

Генеральный директор

ООО «ХромсистемсЛаб»

Глаговский Н.Б.



**Набор реагентов для анализа аминокислот и ацилкарнитинов в
сухих пятнах крови человека методом tandemной масс-
спектрометрии (Neo screen 01),
по ТУ 21.20.23-001-66475153-2022**

Инструкция по применению

IVD

1. Наименование медицинского изделия

Набор реагентов для анализа аминокислот и ацилкарнитинов в сухих пятнах крови человека методом tandemной масс-спектрометрии (Neo screen 01), по ТУ 21.20.23-001-66475153-2022 (далее Набор или изделие).

2. Назначение медицинского изделия

Набор предназначен для полуколичественного определения аминокислот, свободного карнитина и ацилкарнитинов в сухих пятнах крови для скрининга новорожденных на метаболические нарушения обмена аминокислот и жирных кислот методом tandemной масс-спектрометрии (МС/МС). Набор используется в качестве предварительного скринингового обследования новорожденных для диагностики наследственных нарушений обмена веществ. Полученные результаты должны быть подтверждены при помощи альтернативных методов анализа (молекулярно-генетические и/или иммуноферментные методы или с помощью количественного анализа аминокислот).

Набор предназначен только для диагностики *in vitro* в условиях клиничко-диагностических лабораторий.

Набор предназначен для профессионального применения у детей с рождения.

Область применения

Клиническая лабораторная диагностика. Диагностические лаборатории.

Медицинское изделие применяется специалистами: врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник, врач общей практики, средний медицинский персонал, фельдшер.

Только для профессионального применения.

3. Введение

Применение МС/МС в программах обследования новорожденных позволяет проводить скрининг наследственных болезней обмена, относящихся к аминокислотопатиям, органическим ацидуриям и дефектам митохондриального β -окисления. Эти заболевания вызваны наследственными дефектами ферментов, приводящими к снижению или подавлению ферментативной активности, вследствие чего нерасщепленные вещества накапливаются в организме. Это может привести к накоплению токсических метаболитов, которые могут вызывать дефекты органов и развитие системных заболеваний (амино- и органоацидезий). Эти нарушения обмена веществ вызывают серьезные необратимые повреждения у детей уже в течение нескольких дней после рождения.

В случае фенилкетонурии, это ведет к физической и умственной задержке развития. Зачастую, поскольку эти дефекты наследственные, болезни неизлечимы и терапия ограничивается симптоматическим лечением. Тем не менее, если болезнь была диагностирована на раннем этапе развития, т.е. в первые несколько дней жизни, дети, страдающие фенилкетонурией, в состоянии жить нормальной жизнью при соблюдении диеты.

Лабораторный диагноз этих заболеваний ставится по значительно увеличенным или сниженным значениям маркеров в крови новорожденного. Для анализа берется кровь из

пятки на фильтровальную бумагу, высушивается и посылается в клинико-диагностическую лабораторию.

На данный момент, с развитием метода tandemной масс-спектрометрии, возможно отслеживать широкий спектр метаболических нарушений за одно исследование. Этот метод позволяет надежно и быстро определять широкий спектр целевых соединений и их концентраций.

4. Показания

Предварительный скрининг новорожденных на метаболические нарушения обмена аминокислот и жирных кислот. Лабораторный диагноз этих заболеваний ставится по значительно увеличенным или сниженным значениям маркеров в крови новорожденного.

5. Противопоказания

Не применимо для данного МИ.

6. Побочные действия

Не применимо для данного МИ.

7. Потенциальные потребители

Набор предназначен для использования персоналом клинико-диагностических лабораторий не моложе 18 лет с высшим или средним медицинским, биологическим образованием, прошедшим соответствующую профессиональную подготовку в области используемых методов и методов безопасной работы с образцами биологического материала человека.

8. Принцип действия

Набор для Neo screen 01 позволяет измерять 26 различных аналитов (т. е. 13 аминокислот, 13 карнитина) за один анализ (табл. 1).

Данный набор поставляется с репрезентативным комплектом реагентов, включающим 26 контрольных аналитов и 26 изотопно-меченных внутренних стандартов.

При помощи Набора Neo screen 01 выполняется полуколичественное определение следующих аминокислот, свободного карнитина и ацилкарнитинов:

Таблица 1. Вещества, определяемые с помощью набора для дериватизированной tandemной масс-спектрометрии Neo screen 01 и соответствующие им внутренние стандарты и контроли

НАЗВАНИЕ ОПРЕДЕЛЯЕМОГО ВЕЩЕСТВА	СОКРАЩЕННОЕ НАЗВАНИЕ	ВНУТРЕННИЙ СТАНДАРТ	КОНТРОЛЬ
Аминокислоты			
Аланин	Ala	Ala-D ₄	Ala
Глицин	Gly	Gly- ¹⁵ N	Gly
Аргинин	Arg	Arg- ¹³ C	Arg
Аспарагиновая кислота	Asp	Asp-D ₃	Asp
Глутаминовая кислота	Glu	Glu- ¹³ C ₅	Glu



НАЗВАНИЕ ОПРЕДЕЛЯЕМОГО ВЕЩЕСТВА	СОКРАЩЕННОЕ НАЗВАНИЕ	ВНУТРЕННИЙ СТАНДАРТ	КОНТРОЛЬ
Лейцин/изолейцин/гидроксипролин ¹	Leu/Ile/Pro-OH	Leu - ¹³ C	Leu
Метионин	Met	Met- ¹³ C	Met
Фенилаланин	Phe	Phe -D ₃	Phe
Пролин	Pro	Pro - ¹³ C ₅ , ¹⁵ N	Pro
Тирозин	Tyr	Tyr -D ₄	Tyr
Валин	Val	Val -D ₃	Val
Орнитин	Orn	Orn - ¹³ C ₃	Orn
Цитруллин	Cit	Cit -D ₇	Cit
Карнитины			
Свободный карнитин	C0	C0-D ₉	C0
Ацетилкарнитин	C2	C2-D ₃	C2
Пропионилкарнитин	C3	C3-D ₃	C3
Бутирилкарнитин	C4	C4-D ₃	C4
Изовалерилкарнитин	C5	C5-D ₉	C5
Глутарилкарнитин	C5DC	C5DC-D ₉	C5DC
Гексаноилкарнитин	C6	C6-D ₃	C6
Октаноилкарнитин	C8	C8-D ₃	C8
Деканоилкарнитин	C10	C10-D ₃	C10
Лауроилкарнитин	C12	C12-D ₉	C12
Миристоилкарнитин	C14	C14-D ₃	C14
Пальмитоилкарнитин	C16	C16-D ₃	C16
Стеароилкарнитин	C18	C18-D ₃	C18

Набор предназначен для полуколичественного определения аминокислот, свободного карнитина и ацилкарнитинов в пятнах высушенной крови при помощи тандемной масс-спектрометрии. Масс-спектрометр определяет массу молекулы, измеряя отношение массы к заряду (m/z) ее иона. Для ионизации молекул и создания ионов используется метод электрораспыления.

Для анализа аминокислот, свободного карнитина и ацилкарнитинов требуется система с насосом для жидкостной хроматографии (ЖХ), инжектором и тандемным масс-спектрометром с соответствующей чувствительностью. Для подсоединения системы ЖХ к системе тандемного масс-спектрометра следует использовать внутривиточный РЕЕК-фильтр, с диаметром пор 0,2 мкм.

Тандемный масс-спектрометр состоит из двух квадруполов и ячейки соударений, соединенных последовательно. Источником ионизации является электроспрей. На первом квадруполе (MC1) ионы разделяются по своему отношению массы к заряду. Далее ионы достигают ячейки соударений, где после столкновения с инертным газом (аргоном или азотом), они распадаются на фрагменты. После этого на втором квадруполе (MC2) анализируются характерные фрагменты распада по отношению массы к заряду.

8.1. Сканирование потерь нейтральных фрагментов (NLS):

Многие бутилированные аминокислоты фрагментируются в ячейке соударений, путем отделения масляного эфира муравьиной кислоты с массой 102 или 103 дальтона. При определении аминокислот в режиме сканирования потери нейтральных фрагментов (NLS),

¹ Аналиты, указанные в этих строках, являются либо изомерами, либо изобарами, и различить их в рамках тандемного масс-спектрометрического эксперимента невозможно

расстояние сканирования первого и второго квадруполя составляет 102 или 103 единицы массы. Это позволяет получить селективный масс-спектр для многих природных и кислых аминокислот.

Тем не менее, в данном режиме детектируются не все аминокислоты.

Производителем рекомендуется выполнять количественное определение всех аминокислот, которые не детектируются при сканировании потерь нейтральных фрагментов на расстоянии 102 или 103, в режиме мониторинга заданных реакций.

8.2. Мониторинг заданных реакций (SRM):

В режиме SRM оба квадруполя статически настроены на определенные отношения массы к заряду (m/z). MC1 выбирает молекулярный ион; выводятся ионы с разными массами. После фрагментации в ячейке соударений, MC2 детектирует характеристики фрагмента молекулярного иона. Режим SRM гарантирует высокую селективность и высокую чувствительность обоих MC.

В основном, все аналиты можно детектировать в режиме SRM.

Недостатком данного метода измерения является длительная оптимизация системы tandemного масс-спектрометра для каждого отдельного перехода массы и потеря чувствительности, поскольку уменьшается время детектирования для каждого аналита.

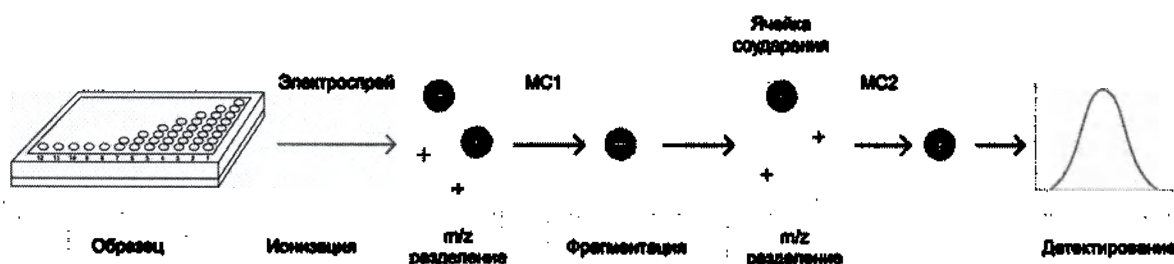


Рисунок 1. Система tandemной масс-спектрометрии в режиме мониторинга заданных реакций.

8.3. Сканирование иона-предшественника (PIS):

Бутилированные ацилкарнитины образуют характерный фрагментарный ион с $m/z = 85$ в ячейке соударений. При определении свободного карнитина и ацилкарнитинов во время сканирования иона-предшественника, MC 2 статически установлен на $m/z=85$, в то время, как MC 1 сканирует на молекулярные ионы. Это генерирует селективный масс-спектр для свободного карнитина и дериватизированных ацилкарнитинов.

8.4. Переходы массы аналитов и внутренних стандартов:

Определение концентрации аналитов выполняется путем сравнения интенсивности сигнала с соответствующим изотопно-меченным внутренним стандартом. В Таблице 2 представлены переходы массы и методы измерения для дериватизированных аналитов и изотопно-меченных внутренних стандартов:

Таблица 2. Рекомендуемые переходы массы и методы измерения для дериватизированных аналитов и изотопно-меченных внутренних стандартов

Анализируемое вещество	Режим сканирования	Ион-предшественник	Продукт-ион
Ala	Потеря нейтрального фрагмента (102)	146,1	44,1
Gly	Мониторинг заданных реакций	132,1	76,2
Arg	Мониторинг заданных реакций	231,2	70,1
Asp	Потеря нейтрального фрагмента (102)	246,2	144,2
Glu	Потеря нейтрального фрагмента (102)	260,2	158,2
Leu	Потеря нейтрального фрагмента (102)	188,2	86,2
Met	Потеря нейтрального фрагмента (102)	206,1	104,1
Phe	Потеря нейтрального фрагмента (102)	222,1	120,1
Pro	Мониторинг заданных реакций	172,1	116,1
Tyr	Потеря нейтрального фрагмента (102)	238,1	136,1
Val	Потеря нейтрального фрагмента (102)	174,1	72,1
Orn	Мониторинг заданных реакций	189,2	70,2
Cit	Мониторинг заданных реакций	232,2	113,1
C0	Сканирование иона-предшественника (85,1)	218,2	85,1
C2	Сканирование иона-предшественника (85,1)	260,2	85,1
C3	Сканирование иона-предшественника (85,1)	274,2	85,1
C4	Сканирование иона-предшественника (85,1)	288,2	85,1
C5	Сканирование иона-предшественника (85,1)	302,2	85,1
C5DC	Сканирование иона-предшественника (85,1)	388,3	85,1
C6	Сканирование иона-предшественника (85,1)	316,2	85,1
C8	Сканирование иона-предшественника (85,1)	344,3	85,1
C10	Сканирование иона-предшественника (85,1)	372,3	85,1
C12	Сканирование иона-предшественника (85,1)	400,3	85,1
C14	Сканирование иона-предшественника (85,1)	428,4	85,1
C16	Сканирование иона-предшественника (85,1)	456,4	85,1
C18	Сканирование иона-предшественника (85,1)	484,4	85,1



Анализируемое вещество	Режим сканирования	Ион-предшественник	Продукт-ион
Ala-D ₄	Потеря нейтрального фрагмента (102)	150,2	48,2
Gly- ¹⁵ N	Мониторинг заданных реакций	133,1	86,2
Arg- ¹³ C	Мониторинг заданных реакций	232,2	70,0
Asp-D ₃	Потеря нейтрального фрагмента (102)	249,2	147,2
Glu- ¹³ C ₅	Потеря нейтрального фрагмента (103)	265,2	162,2
Leu- ¹³ C	Потеря нейтрального фрагмента (103)	189,2	86,2
Met- ¹³ C	Потеря нейтрального фрагмента (103)	207,1	104,1
Phe-D ₄	Потеря нейтрального фрагмента (102)	230,2	128,2
Pro- ¹³ C ₅ , ¹⁵ N	Мониторинг заданных реакций	178,1	122,1
Tyr-D ₄	Потеря нейтрального фрагмента (102)	242,2	140,2
Val-D ₃	Потеря нейтрального фрагмента (102)	182,2	80,2
Orn- ¹³ C ₅	Мониторинг заданных реакций	194,2	74,2
Cit-D ₇	Мониторинг заданных реакций	239,2	120,2
C0-D ₉	Сканирование иона-предшественника (85,1)	227,2	85,1
C2-D ₃	Сканирование иона-предшественника (85,1)	263,2	85,1
C3-D ₃	Сканирование иона-предшественника (85,1)	277,2	85,1
C4-D ₃	Сканирование иона-предшественника (85,1)	291,2	85,1
C5-D ₉	Сканирование иона-предшественника (85,1)	311,2	85,1
C5DC-D ₉	Сканирование иона-предшественника (85,1)	397,2	85,1
C6-D ₃	Сканирование иона-предшественника (85,1)	319,2	85,1
C8-D ₃	Сканирование иона-предшественника (85,1)	347,3	85,1
C10-D ₃	Сканирование иона-предшественника (85,1)	375,3	85,1
C12-D ₉	Сканирование иона-предшественника (85,1)	409,3	85,1
C14-D ₃	Сканирование иона-предшественника (85,1)	431,3	85,1
C16-D ₃	Сканирование иона-предшественника (85,1)	459,4	85,1
C18-D ₃	Сканирование иона-предшественника (85,1)	487,4	85,1

Извлечение аминокислот, свободного карнитина и ацилкарнитинов из сухих пятен крови проводят путем осаждения белков смесью растворителей, содержащей меченые

стабильными изотопами внутренние стандарты, и последующей дериватизацией бутанолом в присутствии хлористоводородной кислоты до получения сложных бутиловых эфиров аминокислот, свободного карнитина и ацилкарнитинов. Результат, получаемый по каждому анализу, соотнесенный с его внутренним стандартом, пропорционален концентрации аналита.

Принцип действия представлен на рис. 2 – 3

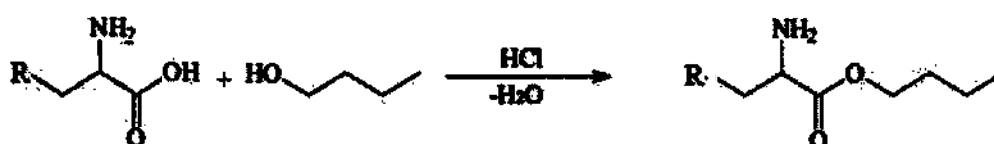


Рисунок 2. Схема дериватизации аминокислоты бутанолом.

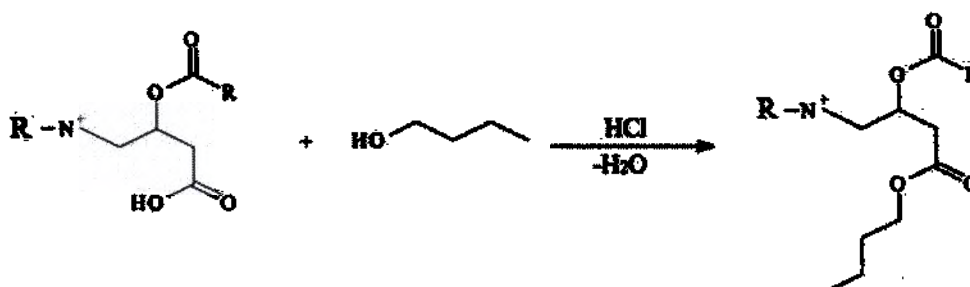


Рисунок 3. Схема дериватизации ацилкарнитина бутанолом.

9. Комплектность

Изделие представляет собой набор реагентов, в составе которого находятся:

Вариант исполнения 1.

1. Мобильная фаза (1000 мл) – 1 флакон;
2. Внутренний стандарт (сухой) – 4 флакона;
3. Реагент для дериватизации (30 мл) – 2 флакона;
4. Восстанавливающий буфер (100 мл) – 1 флакон;
5. Промывающий раствор (1000 мл) – 1 флакон;
6. Экстрагирующий буфер (200 мл) – 1 флакон;
7. 96-луночный планшет (10 шт) – 2 упаковки;
8. Защитные пленки для 96-луночных планшетов – 20 шт.;
9. Neo screen Пятна высушенной крови, Контроли для измерения аминокислот и ацилкарнитинов. Уровень I - 5 пятен;
10. Neo screen Пятна высушенной крови, Контроли для измерения аминокислот и ацилкарнитинов уровень II - 5 пятен;
11. Смесь для автонастройки (сухая) – 1 флакон;
12. Инструкция по применению – 2 шт.



Вариант исполнения 2.

1. Мобильная фаза (1000 мл) – 1 флакон;
2. Внутренний стандарт (сухой) – 4 флакона;
3. Реагент для дериватизации (30 мл) – 2 флакона;
4. Восстанавливающий буфер (100 мл) – 1 флакон;
5. Промывающий раствор (1000 мл) – 1 флакон;
6. Экстрагирующий буфер (200 мл) – 1 флакон;
7. Neo screen Пятна высушенной крови, Контроли для измерения аминокислот и ацилкарнитинов. Уровень I - 5 пятен;
8. Neo screen Пятна высушенной крови, Контроли для измерения аминокислот и ацилкарнитинов уровень II - 5 пятен;
9. Инструкция по применению – 2 шт.

Компонент	Спецификация
Мобильная фаза	Ацетонитрил 70%, вода 30%, 0,1 % муравьиная кислота
Внутренний стандарт	<i>Изотопно-меченные стандарты сухие:</i> DL-аланин-d4 Глицин-15N L-аргинина-1-13C гидрохлорид L-аспарагиновая кислота-d3 L-глутаминовая кислота-13C5 L-лейцин-1-13C L-метионин-1-13C L-фенилаланин-d8 L-пролин-13C5,15N L-тирозин-d4 L-валин-d8 L-орнитин-13C5 гидрохлорид L-цитруллин-d7 L-карнитин - (триметил-d9) Ацетил L-карнитин - (N-метил-d3) Пропионил-L-карнитин - (N-метил-d3) Бутирил-L-карнитин - (N-метил-d3) Изовалерил-L-карнитин - (N,N,N-триметил-d9) L-глутарил карнитина-d9 хлорид Гексаноил-L-карнитин - (N-метил-d3) Октаноил-L-карнитин - (N-метил-d3) Деканоил-L-карнитин-d3 хлорид Миристоил-L-карнитин-d3 гидрохлорид Лауроил-L-карнитин - (N,N,N-триметил-d9) Пальмитоил-L-карнитин-d3 гидрохлорид



	Стеарил-L-карнитин - (N-метил-d3)
Реагент для дериватизации	2N раствор хлористоводородной кислоты (соляная кислота) в бутаноле
Восстанавливающий буфер	Ацетонитрил 70%, вода 30%, 0,1 % муравьиная кислота
Промывающий раствор	Ацетонитрил 30%, вода 70%
Экстрагирующий буфер	Ацетонитрил 70%, вода 30%
96-луночный планшет (только для Варианта исполнения 1)	Полупрозрачный пластиковый планшет
Защитные пленки для 96-луночных планшетов (только для Варианта исполнения 1)	Полиэтилен
Neo screen Пятна высушенной крови, Контроли для измерения аминокислот и ацилкарнитинов. Уровень I - 5 пятен	Фильтровальная бумага с зонами (пятнами) высушенной крови
Neo screen Пятна высушенной крови, Контроли для измерения аминокислот и ацилкарнитинов уровень II - 5 пятен	Фильтровальная бумага с зонами (пятнами) высушенной крови
Смесь для автонастройки (сухая) (только для Варианта исполнения 1)	Недейтерированные стандарты: L-аланин Глицин L-аргинин L-аспарагиновая кислота L-глутаминовая кислота L-лейцин L-метионин L-фенилаланин L-пролин



	L-тирозин
	L-валин
	L-орнитин моногидрохлорид
	L-цитруллин
	L-карнитин
	О-ацетил-L-карнитин гидрохлорид
	Пропионил-L-карнитин
	(R)-бутирилкарнитин хлорид
	Изовалерил-L-карнитин
	L-глутарилкарнитин хлорид
	Гексаноил-L-карнитин
	Октаноил-L-карнитин
	Деканоил-L-карнитин хлорид
	Миристоил-L-карнитин гидрохлорид
	Лауроил-L-карнитин
	Пальмитоил-L-карнитин гидрохлорид
	Стеароил-L-карнитин
	<i>Изотопно-меченные стандарты сухие:</i>
	DL-аланин-d4
	Глицин-15N
	L-аргинина-1-13C гидрохлорид
	L-аспарагиновая кислота-d3
	L-глутаминовая кислота-13C5
	L-лейцин-1-13C
	L-метионин-1-13C
	L-фенилаланин-d8
	L-пролин-13C5,15N
	L-тирозин-d4
	L-валин-d8
	L-орнитин-13C5 гидрохлорид
	L-цитруллин-d7
	L-карнитин - (триметил-d9)
	Ацетил L-карнитин - (N-метил-d3)
	Пропионил-L-карнитин - (N-метил-d3)
	Бутирил-L-карнитин - (N-метил-d3)
	Изовалерил-L-карнитин - (N,N,N-триметил-d9)
	L-глутарил карнитина-d9 хлорид
	Гексаноил-L-карнитин - (N-метил-d3)
	Октаноил-L-карнитин - (N-метил-d3)
	Деканоил-L-карнитин-d3 хлорид
	Миристоил-L-карнитин-d3 гидрохлорид
	Лауроил-L-карнитин - (N,N,N-триметил-d9)



	Пальмитоил-L-карнитин-d3 гидрохлорид Стеароил-L-карнитин - (N-метил-d3)
--	--

Материалы, из которых изготовлено медицинское изделие

Компонент	Материал
1. Мобильная фаза	Прозрачный стеклянный флакон, укупоренный навинчивающейся пластиковой крышкой синего цвета. Прозрачная бесцветная жидкость, без запаха, 1000 мл
2. Внутренний стандарт (сухой)	Стеклянный флакон коричневого цвета, укупоренный навинчивающейся пластиковой крышкой черного цвета. Лиофилизированный порошок.
3. Реагент для дериватизации	Стеклянный флакон коричневого цвета, укупоренный навинчивающейся пластиковой крышкой синего цвета. Прозрачная жидкость с ярко выраженным запахом, 30 мл
4. Восстанавливающий буфер	Стеклянный флакон коричневого цвета, укупоренный навинчивающейся пластиковой крышкой синего цвета. Прозрачная жидкость, без запаха, 100 мл
5. Промывающий раствор	Прозрачный стеклянный флакон, укупоренный навинчивающейся пластиковой крышкой синего цвета. Прозрачная бесцветная жидкость, без запаха, 1000 мл
6. Экстрагирующий буфер	Стеклянный флакон коричневого цвета, укупоренный навинчивающейся пластиковой крышкой синего цвета. Прозрачная жидкость, без запаха, 200 мл
7. 96-луночный планшет	Полупрозрачный пластиковый планшет
8. Защитные пленки для 96-луночных планшетов	Полиэтилен
9. Neo screen Пятна высушенной крови, Контроли для измерения аминокислот, ацилкарнитинов уровень I	Фильтровальная бумага с зонами (пятнами) высушенной крови
10. Neo screen Пятна высушенной крови, Контроли для измерения аминокислот, ацилкарнитинов уровень II	Фильтровальная бумага с зонами (пятнами) высушенной крови
11. Смесь для автонастройки	Стеклянный флакон коричневого цвета, укупоренный навинчивающейся пластиковой крышкой черного цвета. Лиофилизированная пудра.

10. Материалы, не входящие в комплект поставки

- Защитные перчатки;
- Маска медицинская;

- Таймер или секундомер;
- Жидкостный хроматомасс-спектрометр Shimadzu, варианты исполнения: LCMS-8040, LCMS-8050, LCMS-8060 с принадлежностями (РЗН 2013/417 от 19.09.2016);
- Ручной или автоматический панчер для выбивания из фильтровальной бумаги дисков диаметром 3.2 мм (1/8 дюйма);
- Шейкер с термостатом для экстракции и дериватизации проб (например PST-60-HL-4, ФЗС 2008/01398 от 10.06.2021);
- Оборудование для выпаривания образцов;
- Дозатор, 20-200 мкл;
- Вытяжной шкаф;
- Мерная колба вместимостью 50 мл.

11. Контакт с организмом человека

Не имеет прямого или опосредованного контакта с организмом человека, так как является медицинским изделием предназначенным для *in vitro* диагностики и контактирует только с биоматериалом пациента.

12. Перечень материалов животного или человеческого происхождения

Медицинское изделие изготовлено без использования материалов животного происхождения.

Neo screen Пятна высушенной крови, Контроли для измерения аминокислот, ацилкарнитинов уровень I и II изготовлены из объединенной цельной крови человека.

При тестировании всей крови получены отрицательные результаты на антитела к ВИЧ 1+2, РНК вирусов ВИЧ, HCV и HBV (ПЦР-исследования), поверхностный антиген гепатита В (HBs), антитела к HBs, антитела к вирусу гепатита С и сифилису (РПГА, ТРНА). В связи с тем, что не существует ни одного метода тестирования, который даст абсолютную гарантию того, что продукты, содержащие материалы полученные от человека, не будут содержать возбудителей инфекционных заболеваний, такую потенциальную опасность заражения следует принимать во внимание. Соответственно, при работе с данным продуктом следует применять те же меры, как при работе с потенциально инфицированными образцами пациентов.

13. Функциональные характеристики

1. Диагностическая чувствительность и специфичность

В общей сложности 58 положительных клинических образцов и 120 отрицательных клинических образца были собраны и проведены клинические испытания с помощью Набора реагентов для анализа аминокислот, свободного карнитина и ацилкарнитинов в сухих пятнах крови человека методом ЖХ-МС/МС (Neo screen 01).

Диагностическая чувствительность Набора - 100,00% (ДИ 93,84% – 100%).

Диагностическая специфичность Набора - 100,00% (ДИ 96,97-100,00%).

2. Аналитическая чувствительность (предел обнаружения (LoD)²)

Предел обнаружения Набора реагентов для анализа аминокислот, свободного карнитина и ацилкарнитинов в сухих пятнах крови человека методом ЖХ-МС/МС (Neo screen 01) составляет:

Аминокислоты:

Аналит	Предел обнаружения (мкмоль/л)
Ala_d4	0,24
Arg_13C	0,14
Asp_d3	0,53
Val_d8	0,84
Gly_15N	0,85
Glu_13C5	0,50
Leu_13C	0,24
Met_13C	0,38
Orn_13C5	0,16
Pro_13C5-15N	0,33
Tyr_d4	0,35
Phe_d8	0,12
Cit_d7	0,44

Ацилкарнитины и свободный карнитин:

Аналит	Предел обнаружения (мкмоль/л)
C0_d9	0,13
C2_d3	0,027
C3_d3	0,027
C4_d3	0,006
C5_d9	0,003
C5DC_d6	0,02
C6_d3	0,006
C8_d3	0,003
C10_d3	0,004
C12_d9	0,006
C14_d3	0,003
C16_d3	0,011
C18_d3	0,01

3. Интерференция

Для проверки интерференции Набор реагентов для анализа аминокислот, свободного карнитина и ацилкарнитинов в сухих пятнах крови человека методом ЖХ-МС/МС (Neo screen 01) был испытан в отношении образцов, содержащих эндогенные вещества (аспарагин, глутаминовая кислота).

Полученные результаты испытаний показали, что заменимая аминокислота L-аспарагин оказывает ограничивающее влияние на анализ путем повышения измеряемой концентрации аминокислоты Орнитина (Orn). Концентрация L-аспарагина 500 мкмоль/л приводит к повышению результатов скрининга на орнитин на 20%.

² предел обнаружения зависит от ЖХ-МС/МС системы.

Максимальная концентрация L-аспарагина в плазме крови новорожденных не превышает 140 мкмоль/л [Soldin, S. J. et al. (2011). Pediatric Reference Intervals, 7th edition, AACCC Press, Washington DC, USA]. Таким образом, L-аспарагин не будет мешать анализу орнитина в обычных условиях.

Дибутиловый эфир глутаминовой кислоты имеет одинаковый MRM-переход с C2-карнитином. Концентрация глутаминовой кислоты 5000 мкмоль/л не приводит к повышению результатов скрининга на C2-карнитин.

4. Повторяемость и воспроизводимость

При проведении испытаний, не было обнаружено различий в пределах между разными днями, лотами наборов. Полученные результаты продемонстрировали 100 % повторяемость и воспроизводимость результатов. Коэффициент внутрисерийной и межсерийной вариабельности не превышает 15%.

5. Стабильность

Результаты исследований стабильности Набора в режиме реального времени подтвердили, что характеристики продукта были стабильны в течение 12 месяцев при указанных условиях хранения в запечатанной упаковке.

14. Информация о содержании лекарственных средств

Медицинское изделие не содержит в своем составе лекарственных средств.

15. Информация о стерилизации медицинского изделия

Медицинское изделие не является стерильным.

16. Информация о ремонте и обслуживании медицинского изделия

Медицинское изделие не подлежит ремонту и обслуживанию.

17. Меры предосторожности

1. Набор предназначен только для диагностики *in vitro*.
2. Набор не предназначен для повторного применения.
3. При обращении с тестируемыми образцами необходимо использовать защитные перчатки. После тестирования следует тщательно вымыть руки.
4. После завершения тестирования, необходимо надлежащим образом утилизировать все пробы и материалы. При обращении и утилизации любых биологических материалов, которые потенциально могут быть инфицирующими, необходимо строго соблюдать все требования, установленные в стандартах, руководствах и процедурах по обеспечению биологической безопасности. Для утилизации необходимо использовать специальные контейнеры для биологических отходов.
5. Не использовать компоненты Набора при наличии повреждений элементов упаковки.
6. Не использовать медицинское изделие после истечения срока годности.

18. Порядок выполнения тестирования

Забор образцов крови

- 1) Забор образцов крови осуществляется из пятки новорожденного в возрасте 24 - 48 ч. жизни у доношенного и на 7-е сутки (144-168 ч.) жизни у недоношенного новорожденного.
- 2) В зависимости от типа фильтровальной бумаги и гематокрита пробы, объем крови на сухом пятне крови, предназначенном непосредственно для анализа (3.2 мм в диаметре) колеблется между 2,2-3,3 мкл крови.
- 3) Высушенную фильтровальную бумагу с пятнами крови необходимо направить в лабораторию для тестирования в течение 24 ч.
- 4) Срок хранения сухих пятен крови составляет 14 дней при комнатной температуре или в прохладном месте (2-8 °C). Для более длительного хранения (до 6 месяцев) необходимо защитить образцы от влаги и заморозить при температуре ниже -18°C.

Растворение внутреннего стандарта (сухого)

Внутренний стандарт (сухой) используется как калибровочный стандарт для каждого образца и готовится на основе изотопно-меченых соединений. После растворения определенное количество внутреннего стандарта добавляется к пробе и проводится полная пробоподготовка.

Лиофилизированный внутренний стандарт растворяется в 50 мл экстрагирующего буфера. Для этого, откройте флакон внутреннего стандарта, добавьте 5 мл экстрагирующего буфера. Оставьте стоять при комнатной температуре 5 мин, изредка помешивая. Перенесите содержимое флакона в мерную колбу объемом 50 мл. Смойте внутренний стандарт 2 раза по 5 мл экстрагирующим буфером с флакона и перенесите в колбу. Добавьте в колбу экстрагирующий буфер до 50 мл и тщательно перемешайте.

Избегайте попадания прямых солнечных лучей!

Точные концентрации внутренних стандартов меченных изотопами аминокислот и ацилкарнитинов, измеренные изготовителем, указаны в сертификате контроля качества для каждой партии, который находится на сайте www.chromolab-production.ru

Растворенный внутренний стандарт можно хранить 21 день, плотно закрытым, в защищенном от воздействия солнечных лучей месте и при температуре от +2 до +8°C.

Растворение Neo screen Пятна высушенной крови, Контроли для измерения аминокислот, ацилкарнитинов уровень I и II

Контрольные образцы для измерения аминокислот и ацилкарнитинов уровень I и II, входящие в набор Neo screen, готовят аналогично образцам пациентов. Приготовленные контрольные образцы включают в каждую аналитическую серию для мониторинга правильности и воспроизводимости анализа.

В фольгированном пакете содержатся контроли пятен высушенной крови уровня I и уровня II, пакетики с осушителем, индикатор влаги. Каждый контроль находится в своей сумке для хранения на молнии.

Состояние индикатора влаги необходимо проверять каждый раз при открытии сумки. Если цвет индикатора влаги изменился с коричневого на голубой на 50 %, пакетики с осушителем необходимо регенерировать, высушив их в сушильном шкафу при температуре 60 °C в течение 4 часов.

Извлекать контрольный материал из сумки для хранения (температура - 18 °С) следует с осторожностью. Во избежание конденсации пакетов, необходимо, чтобы перед открытием, они согрелись до комнатной температуры (20-25 °С).

Сразу после использования, поместите соответствующий контроль обратно в сумку для хранения с молнией, плотно закройте и выполните глубокую заморозку до температуры ниже - 18°С.

Избегайте температур выше 37°С, так как это может привести к снижению концентрации анализов.

Избегать воздействия прямых солнечных лучей! Все процедуры производить в защитных перчатках.

Фактические концентрации зависят от партии и указаны в сертификате контроля качества для каждой партии, который находится на сайте www.chromolab-production.ru.

Пробоподготовка

1. Подготовка образца:

Положите фильтровальную бумагу на 96-луночный планшет. С помощью пипетки выдавите 3.2 мм диск сухого пятна крови в ячейку 96-луночного планшета.

2. Экстракция:

Добавьте 200 мкл растворенного внутреннего стандарта. Закройте планшет защитной пленкой и перемешайте при 600 об/мин в течение 20 минут при комнатной температуре.

3. Перенос/упаривание:

Удалите защитную пленку с планшета. Перенесите супернатант в новую лунку 96-луночного планшета. Упаривайте досуха при температуре 60 °С.

Важно: Пластика должна быть сухой. Влага мешает дериватизации!

4. Дериватизация:

Добавьте 60 мкл реагента для дериватизации. Закройте планшет защитной пленкой и инкубируйте при температуре 60°С и 600 об/мин в течение 15 минут.

5. Упаривание:

Удалите пленку с планшета. Упаривайте досуха при температуре 60 °С.

Внимание: В процессе упаривания испаряется дериватизирующий реагент. Всегда работайте в вытяжном шкафу!

6. Растворение элюата:

Добавьте 100 мкл восстанавливающего буфера. Перемешайте при 600 об/мин в течение 5 минут при комнатной температуре.

7. Ввод пробы:

Введите 10 мкл элюата в ЖХ-МС/МС систему.

8. Контроль качества:

Прецизионность и точность анализов должна быть отслежена постановкой контрольных материалов, а именно: Neo screen Пятна высушенной крови, Контроли для измерения аминокислот, ацилкарнитинов уровень I - (1×5 пятен) и Neo screen Пятна высушенной крови, Контроли для измерения аминокислот, ацилкарнитинов уровень II - (1×5 пятен).

Условия проведения анализа

Полуколичественный анализ аминокислот, свободного карнитина и ацилкарнитинов требует наличия системы с насосом для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ-насосом), инжектором и tandemным масс-спектрометром подходящей чувствительности. Для предотвращения изменения состава мобильной фазы, ее следует держать закрытой, даже во время проведения процедуры. В качестве раствора для промывки иглы инжектора, используют промывающий раствор. Для выполнения процедуры не требуется ни колонка для высокоэффективной жидкостной хроматографии, ни термостат колонки. Для подсоединения системы высокоэффективной жидкостной хроматографии к системе tandemного масс-спектрометра следует использовать внутривиточный РЕЕК-фильтр.

Инструментальные настройки:

Автосемплер:	объем пробы, вводимой в систему ЖХ-МС/МС - 10 мкл
Время анализа:	1,7 мин
Градиент потока:	от 20 до 600 мкл/мин
Промывная жидкость для иглы инжектора:	промывающий раствор

Градиентный профиль:

Ввиду разного свободного объема отдельных хроматографических систем, необходимо оптимизировать профиль градиента для непосредственно используемой системы. Показанный профиль градиента необходим, как основа для оптимизации. Окно времени сканирования, используемое для расчета концентраций аналитов и внутренних стандартов, должно быть установлено на период времени, когда интенсивность сигналов достигает своего плато (приблизительно 0,25 - 1,25 мин).

Время, мин	0	0,24	0,25	1,24	1,25	1,50	1,51
Поток, мкл/мин	200	200	20	20	600	200	200

Если система высокоэффективной жидкостной хроматографии не позволяет установить постоянную скорость потока, равную 20 мкл/мин, метод может быть запущен альтернативно, с использованием изократического режима элюирования, со скоростью 100 - 150 мкл/мин.

Примечание : изократический метод снижает чувствительность.

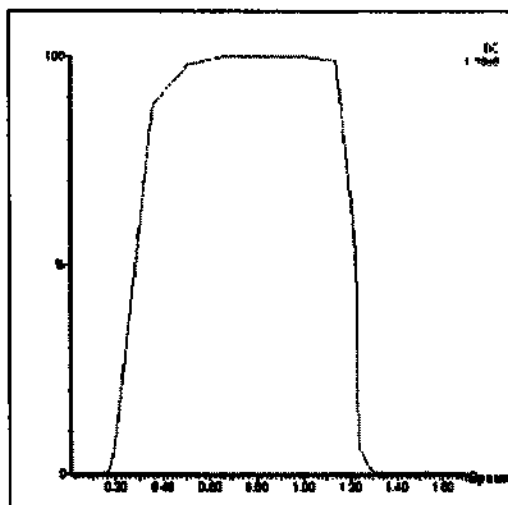


Рисунок 4. Хроматограмма с градиентом потока.

Для запуска аналитической серии необходимо убедиться в возможности работы ЖХ-МС/МС системы не менее 8 часов.

Промойте систему 10 мл мобильной фазы при скорости потока 200 мкл/мин.

Вводите приготовленные контроли несколько раз, пока не появятся две одинаковые концентрации и интенсивности сигнала.

После этого можно начинать анализ.

Для правильного обращения с ЖХ-МС/МС системой прочтите Руководство по эксплуатации системы.

Анализ результатов

Внутренний стандарт используется как индивидуальный калибратор для каждой пробы, поэтому матричные эффекты снижены до минимума. Для этой цели проба (контроль, образец) смешивается с определенным количеством внутреннего стандарта (фактические концентрации зависят от партии и записаны в сопровождающем стандарт информационном листке).

Точный объем крови необходим для успешного количественного обсчета проб. Объем крови на фильтровальной бумаге зависит от диаметра круга, гематокрита образца и материала фильтровальной бумаги.

Концентрации аналитов в пробах рассчитываются с использованием формулы:

$$C_{\text{аналита}} = \frac{I_{\text{аналита}} \times V_{\text{экстр.буфера}} \times C_{\text{ВС}}}{I_{\text{ВС}} \times V_{\text{сухого пятна}}},$$

где:

$C_{\text{аналита}}$ — концентрация анализируемого вещества, мкмоль/л;

$I_{\text{аналита}}$ — интенсивность сигнала аналита, усл.ед.;

$V_{\text{экстр.буфера}}$ — объем экстрагирующего буферного раствора;

$C_{\text{ВС}}$ — концентрация внутреннего стандарта, мкмоль/л;

$I_{вс}$ -интенсивность сигнала внутреннего стандарта, усл.ед.;

$V_{\text{сухого пятна}}$ -объем крови в выбитом сухом пятне³.

19. Ожидаемые значения и интерпретация результатов

Определение потенциально положительных результатов исследования на метаболические нарушения у новорожденных основано на использовании пограничных значений, которые различаются у потенциально положительного и потенциально отрицательного результата. Пограничные значения, указанные в таблице ниже, были определены в рамках экспериментального исследования 120 новорожденных.

Эти пограничные значения только ориентировочные и могут изменяться в зависимости от группы пациентов и используемой МС/МС системы. Каждая лаборатория должна определять свои собственные пограничные значения в экспериментальном исследовании в консультации с экспертом по обмену веществ.

Анализируемое вещество	Процентили (мкмоль/л)		
	1-й	99-й	99,5-й
Аланин	137,21	465,73	471,73
Аргинин	6,24	27,78	28,32
Аспарагиновая кислота	34,09	143,24	176,02
Цитруллин	4,85	16,69	17,91
Глутаминовая кислота	231,41	669,48	687,78
Глицин	182,79	642,32	664,95
Метионин	10,00	32,58	36,30
Орнитин	30,74	143,73	149,95
Фенилаланин	43,09	99,27	104,33
Тирозин	56,00	222,51	245,99
Валин	65,71	222,81	224,34
Лейцин/изолейцин/гидроксипролин	33,46	82,10	83,53
Пролин	106,39	270,98	273,97
C0	17,57	64,98	71,76
C2	17,40	61,02	67,09
C3	1,15	6,45	6,63
C4	0,12	0,72	0,87
C5	0,04	0,15	0,17
C5DC	0,05	0,21	0,22
C6	0,04	0,15	0,16
C8	0,05	0,18	0,20
C10	0,05	0,19	0,19
C12	0,28	1,22	1,31
C14	0,12	0,38	0,39
C16	1,70	5,63	5,74
C18	0,39	1,19	1,26

20. Контроль качества

Набор имеет компоненты для контроля качества - Neo screen Пятна высушенной крови,

³ При прокалывании кожи на глубину 3 мм, гематокрите 0,35-0,45 и использовании фильтровальной бумаги Whatman 903, средний объем крови в диске диаметром 3,2 мм составляет 3,1 мкл.

Контроли для измерения аминокислот, ацилкарнитинов уровень I и Neo screen Пятна высушенной крови, Контроли для измерения аминокислот, ацилкарнитинов уровень II. Данные контроли разработаны для мониторинга правильности и точности аналитических процедур для полуколичественного определения аминокислот, свободного карнитина и ацилкарнитинов в сухих пятнах крови.

21. Ограничения при использовании

- 1) Все компоненты Набора могут использоваться только в лабораторной диагностике *in vitro*, персоналом, специально обученным для выполнения диагностических процедур.
- 2) Набор следует использовать только в соответствии с инструкцией по применению.
- 3) Для тестирования могут использоваться только образцы крови из пятки пациента.

22. Информация об утилизации медицинского изделия

Утилизация медицинского изделия должна проводиться согласно действующему законодательству. При использовании медицинского изделия образуются отходы, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) как: эпидемиологически опасные отходы (СанПиН 2.1.3684-21: класс Б).

Серии тестов, пришедшие в негодность, серии с истекшим сроком годности, подлежат уничтожению в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 как отходы, принадлежащие к классу «А» - (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым бытовым отходам), любым способом, предотвращающим повторное использование. Упаковка после полного израсходования содержимого, подлежит утилизации в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 как отходы, принадлежащие к классу «А».

Утилизируйте опасные вещества или биологически загрязненные материалы в соответствии с практикой, принятой в вашем учреждении. Утилизируйте все материалы безопасным и приемлемым образом в соответствии с действующими нормативными требованиями в области санитарно-эпидемиологического благополучия.

23. Транспортировка и хранение

- Хранить Набор (короб 1) в оригинальной упаковке при температуре 18 – 30 °С.
- Хранить Набор (короб 2) в оригинальной упаковке при температуре не выше -18 °С.
- Изделие может транспортироваться всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, в упаковке производителя при температуре от +2 до +18 °С в течении 14 суток.
- Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

Компоненты Короба 1

Компонент	Температура хранения
Мобильная фаза (1000 мл) – 1 флакон	18 – 30 °С
Реагент для дериватизации (30 мл) – 2 флакона	18 – 30 °С
Восстанавливающий буфер (100 мл) – 1 флакон	18 – 30 °С
Промывающий раствор (1000 мл) – 1 флакон	18 – 30 °С

Экстрагирующий буфер (200 мл) – 1 флакон	18 – 30 °C
96-луночный планшет (10 шт) – 2 упаковки (только для Варианта исполнения 1)	18 – 30 °C
Защитные пленки для 96-луночных планшетов – 20 шт. (только для Варианта исполнения 1)	18 – 30 °C

Компоненты Короба 2

Компонент	Температура хранения
Внутренний стандарт (сухой) – 4 флакона	Не выше -18 °C
Neo screen Пятна высушенной крови, Контроли для измерения аминокислот и ацилкарнитинов. Уровень I - 5 пятен	Не выше -18 °C
Neo screen Пятна высушенной крови, Контроли для измерения аминокислот и ацилкарнитинов. Уровень II - 5 пятен	Не выше -18 °C
Смесь для автонастройки (сухая) – 1 флакон (только для Варианта исполнения 1)	Не выше -18 °C

24. Срок годности медицинского изделия

Срок годности: 12 месяцев с даты изготовления.

Не использовать после истечения срока годности.

25. Гарантийные обязательства

Производитель гарантирует стабильность медицинского изделия до окончания срока годности при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, указанных в инструкции.

Производитель гарантирует безопасность медицинского изделия, отсутствие недопустимого риска причинения вреда жизни, здоровью человека и окружающей среде при использовании набора реагентов по назначению в условиях, предусмотренных производителем.

26. Контактная информация

Производитель:

ООО "ХромсистемсЛаб"

117246, г. Москва, Научный пр-д, д. 20, стр. 2, эт/пом/ком 2/1/22-30

Телефон: +7 (495) 369-33-09, neoscrin@chromolab.ru

www.chromolab-production.ru

Место производства:

ООО "ХромсистемсЛаб"

Версия 2.0 от 20.02.2024

117246, г. Москва, Научный пр-д, д. 20, стр. 2, эт/пом/ком 2/П/43, 44.

27. Сведения о маркировке

Экспликация символов, нанесенных на упаковку

Символ	Описание
	Использовать до
	Код партии
	Изделие для in vitro диагностики
	Хранить в указанном температурном диапазоне
	Хранить в указанном температурном диапазоне (-18)
	Содержимого достаточно для проведения n-тестов
	Изготовитель
	Дата изготовления
	Обратитесь к инструкции по применению
	Наличие рисков биологического характера
	Токсичные вещества
	Легковоспламеняющиеся вещества
	Раздражающие вещества
	Канцерогенные/мутагенные вещества

	Вещества, вызывающие коррозию металлов, едкие вещества
	QR-код



Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 24 листов.

Генеральный директор
ООО «ХромсистемсЛаб»

Глаговский П.Б.

