ПРОЦЕДУРУ

1. Будь-яке неналежне поводження зі зразками або модифікація процедури тестування може вплинути на результати. Зазначені об'єми піпетування, час інкубації, температури та етапи попередньої обробки повинні виконуватися суворо відповідно до інструкцій. Використовуйте лише калібровані піпетки та пристрої.
2. Після початку тесту всі кроки повинні бути завершені без перерви. Переконайтеся, що необхідні реагенти, матеріали та пристрої підготовлені та готові у відповідний час. Дайте всім реагентам і зразкам досягти кімнатної температури (18–25°C) і обережно покрутить кожен флакон із рідким реагентом і зразком перед використанням. Змішуйте реагенти без утворення піни.
3. Уникайте забруднення реагентів, піпеток і лунок/пробірок. Використовуйте нові одноразові пластикові наконечники піпеток для кожного компонента та зразка. Не міняйте кришки місцями. Завжди закривайте невикористані флакони. Не використовуйте повторно лунки/пробірки або реагенти.
4. Рекомендується виконувати повторні вимірювання, щоб мати можливість виявити можливі помилки дозування.
5. Використовуйте схему піпетування, щоб перевірити відповідне розташування планшета.
6. Час інкубації впливає на результати. Усі лунки слід обробляти в однаковому порядку та часовій послідовності. Для піпетування розчинів у всі лунки рекомендується використовувати 8-канальну мікропіпетку.
7. Миття мікропланшета є важливим. Неправильно промиті лунки дають помилкові результати. Рекомендується використовувати багатоканальну піпетку або автоматичну систему промивання мікропланшетів. Не допускайте висихання лунок між інкубаціями. Не дряпайте покриті лунки під час промивання та аспірації. Обережно промийте та заповніть усі реагенти. Під час промивання переконайтеся, що всі лунки точно заповнені промивним буфером і що в лунках немає залишків.
8. Вологість впливає на покриті лунки/пробірки. Не відкривайте пакет, поки він не досягне кімнатної температури. Невикористані лунки/пробірки слід негайно повернути в повторно запечатаний пакет разом із осушувачем.
9. Відносна відцентрова сила (g) не еквівалентна обертам за хвилину (об/хв), але її потрібно розраховувати залежно від радіуса центрифуги.

11. ІНСТРУКЦІЇ З НАЛАШТУВАННЯ ПЕРЕД ТЕСТОМ

Вміст набору для 96 визначень можна розділити на 3 окремі цикли.

Наведені нижче об'єми призначені для одного циклу з 4 стріпами (32 визначення).

У будь-якому випадку слід уникати тимеросалу.

11.1. Приготування концентрованих компонентів

| Розбавити / розчинити | компонент | | Розріджувач | Відношення | Зауваження | Зберігання | Стабільність |
|-----------------------|--------------|-----------|--------------|------------|------------------------|------------|--------------|
| 10 мл | WASHBUF CONC | до 200 мл | бідист. води | 1:20 | Інтенсивно перемішайте | 2 - 8°C | до 4 тижні |

11.2. Розведення зразків

Значення, що перевищують 50 пг/мл (стандарт F), необхідно розвести стандартом А до лінійного діапазону стандартної кривої, наприклад, шляхом розведення 1:10 (приклад: 50 мкл слини + 450 мкл стандарту А). Розведення необхідно проводити в скляних пробірках. Виміряні результати необхідно помножити на коефіцієнт розведення, щоб отримати виправлені результати.

Значення, нижчі за 0 пг/мл, слід повторити шляхом додаткового вимірювання.

Додатковий стандарт А зі 100 мл можна замовити окремо під кат. No KESM611-100.

12. ПРОЦЕДУРА ВИПРОБУВАННЯ

| | |
|-----|--|
| 1. | Прокачайте по 100 мкл кожного стандарту, контролю та зразка у відповідні лунки мікропланшета. |
| 2. | Внесіть 50 мкл розчину антисироватки в кожну лунку. Накрийте планшет клейкою плівкою. Струсіть планшет обережно протягом 10 секунд. |
| 3. | Витримувати 16-20 годин при 2 - 8°C. |
| 4. | Зніміть клейку плівку. Видаліть інкубаційний розчин. Промийте планшет 4 рази 250 мкл з розведеним Промивним буфером . Видаліть надлишки розчину, постукавши перевернутим планшетом по паперовому рушнику. |
| 5. | Внесіть 100 мкл розчину біотину в кожну лунку. Накрийте пластину клейкою плівкою. |
| 6. | Витримують 2 години при 18 - 25°C (кімнатна температура) на орбітальному шейкері (500 об/хв). |
| 7. | Зніміть клейку плівку. Викиньте інкубаційний розчин. Промийте планшет 4 рази 250 мкл з розведеним Промивним буфером . Видаліть надлишки розчину, постукавши перевернутим планшетом по паперовому рушнику. |
| 8. | Внесіть 100 мкл ферментного кон'югату в кожну лунку. Накрийте планшет клейкою плівкою. |
| 9. | Витримують 1 годину при 18 - 25°C на орбітальному шейкері (500 об/хв). |
| 10. | Зніміть клейку плівку. Видаліть інкубаційний розчин. Промийте планшет 4 рази 250 мкл з розведеним Промивним буфером . Видаліть надлишки розчину, постукавши перевернутим планшетом по паперовому рушнику. |
| 11. | Внесіть 100 мкл розчину субстрату ТМБ у кожну лунку. |
| 12. | Витримати 15 хвилин при 18 - 25°C на орбітальному шейкері (500 об/хв). |
| 13. | Зупиніть реакцію субстрату, додавши 100 мкл стоп-розчину ТМБ у кожну лунку. Коротко струсіть. Колір змінюється від синього до жовтого. |
| 14. | Виміряти оптичну густина за допомогою фотометра при 450 нм (еталонна довжина хвилі: 600-650 нм) в межах 15 хвилин після піпетування стоп-розчину. |

13. АВТОМАТИЗАЦІЯ

Автоматизовані протоколи можуть бути надані для відкритих систем ІФА, наприклад: DSX®. Для отримання додаткової інформації, будь ласка контакт: ProductSupport.IBL@tecan.com

Для використання продуктів на автоматизованих приладах абсолютно необхідно виконувати та підтримувати валідацію відповідно до вимог законодавства. Успішна перевірка процесу є необхідною умовою для діагностичного використання. Відповідальність за впровадження та документування валідації відповідно до вимог країни несе організація чи установа.

14. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Результати тесту дійсні, лише якщо тест було виконано відповідно до інструкцій. Крім того, користувач повинен суворо дотримуватися правил НЛП (належної лабораторної практики) або аналогічних стандартів/законів. Користувач і/або лабораторія повинні мати перевірену систему, щоб отримати діагноз відповідно до НЛП. Усі контролю набору повинні знаходитися в допустимих діапазонах, як зазначено на етикетках і сертифікаті контролю якості. Якщо критерії не виконуються, прогон недейсний і його слід повторити. Кожна лабораторія повинна використовувати відомі зразки як подальший контроль.

У разі будь-яких відхилень слід підтвердити наступні технічні проблеми: терміни придатності (підготовлених) реагентів, умови зберігання, піпетки, пристрої, умови інкубації та методи промивання. Рекомендується брати участь у відповідних випробуваннях оцінки якості.

15. ПІДРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Отримані ОГ стандартів (лінійна вісь ординат) наносяться на графік залежно від їх концентрації (вісь х, логарифмічна) або на напівлогарифмічному міліметровому папері, або за допомогою автоматизованого методу. Хороша підгонка забезпечується кубічним сплайном, логістикою 4 параметрів або Logit-Log.

Для розрахунку стандартної кривої застосуйте кожен сигнал стандартів (один очевидний викид дублікатів можна опустити та використати більш вірогідне єдине значення).

Концентрацію зразків можна зчитати безпосередньо зі стандартної кривої.

У разі розбавлених зразків значення необхідно помножити на відповідний коефіцієнт розведення.

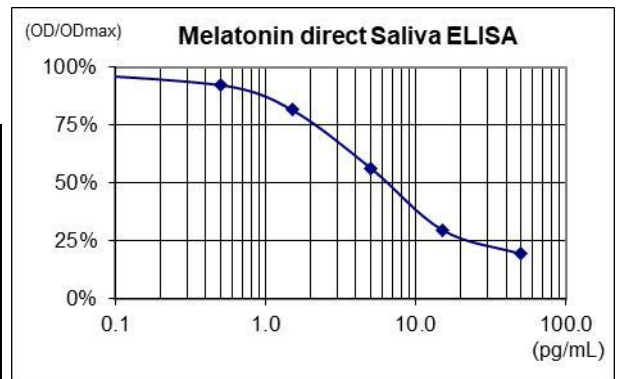
Зразки, концентрації яких перевищують найвищий стандарт, необхідно розбавити, як описано в ІНСТРУКЦІЯХ З НАЛАШТУВАННЯ ПЕРЕД ТЕСТОМ, і повторно проаналізувати.

Перетворення: Мелатонін (пг/мл) \times 4,30 = пмоль/л

Типова калібрувальна крива

(Приклад. Не використовувати для розрахунку!)

| Стандарт | Концентрація | ОГсереднє | ОГ/ОГmax |
|----------|--------------|-----------|----------|
| A | 0 пг/мл | 2,666 | 100 % |
| B | 0,5 пг/мл | 2,464 | 92 % |
| C | 1,5 пг/мл | 2,176 | 82 % |
| D | 5,0 пг/мл | 1,506 | 56 % |
| E | 15,0 пг/мл | 0,794 | 30 % |
| F | 50,0 пг/мл | 0,519 | 19 % |



Діапазон вимірювання: від 0,85 пг/мл (LoQ як функціональна чутливість) до 38,4 пг/мл (найвища концентрація з лінійною поведінкою < найвищого стандарту)

16. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Самі результати не повинні бути єдиною причиною будь-яких терапевтичних наслідків. Вони повинні бути співвіднесені з іншими клінічними спостереженнями та діагностичними тестами. Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала свій власний діапазон нормальних значень.

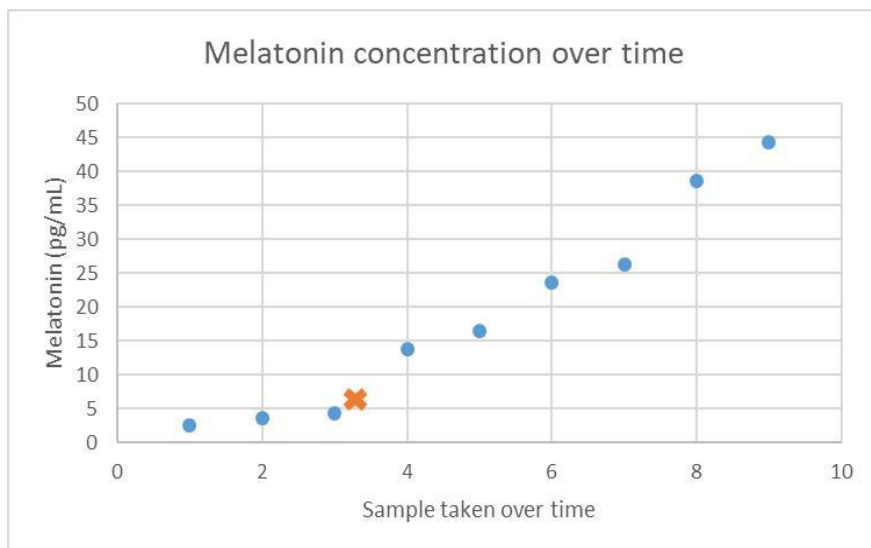
Очевидно здорові дорослі демонструють наступні значення, які відповідають значенням, наведеним у літературі.[12]

| | | Час відбору зразків | |
|--|-----------------------|---------------------|-------------------|
| | | День | ніч |
| Виміряні значення | n (кількість зразків) | 34 | 38 |
| | Діапазон | 0,0 - 9,9 пг/мл | 10,1 - 61,4 пг/мл |
| | Середнє значення | 4,3 пг/мл | 24,9 пг/мл |
| | СВ | 2,6 пг/мл | 13,3 пг/мл |
| | 2,5-й перцентиль | 0,0 пг/мл | 10,4 пг/мл |
| | 97,5-й перцентиль | 8,0 пг/мл | 58,0 пг/мл |
| Очікувані значення за літературою[12] | Середнє значення | 5,5 пг/мл | 11,4 пг/мл |
| | СВ | 4,0 пг/мл | 10,7 пг/мл |

Референтні межі концентрації мелатоніну для практично здорових осіб, розраховані як 2,5-й і 97,5-й перцентиль вимірюваної популяції, становлять 0,0-8,0 пг/мл вдень і 10,4-58,0 пг/мл вночі для здорових жінок і чоловіків.

Початок вироблення мелатоніну в організмі людини можна оцінити за початком мелатоніну при слабкому світлі (DLMO). У зовні здорових людей це відбувається за 2-3 години до сну, зміна значення може свідчити про порушення режиму здорового сну та розлад сну.

Існує кілька методів отримання DLMO в консенсусній заяві Venloucif та ін. [3]. Наприклад, DLMO можна визначити за допомогою порогового значення, розрахованого на 2 стандартні відхилення вище середнього базового рівня трьох або більше зразків до підйому. У наступній таблиці та малюнку наведено приклад DLMO, розрахованого за допомогою прямого аналізу слини мелатоніну ІФА для здорового дорослого донора.



| | |
|--------------------------------------|------------|
| | Мелатонін |
| Середнє значення (базова проба 1-3) | 3,50 пг/мл |
| СВ (зразок 1-3) | 0,85 пг/мл |
| DLMO = Середнє (базова лінія) + 2*СВ | 5,21 пг/мл |

17. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Зразки пацієнтів, які приймали полівітаміни або добавки, що містять біотин, можуть містити певну кількість біотину, що може вплинути на аналіз. Збір і зберігання зразків значно впливають на результати тесту. Додаткову інформацію див. у розділі ЗБІР ТА ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ. Відомості про перехресну реакцію див. У будь-якому випадку слід уникати тимеросулу.

Наступні речовини не мають суттєвого впливу (+/- 20 % від очікуваного значення) на результати тесту до заявлених концентрацій

| Речовина | конц. в слині |
|-----------------|---------------|
| Кров | 0,10 % |
| Азид натрію | 0,01 % |
| Лимонна кислота | 0,001 % |

18. ЕФЕКТИВНІСТЬ

18.1. Аналітична специфічність (перехресна реактивність)

Перехресна реактивність антисироватки мелатоніну була виміряна проти різних сполук.

Відсоток перехресної реактивності виражається як відношення концентрації мелатоніну до концентрації реагуючої сполуки при 50 % зв'язуванні нульового стандарту. Результати наведені в наступній таблиці.

| Речовина | Перехресна реактивність |
|--------------------|-------------------------|
| Серотонін | 0,54 % |
| 5-метокситриптамін | <0,01 % |
| N-Ацетилсеротонін | <0,01 % |
| 5-метокситриптофол | <0,01 % |

18.2. Обмеження бланка (LoB)

Дослідження LoB було проведено з нульовим калібратором (стандарт А), виміряно у 28 повторах за один цикл.

Обмеження бланка = 0,4 пг/мл.

18.3. Межа кількісного визначення (LoQ)

Дослідження LoQ проводили з 10 зразками слини, вимірними в 10 повторах за один цикл. Межа кількісного визначення = 0,85 пг/мл (CV = 20 %)

18.4. Метрологічна простежуваність

Простежуваність була доведена шляхом порівняння результатів вимірювань мелатоніну прямого аналізу слини ІФА RE54041 з вимірюваннями LC-MS/MS, проведеними сертифікованою незалежною лабораторією (ZRT Laboratory, США).

Результати, отримані за допомогою прямого аналізу слини на мелатонін IBL (RE54041), метрологічно простежуються до одиниці SI пг/мл за допомогою мас-спектрометрії з використанням 10 зразків слини для контролю якості.

Розрахована максимальна похибка прямого аналізу слини на мелатонін (RE54041) становить 14,7 %.

| | | |
|--|---------------------------------------|-------------|
| $y = \text{IBL Мелатонін прямий аналіз слини ІФА}$ | $y = 0,938x \text{ LC-MS/MS} + 0,088$ | $r = 0,991$ |
|--|---------------------------------------|-------------|

18.5. Лінійність

Дослідження лінійності проводилося шляхом вимірювання 5 різних зразків з різними концентраціями та серійним розведенням до 1:16. Аналіз показав лінійну поведінку до розведення 1:16.

18.6. Відновлення

Дослідження відновлення проводилося шляхом вимірювання чотирьох різних концентрацій у трьох різних зразках слини. До зразків слини додавали все більшу кількість мелатоніну. Усі зразки (з додаванням і без додавання) аналізували в двох примірниках. Були виміряні концентрації мелатоніну та розраховані відсотки відновлення.

Середнє відновлення мелатоніну, включаючи всі зразки слини, становило 98 % (діапазон: 74–114 %). Співвідношення між очікуваною та виміряною концентраціями мелатоніну суттєво не відхилялося в досліджуваному діапазоні концентрацій.

18.7. Точність

В аналізі/між аналізами дослідження було проведено з двома денними зразками та трьома нічними зразками (3,5–25 пг/мл) з використанням 1 партії набору протягом 20 днів з двома пробами на день і повторенням.

Точність в аналізі показала середнє CV 15,2 % (діапазон: 13,2 - 19,0 %).

Точність між аналізами показала середнє CV 19,2 % (діапазон: 16,5 - 23,8 %)

Щоб встановити точність партії, використовувався наступний план дослідження з аналізом п'яти різних зразків:

3 різні партії реагентів / 5 днів / 1 прогон на день на лот / 5 реплікатів на прогін

Середня варіація між партіями становила 13,4 % (діапазон: 8,8 - 17,7 %).

19. КОРОТКИЙ ПРОТОКОЛ**НАЛАШТУВАННЯ ПЕРЕД ТЕСТОМ**

| РОЗВЕДЕННЯ | Обсяг | Вода дист. | Відношення | Зауваження |
|----------------------------|-------|------------|------------|----------------------|
| WASHBUF CONC | 10 мл | до 200 мл | 1:20 | Приклад для 32 лунок |

| РОЗВЕДЕННЯ ЗРАЗКУ | Зауваження |
|-------------------|---|
| Слина | Зразки, які ймовірно містять концентрації вище ніж найвищий стандарт необхідно розбавити стандартом А |

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

| | |
|---|---------|
| CAL AF , CONTROL 1+2 , Зразки | 100 мкл |
| ANTISERUM | 50 мкл |

Інкубуйте 16-20 годин при 2-8°C.

Аспіруйте вміст кожної лунки.

Промити 4 рази по 0,25 мл **WASHBUF** (розбавлений) і аспіруйте.

| | |
|---------------|---------|
| BIOTIN | 100 мкл |
|---------------|---------|

Інкубуйте 2 години при 18–25°C на орбітальному шейкері (500 об/хв).

Аспіруйте вміст кожної лунки.

Промити 4 рази по 0,25 мл **WASHBUF** (розбавлений) і аспіруйте.

| | |
|----------------|---------|
| ENZCONJ | 100 мкл |
|----------------|---------|

Інкубуйте 1 год при 18–25°C на орбітальному шейкері (500 об/хв).

Аспіруйте вміст кожної лунки.

Промити 4 рази по 0,25 мл **WASHBUF** (розбавлений) і аспіруйте.

| | |
|-----------------|---------|
| TMB SUBS | 100 мкл |
|-----------------|---------|

Інкубуйте 15 хв. при 18 - 25°C

| | |
|-----------------|---------|
| TMB STOP | 100 мкл |
|-----------------|---------|

Виміряйте оптичну густину фотометром при 450 нм.

20. ПОСИЛАННЯ НА ЛІТЕРАТУРУ ПРОДУКТУ

- [1] Деллагранж, П.; Гвардіола-Леметр, Б. Мелатонін, його рецептори та зв'язки з порушеннями біологічного ритму. *Clin. Нейрофармакол.* 1997, 20 (6), 482–510. <https://doi.org/10.1097/00002826-199712000-00002>.
- [2] Masci, MM; Брюс, JN Фізіологія шишкоподібної залози людини та функціональне значення мелатоніну. *Фронт. нейроендокринол.* 2004, 25 (3–4), 177–195. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2004.08.001>.
- [3] Бенлусіф, С.; Берджесс, НД; Клерман, Е.Б.; Леві, АД; Міддлтон, Б.; Мерфі, П. Дж.; Паррі, ВЛ; Revell, VL Вимірювання мелатоніну у людей. *Дж. Клін. сон Мед. JCSM* вимкнено. опубл. 2008, 4 (1), 66–69.
- [4] Завільська, Я.Б.; Скене, ді-джей; Арендт, Дж. Фізіологія та фармакологія мелатоніну у зв'язку з біологічними ритмами. *Pharmacol. Звіти* 2009, 61 (3), 383–410. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(09\)70081-7](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(09)70081-7).
- [5] Се, З.; Чен, Ф.; Лі, Вашингтон; Генг, Х.; Лі, К.; Мен, Х.; Фенг, Ю.; Лю, В.; Ю, Ф. Огляд розладів сну та мелатоніну. *Нейрол. рез.* 2017, 39 (6), 559–565. <https://doi.org/10.1080/01616412.2017.1315864>.
- [6] Чіполла-Нето, Дж.; Амарал, ФГ до. Мелатонін як гормон: нові фізіологічні та клінічні ідеї. *Ендокр.* 2018, 39 (6), 990–1028. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00084>.
- [7] Амарал Ф. Г. до; Cipolla-Neto, J. Короткий огляд мелатоніну, гормону шишкоподібної залози. *Арк. ендокринол. Метаб.* 2018, 62 (4), 472–479. <https://doi.org/10.20945/2359-3997000000066>.
- [8] Панді-Перумал, С. Р. Мелатонін: біологічна основа його функції в здоров'ї та хворобах; CRC Press, 2005. <https://doi.org/10.1201/9781498713511>.
- [9] Корф, Х.-В.; Шомерус, К.; Stehle, JH. Шишковидний орган, його гормон мелатонін і фотонейроендокринна система; Досягнення анатомії, ембріології та клітинної біології; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1998; том. 146. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-58932-4>.
- [10] Роденбек, А.; Huether, G.; Рюттер, Е.; Наяк, Г. Нічна секреція мелатоніну та її модифікація шляхом лікування у пацієнтів із розладами сну. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2000, 467, 89–93. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4709-9_12.
- [11] Ржепка-Мігут, Б.; Раргоска, J. Методи вимірювання мелатоніну та фактори, що змінюють результати. Систематичний огляд літератури. *Міжн. J. Environ. рез. Public Health* 2020, 17(6), 1916. <https://doi.org/10.3390/ijerph17061916>.
- [12] Ба-Алі, С.; Брендстед, А.Е.; Андерсен, Угорщина; Сандер, Б.; Дженум, П. Дж.; Lund-Andersen, H. Оцінка добового мелатоніну, кортизолу, активності та циклу сну та неспання у пацієнтів з і без Діабетична ретинопатія. *Sleep Med.* 2019, 54, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2018.10.018>
- [13] Візнер, CD; Даволі, В.; Шюргер, Д.; Прен-Крістенсен, А.; Бейвінг, Л. Секреція мелатоніну під час короткого сну сприяє подальшому навчанню за зворотним зв'язком. *Фронт. гудіння Неврологія.* 2018, 11. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2017.00648>.