

XÁC NHẬN PHƯƠNG PHÁP XÉT NGHIỆM SÀNG LỌC RỐI LOẠN CHUYỂN HÓA BẨM SINH TRÊN MÁY LCMS 8040 CỦA SHIMADZU

Trịnh Thị Phương Dung¹, Nguyễn Thị Huệ², Vũ Thị Tú Uyên², Nguyễn Kiều Hoài Linh²,
Nguyễn Quỳnh Giao¹, Trần Thị Chi Mai^{1,2}

¹Trường Đại học Y Hà Nội, ²Bệnh viện Nhi Trung ương

Xác nhận phương pháp là việc làm không thể thiếu để đưa ra một kết quả xét nghiệm đáng tin cậy. Đề tài được tiến hành với mục tiêu: Xác nhận quy trình kỹ thuật định lượng một số acid amin và acylcarnitine trong giọt máu thấm khô bằng bằng MS/MS. Nghiên cứu sử dụng vật liệu nội kiểm và kit NeoMass AAC của hãng Labsystems Diagnostics để tiến hành thực nghiệm đánh giá độ chụm và độ chính xác xét nghiệm sàng lọc rối loạn chuyển hóa bẩm sinh trên máy phân tích LCMS 8040 của Shimadzu. Tiêu chuẩn chấp nhận áp dụng theo hướng dẫn NBS04A của CLSI. Kết quả: CV độ chụm ngắn hạn $\leq 25\%$, CV độ chụm dài hạn $\leq 35\%$, độ lệch $\leq 20\%$ với 3 mức QC. Độ chụm và độ chính xác của 42 chất chuyển hóa trong điều kiện Khoa Sinh hóa Bệnh viện Nhi Trung Ương được xác nhận phù hợp theo công bố của nhà sản xuất. Xét nghiệm sàng lọc rối loạn chuyển hoá bẩm sinh sử dụng kit NeoMass AAAC trên LCMS 8040 đảm bảo độ tin cậy, có thể sử dụng cung cấp dịch vụ sàng lọc sơ sinh.

Từ khoá: Shimadzu LCMS 8040, độ chính xác, độ chụm, NBS04A

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Rối loạn chuyển hóa bẩm sinh (RLCHBS) là thuật ngữ mô tả nhóm bệnh lý di truyền phân tử do những rối loạn của cấu trúc gen dẫn tới các khiếm khuyết khác nhau trong cấu trúc và chức năng của các enzym, hormon, thụ thể (receptor), protein vận chuyển và các đồng yếu tố (cofactor) tham gia vào các quá trình chuyển hóa các chất dinh dưỡng trong cơ thể. Theo các báo cáo từ khoa Nội tiết – Chuyển hóa – Di truyền Bệnh viện Nhi trung ương trong vài năm gần đây, tần suất mắc bệnh khoảng 1/5000 trẻ sinh ra, trong đó tỷ lệ tử vong lên đến 48% [1]. Có trên 1000 bệnh lý rối loạn chuyển hóa khác nhau, tỷ lệ mới mắc 1/500 [2]. Bệnh rối loạn chuyển hóa là một gánh nặng với bản thân người bệnh, gia đình và xã hội. Việc điều trị

đòi hỏi thời gian dài và còn tùy thuộc vào mức độ nặng nhẹ của bệnh. Cho đến nay bệnh vẫn chưa có phương pháp điều trị đặc hiệu mà chỉ dừng lại ở các biện pháp điều trị hỗ trợ nhằm hạn chế các dấu hiệu của bệnh. Bởi vậy, chẩn đoán xác định bệnh bằng chương trình sàng lọc sơ sinh là cần thiết cho việc phát hiện sớm, để có những can thiệp, hỗ trợ kịp thời, nâng cao chất lượng cuộc sống cho bệnh nhân, đồng thời giảm bớt gánh nặng cho gia đình. Ở Việt Nam, có nhiều bệnh nhân mắc rối loạn chuyển hóa bẩm sinh nhưng không được chẩn đoán xác định sớm đã dẫn đến những di chứng nặng nề [1].

Máy sắc ký lỏng khối phổ đôi LCMS-8040 của hãng Shimadzu là dòng máy có năng suất cao, hiệu quả và tiết kiệm tối đa chi phí cho phòng xét nghiệm. Kit sàng lọc bệnh rối loạn chuyển hóa bẩm sinh NeoMass AAAC của Labsystems có thể sàng lọc 55 bệnh rối loạn chuyển hóa bẩm sinh khác nhau. Để có thể đưa bộ kit vào vào sàng lọc bệnh lý rối loạn

Tác giả liên hệ: Trịnh Thị Phương Dung,

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: phuongdungktyh@gmail.com

Ngày nhận: 20/06/2019

Ngày được chấp nhận: 13/07/2019

chuyển hóa trên LCMS 8040, cần phải thẩm định phương pháp trước khi đưa vào sử dụng. Do đó, đề tài này được thực hiện với mục tiêu: Xác nhận quy trình kỹ thuật định lượng một số acid amin và acylcarnitine trong giọt máu thấm khô bằng kit NeoMass AAAC trên LCMS 8040.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Chất liệu nghiên cứu

Chất liệu nghiên cứu: Vật liệu kiểm tra chất lượng của hãng LabSystems Diagnostics với 3 mức nồng độ khác nhau.

Thiết bị và hóa chất sử dụng: Máy phân tích khối phổ kép LCMS 8040 của Shimadzu và kit NeoMass AAAC của hãng LabSystems Diagnostics.

Địa điểm và thời gian: Khoa sinh hóa, Bệnh viện Nhi Trung ương, từ tháng 9-12 năm 2018

2. Phương pháp

Nghiên cứu thực nghiệm trong phòng xét nghiệm.

Nguyên lý kỹ thuật phương pháp MS/MS trên máy LCMS Shimadzu 8040:

MS/MS là thiết bị sử dụng để phân tách và định lượng các ion dựa trên tỷ số khối lượng/điện tích của chúng (mass/charge ratio). MS/MS tạo ra các phần tử tích điện từ mẫu cần phân tích, sau đó sử dụng điện và từ trường để phân tách và đo lường khối lượng của các phần tử tích điện. Bộ phận phát hiện sẽ tạo ra đồ thị phổ khối của các đỉnh có thể định lượng được bằng các chuẩn nội để định lượng mỗi chất có mặt trong mẫu.

Đánh giá độ chụm

Độ chụm ngắn hạn: phân tích 20 lần liên tiếp 3 mức nồng độ trong 1 ngày. Tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (SD), hệ số biến thiên (CV). Tiêu chuẩn chấp nhận độ chụm ngắn hạn $CV \leq 25\%$ [3].

Độ chụm dài hạn: phân tích 20 lần liên tiếp 3 mức nồng độ trong 20 ngày. Tính giá trị trung

bình và độ lệch chuẩn (SD), hệ số biến thiên (CV). Tiêu chuẩn chấp nhận độ chụm dài hạn $CV \leq 35\%$ [3].

Đánh giá độ chính xác

Độ chính xác được xác định bằng cách tiến hành đo nồng độ ba mức nồng độ QC thấp, trung bình và cao với tối thiểu là 06 lần chạy/02 ngày. Tính giá trị trung bình và độ lệch (bias). Độ lệch được tính theo công thức: $Bias (\%) = (\text{giá trị trung bình} - \text{giá trị đích}) / \text{giá trị đích} * 100 (\%)$. Tiêu chuẩn chấp nhận là giá trị trung bình chạy phải nhỏ hơn hoặc bằng $\pm 20\%$ giá trị đích [4].

Quy trình tách chiết và định lượng acid amin và acylcarnitin

Mẫu máu thấm khô được tách chiết và định lượng các acid amin và acylcarnitine bằng kit hóa chất NeoMass AAAC theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Dung dịch nội chuẩn được pha theo hướng dẫn từ nhà sản xuất. Dung dịch làm việc được chuẩn bị bằng cách pha loãng các dung dịch chất nội chuẩn đã hòa tan ở trên với dung dịch chiết theo tỉ lệ 1: 100 (v/v). Mẫu máu thấm khô (DBS) được cắt hình tròn đường kính 3 mm vào các giếng tương ứng trên khay đáy chữ U. Thêm 100 uL thuốc thử hàng ngày (chứa các nội chuẩn) vào mỗi giếng, ủ 20 phút ở nhiệt độ phòng trên máy lắc với tốc độ 650 vòng/ phút. Sau đó Chuyển 70 uL dịch chiết từ mỗi giếng khay đáy chữ U sang giếng tương ứng của khay đáy chữ V. Đặt khay bằng tấm nhôm để tránh bay hơi. Đưa khay đã được đặt tấm nhôm vào bộ phận bơm mẫu tự động máy phân tích LCMS 8040 của Shimadzu.

3. Quy trình thu thập và xử lý dữ liệu

Các dữ liệu trên máy LC – MS/MS được thu thập qua chế độ multiple reactions monitoring (MRM) sử dụng phần mềm Shimadzu LabSolution. Chế độ cho thu thập dữ liệu MRM để định lượng acid amin và acylcarnitin được thể hiện trong bảng 1. Thời gian chạy mẫu là

1,5 phút và thời gian thu thập dữ liệu là 0,9 phút. Dữ liệu thu được được xử lý bằng phần mềm Shimadzu LabSolution và nồng độ của mỗi chất phân tích được đo bằng công thức: Nồng độ ($\mu\text{mol/l}$) = diện tích chất phân tích x nồng độ chất nội chuẩn /diện tích chất nội chuẩn.

4. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu tuân thủ chặt chẽ theo đạo đức nghiên cứu trong Y học. Vật liệu sử dụng là các mẫu QC, không phải là các mẫu bệnh phẩm. Nghiên cứu thực hiện vì mục đích khoa học.

III. KẾT QUẢ

Bảng 1. Kết quả đánh giá độ chụm ngắn hạn trên máy LCMS 8040.

| Thông số | QC1 | | QC2 | | QC3 | |
|------------|---------------------------------|--------|---------------------------------|-------|---------------------------------|--------|
| | \bar{X} ($\mu\text{mol/L}$) | CV (%) | \bar{X} ($\mu\text{mol/L}$) | CV(%) | \bar{X} ($\mu\text{mol/L}$) | CV (%) |
| Ala | 186,65 | 8,00 | 562,07 | 4,62 | 836,58 | 3,61 |
| Arg | 19,23 | 3,54 | 56,14 | 3,01 | 202,12 | 1,89 |
| Asp | 156,08 | 25,16 | 222,80 | 10,89 | 294,62 | 10,53 |
| Cit | 29,35 | 8,96 | 70,05 | 5,40 | 236,19 | 6,60 |
| Glu | 164,16 | 12,02 | 498,48 | 10,28 | 688,39 | 8,90 |
| Gly | 130,78 | 7,92 | 292,45 | 8,41 | 388,34 | 3,94 |
| Leu | 119,42 | 3,22 | 396,10 | 2,73 | 610,33 | 3,01 |
| Lys | 67,39 | 1,90 | 106,15 | 3,78 | 261,16 | 2,86 |
| Met | 28,09 | 11,32 | 90,62 | 7,22 | 353,20 | 6,21 |
| Orn | 39,19 | 6,53 | 80,75 | 2,84 | 233,58 | 2,99 |
| Phe | 38,50 | 3,30 | 89,71 | 4,39 | 316,25 | 2,65 |
| Pro | 93,85 | 5,13 | 312,39 | 4,17 | 467,00 | 3,48 |
| Ser | 148,03 | 16,20 | 493,99 | 9,28 | 757,55 | 4,23 |
| Tyr | 90,13 | 11,83 | 226,54 | 6,21 | 454,65 | 8,13 |
| Val | 60,55 | 6,39 | 125,34 | 4,09 | 407,84 | 3,26 |
| C0 | 16,06 | 7,72 | 39,23 | 4,26 | 65,52 | 4,11 |
| C2 | 15,02 | 3,46 | 43,83 | 3,67 | 76,13 | 2,93 |
| C3 | 2,46 | 8,94 | 8,51 | 7,29 | 15,62 | 3,91 |
| C4 | 0,18 | 11,11 | 1,30 | 6,92 | 2,30 | 5,68 |

| Thông số | QC1 | | QC2 | | QC3 | |
|------------|---------------------------------|--------|---------------------------------|-------|---------------------------------|--------|
| | \bar{X} ($\mu\text{mol/L}$) | CV (%) | \bar{X} ($\mu\text{mol/L}$) | CV(%) | \bar{X} ($\mu\text{mol/L}$) | CV (%) |
| C5 | 0,18 | 16,67 | 0,94 | 7,45 | 1,73 | 6,98 |
| C6 | 0,12 | 8,33 | 0,87 | 5,81 | 1,66 | 3,61 |
| C8 | 0,13 | 15,38 | 1,29 | 3,88 | 2,40 | 3,35 |
| C10 | 0,06 | 16,67 | 0,51 | 3,92 | 0,96 | 5,21 |
| C12 | 0,08 | 0,00 | 0,56 | 3,64 | 1,09 | 1,85 |
| C14 | 0,12 | 8,33 | 0,56 | 3,57 | 1,00 | 4,00 |
| C16 | 2,98 | 2,35 | 8,73 | 5,61 | 16,23 | 2,77 |
| C18 | 0,99 | 2,04 | 2,00 | 7,00 | 3,25 | 2,15 |

CV độ chụm ngắn hạn của cả ba mức nồng độ (QC1, QC2, QC3) đều nhỏ hơn 25% trừ Asp ở mức QC1 là 25.16%.

Bảng 2. Kết quả đánh giá độ chụm dài hạn trên máy LCMS 8040

| Thông số | QC1 | | QC2 | | QC3 | |
|------------|---------------------------------|--------|---------------------------------|-------|---------------------------------|-------|
| | \bar{X} ($\mu\text{mol/L}$) | CV (%) | \bar{X} ($\mu\text{mol/L}$) | CV(%) | \bar{X} ($\mu\text{mol/L}$) | CV(%) |
| Ala | 218,58 | 14,24 | 529,78 | 14,26 | 800,28 | 11,70 |
| Arg | 21,38 | 18,74 | 57,21 | 15,23 | 245,47 | 13,13 |
| Asp | 191,11 | 8,38 | 286,16 | 11,48 | 445,28 | 13,14 |
| Cit | 24,10 | 14,64 | 55,37 | 11,06 | 202,84 | 8,20 |
| Glu | 163,43 | 15,61 | 421,75 | 9,18 | 659,37 | 12,35 |
| Gly | 226,98 | 22,99 | 456,56 | 15,98 | 633,39 | 17,82 |
| Leu | 177,63 | 14,30 | 459,63 | 9,26 | 715,75 | 7,07 |
| Lys | 75,35 | 18,37 | 93,58 | 8,05 | 239,86 | 7,49 |
| Met | 31,62 | 16,03 | 86,31 | 8,50 | 338,03 | 8,82 |
| Orn | 30,85 | 19,08 | 56,33 | 9,93 | 177,85 | 12,10 |
| Phe | 40,68 | 16,20 | 80,98 | 8,08 | 268,87 | 7,61 |
| Pro | 104,46 | 11,10 | 294,80 | 9,33 | 472,07 | 10,27 |

| Thông số | QC1 | | QC2 | | QC3 | |
|------------|---------------------------------|--------|---------------------------------|-------|---------------------------------|-------|
| | \bar{X} ($\mu\text{mol/L}$) | CV (%) | \bar{X} ($\mu\text{mol/L}$) | CV(%) | \bar{X} ($\mu\text{mol/L}$) | CV(%) |
| Ser | 125,10 | 19,20 | 394,79 | 12,92 | 643,86 | 12,25 |
| Tyr | 74,22 | 19,04 | 213,77 | 11,64 | 332,28 | 11,19 |
| Val | 104,00 | 10,87 | 166,25 | 8,36 | 534,94 | 6,42 |
| C0 | 20,08 | 15,96 | 41,82 | 9,06 | 71,70 | 6,87 |
| C2 | 18,89 | 11,39 | 46,24 | 9,04 | 81,53 | 7,19 |
| C3 | 3,37 | 13,86 | 9,15 | 7,78 | 16,16 | 9,03 |
| C4 | 0,17 | 15,41 | 1,09 | 7,84 | 2,21 | 9,39 |
| C5 | 0,13 | 19,23 | 0,92 | 8,95 | 1,73 | 8,34 |
| C6 | 0,07 | 14,33 | 0,61 | 7,69 | 1,22 | 10,18 |
| C8 | 0,10 | 15,60 | 0,89 | 6,70 | 1,73 | 7,76 |
| C10 | 0,04 | 21,23 | 0,39 | 11,76 | 0,76 | 5,62 |
| C12 | 0,06 | 17,39 | 0,49 | 8,39 | 0,94 | 5,18 |
| C14 | 0,11 | 19,67 | 0,52 | 9,59 | 1,01 | 8,89 |
| C16 | 2,01 | 16,42 | 5,25 | 5,74 | 9,56 | 4,19 |
| C18 | 0,67 | 12,64 | 1,32 | 5,84 | 2,16 | 4,38 |

CV độ chụm dài hạn của cả 3 mức nồng độ (QC1, QC2, QC3) đều nhỏ hơn 35%.

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ chính xác của các xét nghiệm acid amin trên máy phân tích LCMS 8040

| Thông số | QC1 | | | QC2 | | | QC3 | | |
|------------|--------------|-----------|----------|--------------|-----------|----------|--------------|-----------|----------|
| | Giá trị đích | \bar{X} | Bias (%) | Giá trị đích | \bar{X} | Bias (%) | Giá trị đích | \bar{X} | Bias (%) |
| Ala | 197,00 | 218,58 | 10,95 | 548,00 | 529,78 | -3,32 | 840,00 | 800,28 | -4,73 |
| Arg | 21,00 | 21,38 | 1,81 | 60,10 | 57,21 | -4,81 | 256,30 | 245,47 | -4,22 |
| Asp | 158,00 | 191,11 | 20,95 | 266,90 | 286,16 | 7,21 | 428,10 | 445,28 | 4,01 |
| Cit | 25,60 | 24,10 | -5,86 | 59,60 | 55,37 | -7,09 | 227,20 | 202,84 | -10,72 |
| Glu | 157,40 | 163,43 | 3,83 | 376,20 | 421,75 | 12,11 | 600,40 | 659,37 | 9,82 |

| Thông số | QC1 | | | QC2 | | | QC3 | | |
|------------|--------------|-----------|----------|--------------|-----------|----------|--------------|-----------|----------|
| | Giá trị đích | \bar{X} | Bias (%) | Giá trị đích | \bar{X} | Bias (%) | Giá trị đích | \bar{X} | Bias (%) |
| Gly | 248,00 | 226,98 | -8,47 | 519,60 | 456,56 | -12,13 | 691,20 | 633,39 | -8,36 |
| Leu | 158,30 | 177,63 | 12,21 | 472,20 | 459,63 | -2,66 | 788,20 | 715,75 | -9,19 |
| Lys | 85,70 | 75,35 | -12,07 | 117,90 | 93,58 | -20,62 | 293,10 | 239,86 | -18,16 |
| Met | 34,00 | 31,62 | -7,00 | 96,60 | 86,31 | -10,65 | 420,50 | 338,03 | -19,61 |
| Orn | 31,40 | 30,85 | 1,75 | 63,50 | 56,33 | -11,29 | 202,10 | 177,85 | -11,99 |
| Phe | 41,70 | 40,68 | -2,45 | 71,90 | 80,98 | 12,62 | 319,40 | 268,87 | -15,82 |
| Pro | 90,70 | 104,46 | 15,17 | 296,40 | 294,80 | -0,54 | 512,10 | 472,07 | -7,82 |
| Ser | 126,00 | 125,10 | -0,71 | 397,70 | 394,79 | -0,73 | 681,00 | 643,86 | -5,45 |
| Tyr | 89,30 | 74,22 | -16,89 | 263,20 | 213,77 | -18,78 | 442,10 | 332,28 | -24,84 |
| Val | 91,80 | 104,00 | 13,29 | 180,10 | 166,25 | -7,69 | 577,80 | 534,94 | -7,42 |

Độ lệch của hầu hết ba mức nồng độ QC đều nhỏ hơn $\pm 20\%$ trừ Asp ở mức QC1 là 20,95%, Lys ở QC2 là -20,62% và ở mức QC3 có Tyr là -24,84%.

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ chính xác của các xét nghiệm acylcarnitine trên máy phân tích LCMS 8040

| Thông số | QC1 | | | QC2 | | | QC3 | | |
|------------|--------------|-----------|----------|--------------|-----------|----------|--------------|-----------|----------|
| | Giá trị đích | \bar{X} | Bias (%) | Giá trị đích | \bar{X} | Bias (%) | Giá trị đích | \bar{X} | Bias (%) |
| C0 | 20,40 | 20,08 | -1,57 | 44,90 | 41,82 | -6,86 | 89,80 | 71,70 | -20,15 |
| C2 | 17,20 | 18,89 | 9,82 | 42,80 | 46,24 | 8,04 | 79,10 | 81,53 | 3,07 |
| C3 | 2,90 | 3,37 | 16,21 | 7,90 | 9,15 | 15,82 | 15,70 | 16,16 | 2,93 |
| C4 | 0,15 | 0,17 | 13,33 | 0,94 | 1,09 | 15,96 | 1,96 | 2,21 | 12,75 |
| C5 | 0,14 | 0,13 | -7,14 | 1,09 | 0,92 | -15,59 | 2,19 | 1,73 | -21,00 |
| C6 | 0,07 | 0,07 | 0 | 0,54 | 0,61 | 12,96 | 1,14 | 1,22 | 7,02 |
| C8 | 0,10 | 0,10 | 0 | 1,00 | 0,89 | -11 | 2,06 | 1,73 | -16,02 |
| C10 | 0,04 | 0,04 | 0 | 0,41 | 0,39 | -4,88 | 0,94 | 0,76 | -19,15 |
| C12 | 0,05 | 0,06 | 20,00 | 0,51 | 0,49 | -3,92 | 1,07 | 0,94 | -12,15 |

| Thông số | QC1 | | | QC2 | | | QC3 | | |
|------------|--------------|-----------|----------|--------------|-----------|----------|--------------|-----------|----------|
| | Giá trị đích | \bar{X} | Bias (%) | Giá trị đích | \bar{X} | Bias (%) | Giá trị đích | \bar{X} | Bias (%) |
| C14 | 0,10 | 0,11 | 10,00 | 0,45 | 0,52 | 15,56 | 0,93 | 1,01 | 8,60 |
| C16 | 2,16 | 2,01 | -6,94 | 6,00 | 5,25 | -12,50 | 11,57 | 9,56 | -17,37 |
| C18 | 0,70 | 0,67 | -4,28 | 1,52 | 1,32 | -13,16 | 2,71 | 2,16 | -20,29 |

Độ lệch của hầu hết ba mức nồng độ QC đều nhỏ hơn $\pm 20\%$ trừ C0 là $-20,15\%$, C5 là -21% và C18 là $-20,29\%$.

IV. BÀN LUẬN

Thẩm định phương pháp xét nghiệm là việc cần phải tiến hành trước khi đưa các máy xét nghiệm vào sử dụng thường quy, sau khi có bất kì chỉnh sửa/cải tiến từ nhà sản xuất hoặc di chuyển thiết bị và tại các khoảng thời gian nhất định nhằm mục đích xác nhận các thông số kỹ thuật của phương pháp mà nhà sản xuất công bố là phù hợp với điều kiện thực tế của phòng xét nghiệm [5]. Kết quả xét nghiệm phải đảm bảo chính xác, tin cậy để phục vụ cho công tác lâm sàng được tốt nhất, do vậy việc thẩm định phương pháp trở nên rất thiết yếu. Nghiên cứu này tiến hành nhằm xác nhận phương pháp xét nghiệm sàng lọc rối loạn chuyển hoá bẩm sinh bằng kit NeoMass AAAC trên LCMS 8040 của Shimadzu. Kết quả bảng 2 và bảng 3 cho thấy hệ số biến thiên (CV) của thực nghiệm đánh giá độ chụm ngắn hạn và độ chụm dài hạn của hai mức đều đạt tiêu chuẩn. Hệ số biến thiên (CV) độ chụm ngắn hạn của 3 mức nồng độ thấp, trung bình, cao dao động lần lượt là $0 - 25,16\%$, $2,28 - 10,89\%$ và $1,85 - 10,53\%$ với giá trị trung bình và độ lệch chuẩn tương ứng là $8,86 \pm 5,8\%$, $5,57 \pm 2,29\%$, $4,4 \pm 2,2\%$. Trong đánh giá độ chụm dài hạn, khoảng dao động của hệ số biến thiên (CV) trên 3 mức nồng độ thấp, trung bình, cao lần lượt là $3,4 - 22,9\%$, $2,61 - 15,98\%$ và $13,12 - 17,82\%$ với giá trị trung bình và độ lệch chuẩn tương ứng là 16

$\pm 3,4\%$, $9,69 \pm 2,61\%$, $9,13 \pm 3,12\%$. Điều này chứng tỏ độ chụm của tất cả các thông số được đánh giá đều đạt tiêu chuẩn cho phép. Kết quả nghiên cứu này khá tương đồng với nghiên cứu của Sarker và cộng sự năm 2018 khi tiến hành nghiên cứu thẩm định phương pháp trên LCMS – 8050 của Shimadzu [6]. Theo nghiên cứu này, hầu hết các thông số tiến hành thực nghiệm đều đảm bảo độ chụm.

Thực nghiệm đánh giá độ chính xác phân tích mẫu QC ba mức nồng độ với 20 lần chạy trong vòng 20 ngày. Độ chính xác được đánh giá qua độ lệch (bias). Theo hướng dẫn của FDA, độ chính xác đạt tiêu chuẩn khi độ lệch giữa giá trị trung bình các lần chạy nhỏ hơn hoặc bằng $\pm 20\%$ [4]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, độ lệch của tất cả các thông số phân tích đều dưới $\pm 20\%$ trừ Aspartat ở mức nồng độ thấp, Lysin ở mức nồng độ trung bình và Tyrosin, C0, C5, C18 ở mức nồng độ cao. Tuy nhiên, tiêu chí chấp nhận về độ chính xác đưa ra trong hướng dẫn NBS04A của CLSI là độ lệch có thể tới 40% thì các kết quả này đều chấp nhận được [3]. Kết quả nghiên cứu này khá tương đồng với nghiên cứu của Sarker và cộng sự khi thẩm định phương pháp trên máy phân tích LCMS – 8050. Theo nghiên cứu này, hầu hết các thông số tiến hành thực nghiệm đều đảm bảo độ chính xác trừ C8 và C10 lớn

hơn 20% ở mức nồng độ thấp [6]. Một nghiên cứu khác của Richard và cộng sự năm 2015 khi tiến hành thẩm định phương pháp trên hệ thống máy Waters Synapt G2 UPLC-qTOF-MS cũng cho kết quả tương đương, tất cả các thông số phân tích được thẩm định phương pháp đều có độ chính xác và độ chụm đảm bảo để thực hiện xét nghiệm [7].

Về đánh giá độ chính xác trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng mẫu QC làm vật liệu nghiên cứu, với đại lượng cần tính toán là độ lệch giữa các lần phân tích và giá trị đích. Việc sử dụng giá trị trung bình của các mẫu QC mà nhà sản xuất cung cấp làm giá trị đích là hạn chế của nghiên cứu. Việc sử dụng các vật liệu tham chiếu là lý tưởng nhất cho việc đánh giá độ chính xác, tuy nhiên việc tiếp cận các vật liệu tham chiếu không phải dễ dàng với các phòng xét nghiệm lâm sàng. Việc sử dụng vật liệu ngoại kiểm với giá trị trung bình của nhóm tương đương làm giá trị đích là lựa chọn thích hợp hơn cho phòng xét nghiệm lâm sàng. Tuy nhiên, việc lựa chọn vật liệu nghiên cứu còn phụ thuộc vào chi phí, thời gian và quy mô, số lượng mẫu có thể thu thập được [8]. Vì chương trình ngoại kiểm sàng lọc sơ sinh của CDC tại Khoa Sinh hóa – Bệnh viện Nhi Trung ương được thực hiện 1 lần/quý còn mẫu QC lại được thực hiện hằng ngày. Do vậy, với thời gian nghiên cứu ngắn, chưa thể đủ các dữ liệu ngoại kiểm để đánh giá độ chính xác của phương pháp. Bên cạnh đó, FDA đưa ra hướng dẫn đánh giá độ chính xác với vật liệu là mẫu QC, nên việc sử dụng mẫu QC vẫn đáp ứng được với điều kiện triển khai nghiên cứu này.

V. KẾT LUẬN

Xét nghiệm phân tích các acid amin và acylcarnitine sàng lọc bệnh rối loạn chuyển hóa bẩm sinh sử dụng kit NeoMass AAAC trên LCMS – 8040 của Shimadzu có độ chụm và độ chính xác chấp nhận được.

Lời cảm ơn

Các tác giả xin bày tỏ lời cảm ơn tới Khoa Sinh hóa Bệnh viện Nhi trung ương đã cho phép thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Hoàng Hạnh Phúc, et al.,(2008)**. Chẩn đoán bệnh rối loạn chuyển hóa bẩm sinh bằng kỹ thuật sắc ký khí khối phổ. *Tạp chí nghiên cứu y học*, **57(4)**, 1 - 5.
2. **Hutcheson et al. JMG 1998.1:36.** Applegarth et al. *J Pediatr* 2000 ; Dionisi- Vici et al. *J Pediatr* 2002 ; Zschoche J et al. 2001.
3. **Clinical Laboratory Standard Institute (2010)**. Newborn Screening by Tandem Mass Spectrometry; Approved Guideline. CLSI document NBS04-A, **30(16)**.
4. **U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration.** Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry (2018).
5. **Clinical Laboratory Standard Institute.** Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; *Approved Guideline—Third Edition (2013)*. CLSI document EP09, **33(11)**.
6. **Sarker et al (2018)** Almpaired acylcarnitine profile in transfusion-dependent beta-thalassemia major patients in Bangladesh. *J Adv Res*, **12**, 55 – 66.
7. **Richard Joyce et al (2016)** Development and validation of an ultra-performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry method for rapid quantification of free amino acids in human urine. *Amino Acids*, **48**, 219 – 234.
8. **Suresh K, Thomas SV, Suresh G. (2011)** Design. Data analysis and sampling techniques for clinical research. *Ann Indian Acad Neurol*, **14**, 287 – 290.

Summary

METHOD VALIDATION FOR SCREENING OF INBORN METABOLISM ABNORMALITY ON SHIMADZU LCMS 8040

Method validation is an essential process to obtain trustworthy clinical lab result. Aims: To verify the precision and accuracy of the technical procedure for quantification of several amino acids and acylcarnitines in dry blood spots using MS/MS method. Quality control materials and NeoMass AAAC kit from Labsystems Diagnostics were used to verify the accuracy and precision of amino acids and acylcarnitines quantitation on Shimadzu LCMS 8040. The acceptable criteria for precision and accuracy are taken from CLSI NBS04A guideline. Results: within precision $\leq 25\%$, between precision $\leq 35\%$, bias $\leq 20\%$ with 3 QC levels. The accuracy and precision of all analytes were verified to meet the acceptable criteria as claimed by the manufacture in Biochemistry Department of National Pediatric Hospital. Method screening of inborn errors of metabolism using NeoMass AAAC kit on LCMS 8040 is proven to be reliable and can be applied for newborn screening

Keywords: Shimadzu LCMS 8040, accuracy, precision, NBS04A