
راهنمای کاربری کیت کامل غربالگری نوزادان



PH NBS/ PH NBS-D
Amino Acids and Acylcarnitines
From Dried Blood Spots

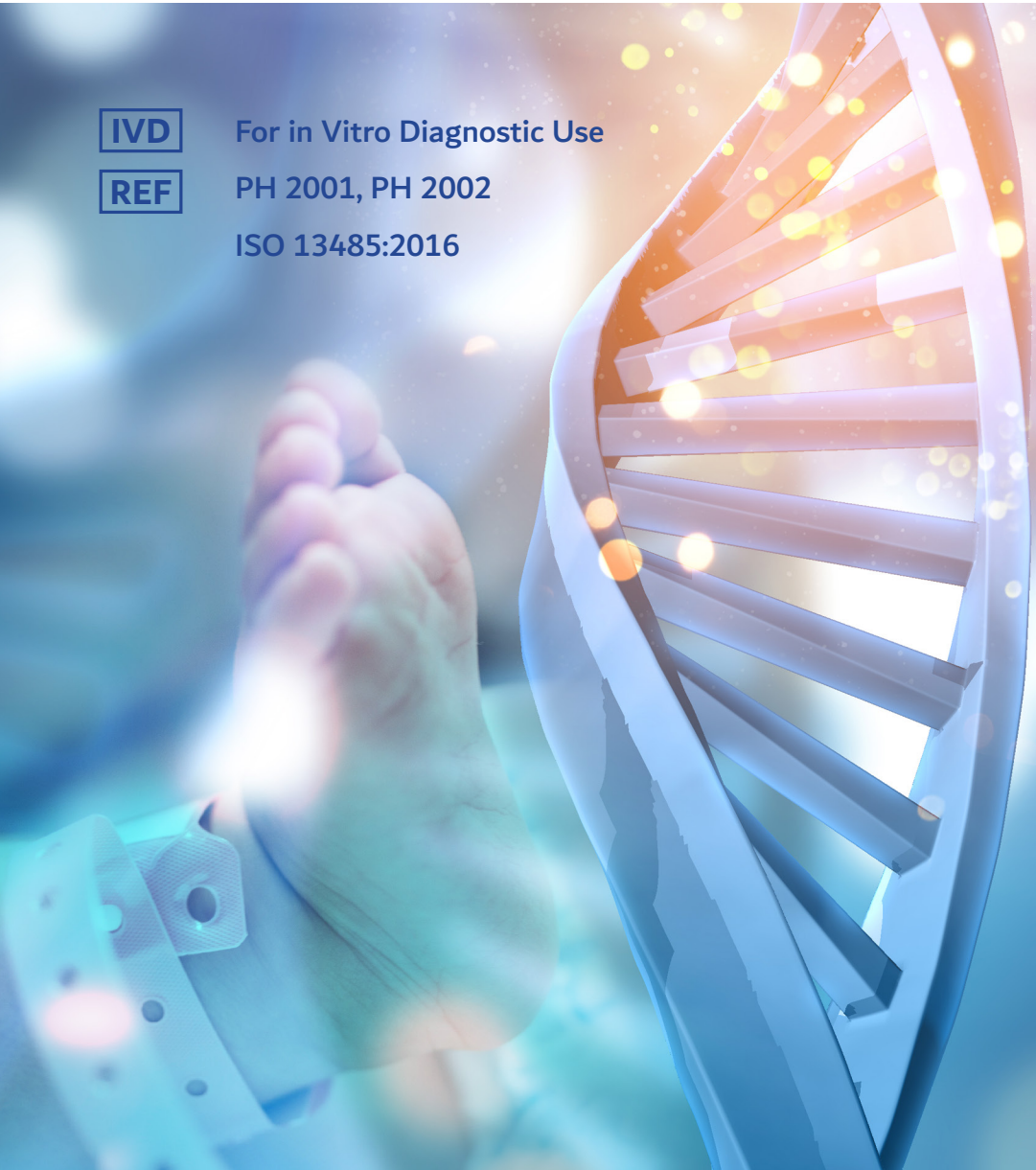
IVD

For in Vitro Diagnostic Use

REF

PH 2001, PH 2002

ISO 13485:2016





۱	۱- علائم تجهیزات پزشکی
۱	۲- مورد مصرف
۳	۳- پیشینه بالینی
۳	۱-۳- اختلالات اکسیداسیون اسیدهای چرب (FAO)
۳	۲-۳- اختلالات اسیدوری ارگانیک (OA)
۳	۳-۳- آمینو اسیدوپاتی ها
۳	۴- بیماری های هدف
۴	۵- شرح کلی آزمایش
۷	۶- اجزای کیت کامل
۷	۱-۶- اطلاعات سفارش
۸	۱-۱-۶- غلظت استاندارد داخلی
۹	۲-۶- اطلاعات ایمنی
۹	۳-۶- دفع زباله های آزمایشگاهی
۹	۷- تجهیزات مورد نیاز
۱۰	۸- اجرای روش تحلیلی
۱۰	۱-۸- جمع آوری و ذخیره سازی نمونه
۱۰	۲-۸- ذخیره سازی نمونه های خون خشک شده در حین و پس از آنالیز
۱۱	۳-۸- آماده سازی نمونه
۱۱	۱-۳-۸- مراحل آماده سازی نمونه برای کیت کامل PH NBS
۱۲	۱-۱-۳-۸- رقیق سازی استاندارد داخلی لیوفیلیز شده
۱۲	۲-۱-۳-۸- استخراج / افزایش استاندارد داخلی
۱۲	۳-۱-۳-۸- انتقال
۱۲	۴-۱-۳-۸- آنالیز LC-MS-MS
۱۲	۲-۳-۸- مراحل آماده سازی نمونه برای کیت کامل PH NBS-D
۱۴	۱-۲-۳-۸- رقیق سازی استاندارد داخلی لیوفیلیز شده
۱۴	۲-۲-۳-۸- استخراج / افزایش استاندارد داخلی
۱۴	۳-۲-۳-۸- انتقال
۱۴	۴-۲-۳-۸- مشتق سازی
۱۴	۵-۲-۳-۸- رقیق سازی
۱۴	۶-۲-۳-۸- آنالیز LC-MS-MS
۱۴	۴-۸- دستگاه طیف سنج جرمی متوالی
۱۴	۱-۴-۸- بهینه سازی طیف سنج جرمی متوالی و آنالیز آزمایشی
۱۵	۲-۴-۸- پایداری تجهیز آنالیزی
۱۵	۳-۴-۸- اندازه گیری و ارزیابی نمونه
۱۵	۹- ارزیابی عملکرد
۱۵	۱-۹- درستی اندازه گیری
۱۵	۱-۱-۹- صحت اندازه گیری
۱۶	۱-۱-۹- بازیابی











فهرست مطالب

۱۷	۲-۱-۱-۹- مقایسه روش
۱۸	۲-۱-۹- دقت اندازه گیری
۱۸	۱-۲-۱-۹- تکرار پذیری (دقت درون سنجی)
۱۹	۲-۲-۱-۹- تجدید پذیری (دقت برون سنجی)
۲۲	۲-۹- حساسیت آنالیز (LOD, LLOQ)
۲۳	۳-۹- اختصاصیت آنالیتیکال
۲۳	۱-۳-۹- تداخلات
۲۳	۱-۱-۳-۹- تداخل آسپارژین و ارنیتین (M=132 Da)
۲۳	۲-۱-۳-۹- تداخل گلوتامیک اسید و آسپیل کارنیتین (C2) (M=260 Da)
۲۳	۳-۱-۳-۹- تداخل لوسین و ایزولوسین (M=132 Da)
۲۳	۴-۱-۳-۹- تداخل لوسین و هیدروکسی پرولین (M=132 Da)
۲۳	۲-۳-۹- تست بلانک
۲۳	۳-۳-۹- اثر حافظه
۲۳	۴-۹- محدوده اندازه گیری سنجش (خطی بودن)



۱- علائم تجهیزات پزشکی

نمادها مطابق با ISO 15223-1:2012 (نمادهایی که باید با برچسب های تجهیزات پزشکی استفاده شوند، برچسب ها و اطلاعاتی که باید ارائه شود)، بر روی برچسب های محصول و در دفترچه راهنما استفاده می شوند.

	تجهیزات پزشکی تشخیص آزمایشگاهی
	برای استفاده به دستور العمل ها مراجعه کنید
	حد بالایی دما
	محدودیت دما
	تاریخ مصرف
	شماره کاتالوگ
	شماره انباشته
	شماره بسته بندی
	مورد استفاده برای n تست
	سازنده

۲- مورد مصرف

کیت های کامل PH NBS/PH NBS-D برای اندازه گیری و ارزیابی نیمه کمی غلظت اسیدهای آمینه، کارنیتین آزاد و آسپیل کارنیتین ها در نمونه های خون خشک شده روی کاغذ صافی برای غربالگری نوزادان در نظر گرفته شده است. مقادیر ارزیابی شده آنالیت ها (جدول ۱) و ارتباط آنها با یکدیگر برای ایجاد الگوهای غلظتی آنالیت در تفسیر اختلال متابولیک در غربالگری نوزاد به کار می روند.

جدول ۱ - فهرست آنالیت های قابل اندازه گیری با استفاده از کیت های کامل PH NBS/PH NBS-D

Analyte	Abbreviation
Amino acids	
Alanine	Ala
Arginine	Arg
Aspartic Acid	Asp
Citrulline	Cit
Glutamic Acid	Glu
Glycine	Gly
Leucine/ Isoleucine/ Hydroxyproline	Leu/Ile/Pro-OH
Methionine	Met
Ornithine	Orn
Phenylalanine	Phe
Proline	Pro
Tyrosine	Tyr
Valine	Val
Acylcarnitines and free Carnitine	
Carnitine	C0
Acetylcarnitine	C2
Propionylcarnitine	C3
Malonylcarnitine/3-Hydroxybutyrylcarnitine	C3DC/C4OH
Butyrylcarnitine	C4
Methylmalonylcarnitine/3-Hydroxyisovalerylcarnitine	C4DC/C5OH
Isovalerylcarnitine	C5
Tiglylcarnitine	C5:1
Glutarylcarnitine/3-Hydroxyhexanoylcarnitine	C5DC/C6OH
Hexanoylcarnitine	C6
Adipylcarnitine	C6DC
Octanoylcarnitine	C8
Octenoylcarnitine	C8:1
Decanoylcarnitine	C10
Decenoylcarnitine	C10:1
Decadienoylcarnitine	C10:2
Dodecanoylcarnitine	C12
Dodecenoylcarnitine	C12:1
Tetradecanoylcarnitine	C14
Tetradecenoylcarnitine	C14:1
Tetradecadienoylcarnitine	C14:2
3-Hydroxy-Tetradecanoylcarnitine	C14OH
Hexadecanoylcarnitine	C16
Hexadecenoylcarnitine	C16:1
3-Hydroxy-Hexadecanoylcarnitine	C16OH
3-Hydroxy-Hexadecenoylcarnitine	C16:1OH
Octadecanoylcarnitine	C18
Octadecenoylcarnitine	C18:1
Octadecadienoylcarnitine	C18:2
3-Hydroxy-Octadecanoylcarnitine	C18OH
3-Hydroxy-Octadecenoylcarnitine	C18:1OH

اجزای کیت کامل PH NBS/PH NBS-D مطابق این دستورالعمل مورد استفاده قرار می گیرند.



۳- پیشینه بالینی

غربالگری نوزاد یک اقدام پیشگیرانه برای تشخیص نقایص متابولیک ژنتیکی است. کارنتین آزاد و آسیل کارنتین ها نشانگرهای اختلالات اکسیداسیون اسیدهای چرب (FAO) یا اسیدوری آلی (OA) و اسیدهای آمینه نشانگر نقص متابولیک اسیدهای آمینه هستند.

۳-۱- اختلالات اکسیداسیون اسیدهای چرب (FAO)

اختلالات اکسیداسیون اسیدهای چرب، گروهی از حدود ۲۰ نقص در انتقال اسیدهای چرب و بتا-اکسیداسیون در میتوکندری هستند، که به عنوان اختلالات اتوزومی مغلوب به ارث می رسند. اختلالات FAO به دلیل فقدان یا کمبود آنزیم های مورد نیاز برای تجزیه یا اکسیداسیون اسیدهای چرب ایجاد می شوند که منجر به تاخیر در رشد ذهنی و جسمی می شوند.

۳-۲- اختلالات اسیدوری ارگانیک (OA)

اسیدوری های ارگانیک (OA) یک دسته مهم از اختلالات متابولیک ارثی هستند، که به دلیل نقص در مسیرهای متابولیک میانی کربوهیدرات ها، اسیدهای آمینه و اکسیداسیون اسیدهای چرب ایجاد می شوند. این نقص، باعث تجمع اسیدهای آلی در بافت ها و دفع آنها در ادرار می شود، که در نهایت، منجر به بروز علائم بالینی متعدد از جمله اسیدوز متابولیک، کتوز، هیپیرآمونمی، اختلال رشد، عفونت یا کما می شود.

۳-۳- آمینو اسیدوپاتی ها

این نقص ارثی، به صورت فقدان یا فعالیت بیولوژیکی جزئی آنزیم های دخیل در متابولیسم اسیدهای آمینه منعکس می شود. در نتیجه، غلظت اسیدهای آمینه تحت تاثیر قرار گرفته و متابولیت های آنها در بدن نوزاد افزایش می یابد. این تغییرات غلظت، می تواند اثرات مضر شدیدی بر سلامت نوزاد از جمله مرگ در پی داشته باشد. اختلالات اسید آمینه با حمایت پزشکی و اعمال محدودیت های تغذیه ای، مکمل ها و رژیم تغذیه ای خاص که مصرف یک اسید آمینه یا در برخی موارد مصرف پروتئین ها را محدود می کند، مدیریت می شوند.

۴- بیماری های هدف

دامنه و نیازهای برنامه غربالگری نوزادان در کشورهای مختلف متفاوت است. در ایران، غربالگری ۵۳ بیماری هدف در حال حاضر توسط وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی طبق جدول ۲ برنامه ریزی شده است.

جدول ۲- بیماری های هدف در ایران

Uniform Screening Panel 1 (20 Core Conditions)		
Amino Acid Disorders	Fatty Acid Oxidation Disorders	Organic Acid Disorders
Argininosuccinic Aciduria	Primary Carnitine Deficiency / Carnitine Transporter Defect	Propionic Acidemia
Citrullinemia Type 1	Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency	Methylmalonic Acidemia: Methylmalonyl-CoA mutase
Maple Syrup Urine Disease	Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency	Methylmalonic Acidemia: Cobalamin Disorders
Homocystinuria	Long Chain 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Deficiency	Isovaleric Acidemia
Phenylketonuria Classic	Trifunctional Protein Deficiency	3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase Deficiency
Tyrosinemia Type 1		3-Hydroxy-3-Methylglutaric Aciduria
		Holocarboxylase Synthetase Deficiency
		β -Ketothiolase Deficiency
		Glutaric Acidemia Type 1
Uniform Screening Panel 2 (33 Secondary Conditions)		
Amino Acid Disorders	Fatty Acid Oxidation Disorders	Organic Acid Disorders
Argininemia	Short Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency	Methylmalonic acidemia, cblC form
Citrullinemia Type 2	Medium/Short Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency	Methylmalonic acidemia, cblD form
Hypermethioninemia	Glutaric Acidemia Type 2	Malonic Acidemia
Benign Hyperphenylalaninemia	Medium Chain ketoacyl-CoA Thiolase Deficiency	Isobutyrylglycinuria
Biopterin Biosynthesis Defect (2 conditions)	2,4-Dienoyl-CoA Reductase Deficiency	2-Methylbutyrylglycinuria
Biopterin Regeneration Defect (2 conditions)	Carnitine Palmitoyltransferase 1 Deficiency	3-Methylglutaconic Aciduria
Non-Ketotic Hyperglycinemia	Carnitine Palmitoyltransferase 2 Deficiency	2-Methyl-3-hydroxybutyric Aciduria
Ornithine Transcarbamylase Deficiency	Carnitine Acylcarnitine Translocase Deficiency	Ethylmalonic Encephalopathy
Carbamoyl Phosphate Synthetase 1 Deficiency		
HHH Syndrome		
Tyrosinemia Types 2,3 (2 conditions)		
Glycine N-methyltransferase (GNMR) deficiency		
Adenosylhomocysteine hydrolase deficiency		
Pyruvate carboxylase deficiency		

۵- شرح کلی آزمایش

کیت های PH NBS/PH NBS-D با ۲۶ استاندارد داخلی و نمونه های کنترلی برای اندازه گیری کارنیتین ها و اسیدهای آمینه عرضه می شوند. بنابراین، کیت های PH NBS/PH NBS-D قابلیت اندازه گیری ۱۳ اسید آمینه و ۳۱ گونه کارنیتین را دارند (جدول ۳)، زیرا آسپیل کارنیتین هایی با طول زنجیره یکسان دارای ویژگی های عملکردی مشابهی هستند. به این ترتیب می توان از استاندارد داخلی C16 برای تعیین غلظت سری آسپیل کارنیتین C16، C16:1، C16OH و C16:1OH استفاده کرد. بعلاوه، C16 غیر نشاندار، می تواند به عنوان یک کنترل خارجی برای تمام سری های آسپیل کارنیتین C16 استفاده شود.

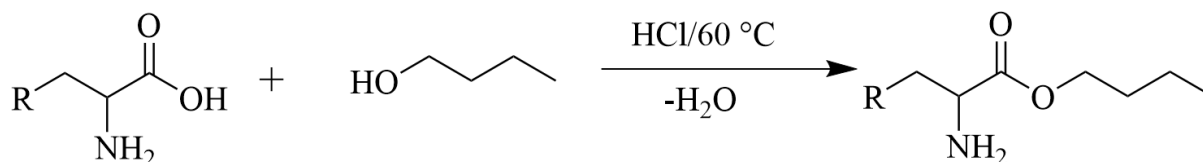


جدول ۳- آنالیت های قابل اندازه گیری با استفاده از کیت های PH NBS/PH NBS-D و استانداردهای داخلی و کنترل های مربوط به آنها

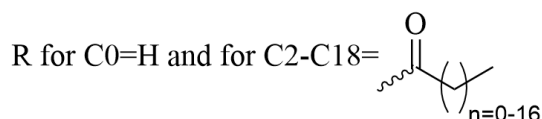
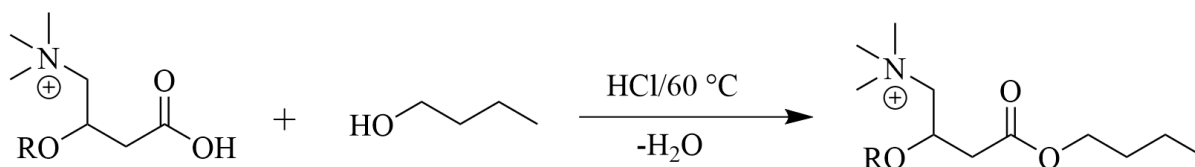
Analyte	Internal Standard	Controls
Amino acids		
Alanine	Alanine-D4	Alanine
Arginine	Arginine-D7	Arginine
Aspartic Acid	Aspartic acid-D3	Aspartic Acid
Citrulline	Citrulline-D2	Citrulline
Glutamic Acid	Glutamic acid-D5	Glutamic Acid
Glycine	Glycine- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	Glycine
Leucine/ Isoleucine/ Hydroxyproline	Leucine-D3	Leucine
Methionine	Methionine-D3	Methionine
Ornithine	Ornithine-D6	Ornithine
Phenylalanine	Phenylalanine-D5	Phenylalanine
Proline	Proline-D7	Proline
Tyrosine	Tyrosine-D4	Tyrosine
Valine	Valine-D8	Valine
Acylcarnitines and free Carnitine		
C0	C0-Carnitine-D9	C0
C2	C2-Carnitine-D3	C2
C3	C3-Carnitine-D3	C3
C3DC/C4OH	C4-Carnitine-D3	C4
C4	C4-Carnitine-D3	C4
C4DC/C5OH	C5-Carnitine-D9	C5
C5	C5-Carnitine-D9	C5
C5:1	C5-Carnitine-D9	C5
C5DC/C6OH	C5DC-Carnitine-D9	C5DC
C6	C6-Carnitine-D3	C6
C6DC	C5DC-Carnitine-D9	C5DC
C8	C8-Carnitine-D3	C8
C8:1	C8-Carnitine-D3	C8
C10	C10-Carnitine-D3	C10
C10:1	C10-Carnitine-D3	C10
C10:2	C10-Carnitine-D3	C10
C12	C12-Carnitine-D3	C12
C12:1	C12-Carnitine-D3	C12
C14	C14-Carnitine-D3	C14
C14:1	C14-Carnitine-D3	C14
C14:2	C14-Carnitine-D3	C14
C14OH	C14-Carnitine-D3	C14
C16	C16-Carnitine-D3	C16
C16:1	C16-Carnitine-D3	C16
C16OH	C16-Carnitine-D3	C16
C16:1OH	C16-Carnitine-D3	C16
C18	C18-Carnitine-D3	C18
C18:1	C18-Carnitine-D3	C18
C18:2	C18-Carnitine-D3	C18
C18OH	C18-Carnitine-D3	C18
C18:1OH	C18-Carnitine-D3	C18

آنالیز به صورت نیمه کمی روی لکه های خونی خشک شده انجام می شود. استاندارد داخلی به نمونه افزوده شده و آنالیت ها از ماتریس خون خشک شده استخراج می شوند و با و بدون مرحله مشتق سازی با استفاده از یک سیستم طیف سنجی جرمی متوالی آنالیز می شوند. پاسخ هر آنالیت نسبت به استاندارد داخلی نشاندار شده با ایزوتوپ پایدار مربوطه، با غلظت آن آنالیت متناسب است.

در مرحله مشتق سازی، آنالیت ها به مشتق n-Buthylester مربوطه تبدیل می شوند (شکل های ۱ و ۲).



شکل ۱. مشتق سازی اسیدهای آمینه (R زنجیره جانبی اسیدهای آمینه است)



شکل ۲. مشتق سازی آسیل کاربنتین ها

پس از آماده سازی نمونه، نمونه به طیف سنج جرمی متوالی تزریق شده و وارد منبع یونساز می شود. در طی یونیزاسیون الکترواسپری، اجزای نمونه یونیزه شده و سپس به فاز گاز منتقل می شوند. یون ها از یک محفظه خلاء عبور می کنند و مولکول های غیر باردار دفع می شوند. پرتو یون متمرکز شده به اولین فیلتر جرمی چهار قطبی وارد می شود و یون ها با توجه به نسبت بار به جرم شان (m/z) از هم جدا می شوند.

یون هایی که در سل برخورد حرکت می کنند با مولکول های گاز برخورد کرده و به یون های کوچکتر شکسته می شوند. یون های کوچکتر یا یون های دختر نیز بر مبنای نسبت بار به جرم شان (m/z) در مرحله دوم آنالیز جرمی جدا می شده و در نهایت برای ثبت سیگنال وارد آشکارساز می شوند. بنابراین، اندازه گیری آنالیت ها با روش MRM انجام می گیرد. اندازه گیری در روش MRM، با اندازه گیری آنالیت بر اساس انتقالات جرمی مختص آن آنالیت، شناسایی و تعیین کمیت را با گزینش پذیری و حساسیت بالا، تضمین می نماید.



۶- اجزای کیت کامل

۶-۱- اطلاعات سفارش

جدول ۴- اطلاعات سفارش برای کیت کامل PH NBS، شماره سفارش PH 2001

Order No.	Description	Quantity
PH 2001	PH NBS complete kit, for Amino Acids and Acylcarnitines, From Dried Blood spot for 960 assays	1 pc
	Internal Standard	4 vials
	Mobile Phase	1 bottle
	Rinsing Solution	1 bottle
	Extraction Buffer	2 bottles
	Reconstitution Buffer	2 bottles
	Protective Sheets for 96 Well Plates, aluminum foil	10 pcs
	96 Well Plates, flat bottom	10 pcs
	96 Well Plates, conical bottom	10 pcs
	Dried Blood Spot Control Level I , II	1 pc
	Manual	

جدول ۵- اطلاعات سفارش برای کیت کامل PH NBS-D، شماره سفارش PH 2002

Order No.	Description	Quantity
PH 2002	PH NBS-D complete kit, for Amino Acids and Acylcarnitines, From Dried Blood spot for 960 assays	1 pc
	Internal Standard	4 vials
	Mobile Phase	1 bottle
	Rinsing Solution	1 bottle
	Extraction Buffer	2 bottles
	Derivatization Reagent	3 bottles
	Reconstitution Buffer	2 bottles
	Protective Sheets for 96 Well Plates, aluminum foil	10 pcs
	96 Well Plates, flat bottom	10 pcs
	96 Well Plates, conical bottom	10 pcs
	Dried Blood Spot Control Level I , II	1 pc
	Manual	

تاریخ انقضای تمام اجزای کیت روی برچسب آنها درج شده است. هر جزء را همانطور که در برچسب های مربوطه درج شده است، نگهداری کنید.

۱-۱-۶- غلظت استاندارد داخلی

گواهی کنترل کیفیت مختص هر سری تولید موجود در کیت، غلظت استانداردهای داخلی اسیدهای آمینه، کارنیتین آزاد و آسیل کارنیتین های نشاندار شده با ایزوتوپ پایدار را به عنوان غلظت آنها در هر ویال پس از رقیق سازی ارائه می دهد (جدول ۶).

جدول ۶. غلظت اسیدهای آمینه / آسیل کارنیتین ها

Substance	Unit	Concentration
Alanine-D4	mg/l	1.15
	μmol/l	12.3
Arginine-D7	mg/l	0.56
	μmol/l	3.08
Aspartic acid-D3	mg/l	1.93
	μmol/l	14.2
Citrulline-D2	mg/l	0.55
	μmol/l	3.11
Glutamic acid-D5	mg/l	1.94
	μmol/l	12.7
Glycine- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	mg/l	1.69
	μmol/l	21.7
Leucine-D3	mg/l	1.73
	μmol/l	12.9
Methionine-D3	mg/l	0.74
	μmol/l	4.84
Ornithine-D6	mg/l	1.02
	μmol/l	7.4
Phenylalanine-D5	mg/l	1.04
	μmol/l	6.1
Proline-D7	mg/l	1.07
	μmol/l	8.76
Tyrosine-D4	mg/l	1.61
	μmol/l	8.67
Valine-D8	mg/l	1.32
	μmol/l	10.5
C0-Carnitine-D9	mg/l	0.129
	μmol/l	0.76
C2-Carnitine-D3	mg/l	0.066
	μmol/l	0.322
C3-Carnitine-D3	mg/l	0.017
	μmol/l	0.078
C4-Carnitine-D3	mg/l	0.009
	μmol/l	0.039



Substance	Unit	Concentration
C5-Carnitine-D9	mg/l	0.011
	μmol/l	0.042
C5DC-Carnitine-D9	mg/l	0.011
	μmol/l	0.042
C6-Carnitine-D3	mg/l	0.009
	μmol/l	0.036
C8-Carnitine-D3	mg/l	0.012
	μmol/l	0.04
C10-Carnitine-D3	mg/l	0.013
	μmol/l	0.042
C12-Carnitine-D3	mg/l	0.014
	μmol/l	0.041
C14-Carnitine-D3	mg/l	0.015
	μmol/l	0.041
C16-Carnitine-D3	mg/l	0.032
	μmol/l	0.079
C18-Carnitine-D3	mg/l	0.033
	μmol/l	0.076

۲-۶- اطلاعات ایمنی

برخی از اجزای کیت PH NBS/NBS-D حلال ها و معرف های شیمیایی هستند و ممکن است حاوی مواد خطرناک باشند. برای اطلاعات ایمنی هر یک از اجزای کیت، لطفاً به اطلاعات ذکر شده روی برچسب ها یا برگه های اطلاعات ایمنی مواد (MSDS) مربوطه مراجعه کنید.

۳-۶- دفع زباله های آزمایشگاهی

ضایعات آزمایشگاهی باید به طور جداگانه بر اساس تنوع خواص شیمیایی آنها جمع آوری شوند. توصیه هایی برای دور انداختن و بسته بندی مواد، در برگه های اطلاعات ایمنی مواد (MSDS) نشان داده شده است.

۷- تجهیزات مورد نیاز

استفاده از کیت های PH NBS/NBS-D نیازمند کروماتوگراف مایع همراه با طیف سنج جرمی متوالی با حساسیت مناسب و نرم افزار مناسب برای ارزیابی داده ها است.

ماژول های کروماتوگرافی مایع مورد نیاز عبارتند از:

- اتوسمپلر
- پمپ HPLC ایزوکراتیک
- Degasser

ابزار و تجهیزات آزمایشگاهی:

- پیپت اتوماتیک یا دستی
- نوک پیپت
- بالن ژوژه ۲۵ میلی لیتری
- ظروف نگهداری واکنشگرها
- هود آزمایشگاهی
- تجهیز پانچر (با توانایی پانچ کردن کاغذ صافی با قطر ۳/۲ میلی متر و یا $\frac{1}{8}$ اینچ)
- انکوباتور
- همزن برای پلیت ۹۶ خانه

۸- اجرای روش تحلیلی

۸-۱- جمع آوری و ذخیره سازی نمونه

آسیل کارنیتین ها و اسیدهای آمینه موجود در لکه های خونی خشک شده (DBS) اندازه گیری می شوند. نمونه های خون باید مستقیماً از پاشنه نوزاد روی کاغذ صافی گرفته شود. خون ناشی از خراش پاشنه نوزاد معمولاً در ۳۶ تا ۷۲ ساعت اول پس از تولد جمع آوری می شود. روش مبتنی بر استفاده از نمونه های خون خشک شده، نیازمند جمع آوری، جابجایی و حمل و نقل ماهرانه نمونه ها است. جزئیات تکنیک جمع آوری مطابق مدرک CLSI-NBS01-A6 بوده و نکات اصلی فرآیند به شرح زیر است:

- پوست را با الکل تمیز کنید و اجازه دهید در معرض هوا خشک شود.
- پاشنه پای نوزاد را با استفاده از یک لانست استریل سوراخ کنید.
- اولین قطره خون را با یک پد گاز خشک و استریل پاک کنید.
- اجازه دهید یک قطره خون جدید تشکیل شود. سپس، کاغذ صافی را به آرامی با قطره خون تماس دهید و اجازه دهید دایره از پیش چاپ شده روی کاغذ صافی کاملاً پر شود. نمونه های شاخص کیفیت نمونه در پیوست استاندارد CLSI-NBS01-A6 ارائه شده است.
- نمونه خون را در حالت افقی حداقل برای مدت زمان سه ساعت و در دمای محیط ۱۸ تا ۲۵ درجه سانتیگراد در هوا خشک کنید. نمونه ها را از نور مستقیم خورشید، گرما، انباشته شدن و آلودگی حفظ کنید.
- مطمئن شوید که اطلاعات مورد نیاز در کارت جمع آوری نمونه تکمیل شده است.
- نمونه را به شیوه مناسب برای حمل و نقل و آنالیز نمونه در همان روز، بسته بندی نمایید، به گونه ای که کارت های جمع آوری شده توسط یک مانع فیزیکی از هم جدا شوند یا با زاویه ۱۸۰ درجه نسبت به کارت زیرین چیده شوند.
- از مفررات پستی و حمل و نقل محلی برای بسته بندی و حمل و نقل نمونه پیروی کنید.
- نمونه را ظرف مدت ۲۴ ساعت پس از جمع آوری به آزمایشگاه منتقل کنید، مگر اینکه دستورالعمل دیگری توسط آزمایشگاه غربالگری ارائه شود.

۸-۲- ذخیره سازی نمونه های خون خشک شده در حین و پس از آنالیز

نمونه ها را می توان در دمای اتاق (۱۸-۲۵ درجه سانتیگراد) به مدت ۲۴-۴۸ ساعت یا در یخچال (۲-۸ درجه سانتیگراد) به مدت ۲۱ روز نگهداری کرد. اگر نمونه های خون خشک شده در دمای (۲ تا ۸ درجه سانتیگراد) نگهداری شوند و از رطوبت و نور خورشید محافظت شوند، اکثر اسیدهای آمینه و آسیل کارنیتین ها پایدار هستند. نمونه های باقیمانده باید در دمای زیر ۱۸- درجه سانتیگراد نگهداری و برای مدت طولانی تری از رطوبت محافظت شوند.

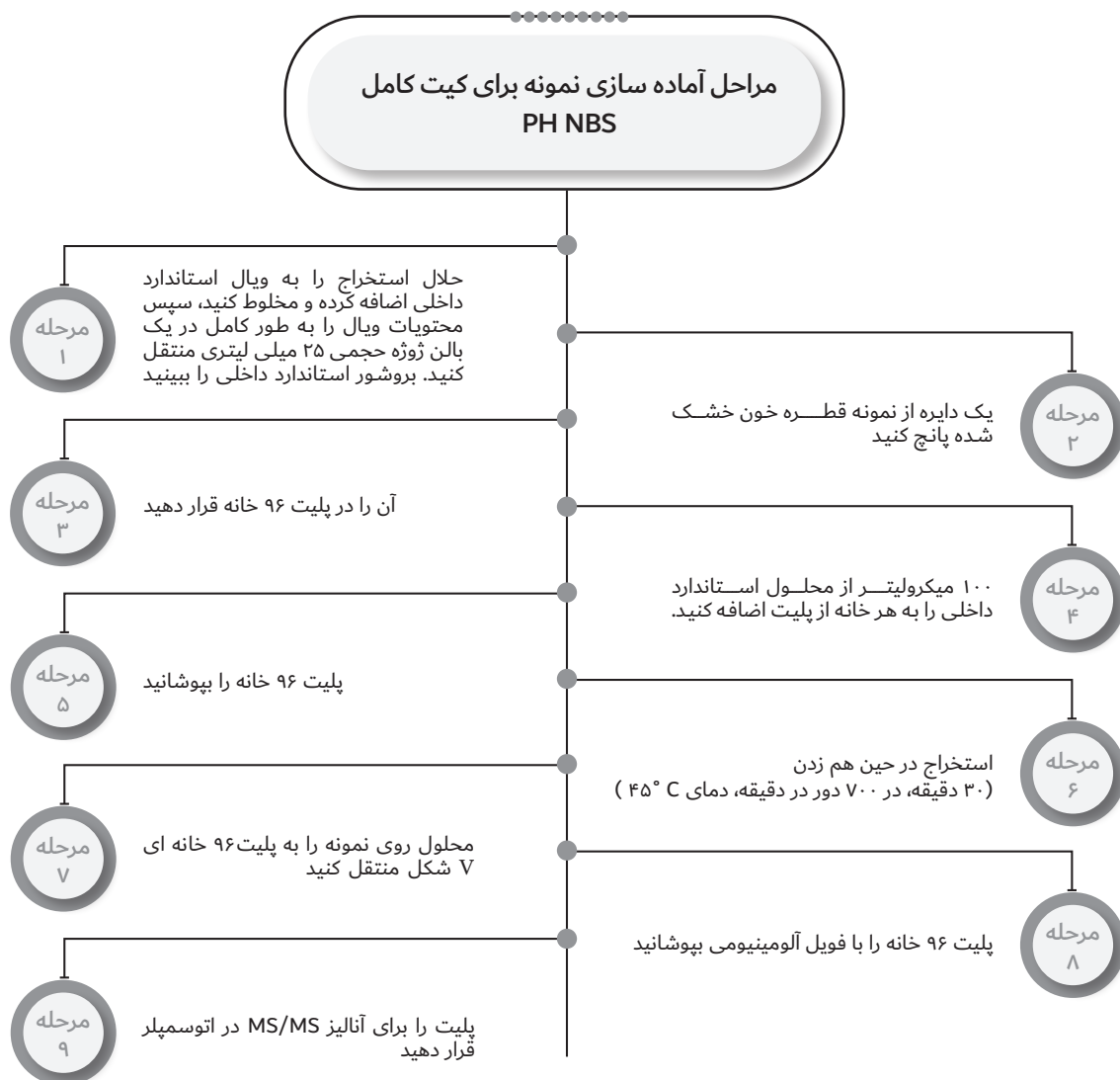


۸-۳- آماده سازی نمونه

مراحل آماده سازی نمونه برای هر دو کیت PH NBS و PH NBS-D توضیح داده شده است. قبل از انجام آنالیز، پرسنل واجد شرایط باید تجهیزات آنالیزی را بهینه کرده و تنظیمات روش آنالیز را کامل کنند. فقط از غلظت های مشخص شده در گواهی کنترل کیفیت مختص هر سری تولید برای استانداردهای داخلی نشاندار شده با ایزوتوپ پایدار استفاده نمایید.

۸-۳-۱- مراحل آماده سازی نمونه برای کیت کامل PH NBS

نحوه کار برای مراحل آماده سازی نمونه به شرح زیر است:



۸-۳-۱-۱- رقیق سازی استاندارد داخلی لیوفیلیز شده

محتوای ویال استاندارد داخلی باید در حلال استخراج حل شده و تا حجم نهایی ۲۵ میلی لیتر رقیق شود. برای این منظور به شرح زیر عمل کنید:

حلال استخراج را به ویال استاندارد داخلی اضافه کنید و همراه با همزدن آهسته به مدت حدود ۱۵ دقیقه استخراج نمایید. سپس محتویات ویال را به یک بالن ژوژه حجمی ۲۵ میلی لیتری منتقل کنید، ویال را دو مرتبه با حجم ۳ میلی لیتر از حلال استخراج بشویید و این حجم ها را به بالن ژوژه حجمی ۲۵ میلی لیتری انتقال دهید. در نهایت بالن ژوژه حجمی ۲۵ میلی لیتری را با حلال استخراج دقیقاً تا ۲۵ میلی لیتر به حجم رسانده و محلول را همگن نمایید.

۸-۳-۱-۲- استخراج / افزایش استاندارد داخلی

از خون خشک شده روی کاغذ صافی (نمونه شاهد یا بیمار) دایره ای با قطر ۳/۲ میلی متری را پانچ کرده و آن را به خانه مورد نظر در پلیت ۹۶ خانه ته صاف منتقل کنید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر استاندارد داخلی (رقیق شده با حلال استخراج) را به نمونه بیفزایید.

برای استخراج نمونه، پلیت ۹۶ خانه ای را با پوشش محافظ بپوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۷۰۰ دور در دقیقه، در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد، به وسیله شیکر مخصوص پلیت به هم بزنید و فرآیند استخراج را انجام دهید.

۸-۳-۱-۳- انتقال

پوشش محافظ پلیت را بردارید و مایع رویی نمونه را به یک پلیت ۹۶ خانه V شکل، منتقل کنید. با استفاده از پوشش محافظ فویل آلومینیومی، پلیت را بپوشانید تا تبخیر محلول به حداقل برسد.

۸-۳-۱-۴- آنالیز LC-MS-MS

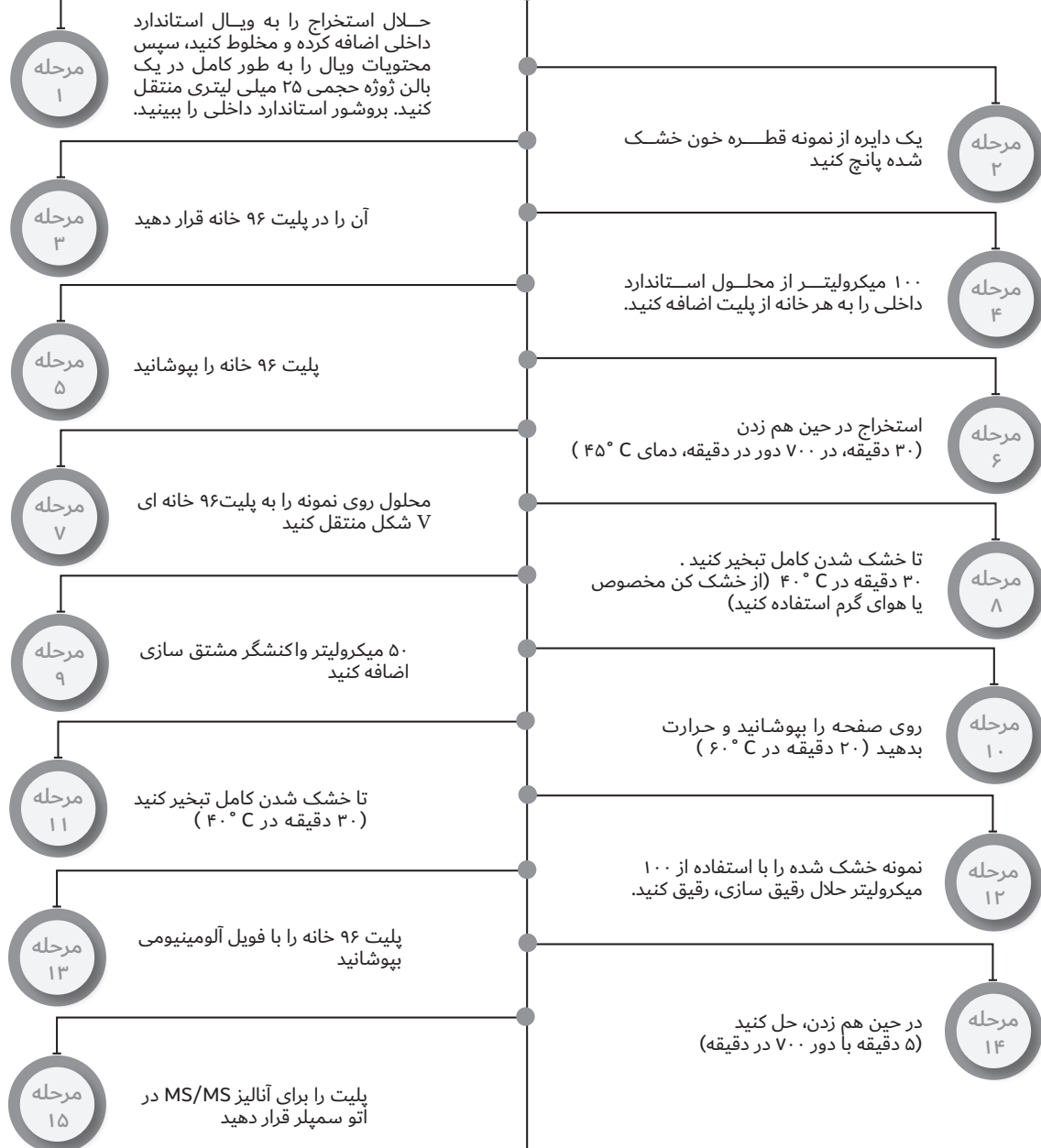
پلیت ۹۶ خانه دارای پوشش محافظ را داخل اتوسمپلر قرار دهید. ۱۰-۲۰ میکرولیتر از مایع رویی را به سیستم LC-MS-MS تزریق کنید. حجم تزریق باید با توجه به حساسیت طیف سنج جرمی متوالی مورد استفاده انتخاب شود.

۸-۳-۲- مراحل آماده سازی نمونه برای کیت کامل PH NBS-D

نحوه کار برای مراحل آماده سازی نمونه به شرح زیر است:



مراحل آماده سازی نمونه برای کیت کامل
PH NBS - D



۸-۳-۱-۱- رقیق سازی استاندارد داخلی لیوفیلیز شده

محتوای ویال استاندارد داخلی باید در حلال استخراج حل شده و تا حجم نهایی ۲۵ میلی لیتر رقیق شود. برای این منظور به شرح زیر عمل کنید:

حلال استخراج را به ویال استاندارد داخلی اضافه کنید و همراه با همزدن آهسته به مدت حدود ۱۵ دقیقه استخراج نمایید. سپس محتویات ویال را به یک بالن ژوژه حجمی ۲۵ میلی لیتری منتقل کنید، ویال را دو مرتبه با حجم ۳ میلی لیتر از حلال استخراج بشویید و این حجم ها را به بالن ژوژه حجمی ۲۵ میلی لیتری انتقال دهید. در نهایت بالن ژوژه حجمی ۲۵ میلی لیتری را با حلال استخراج دقیقاً تا ۲۵ میلی لیتر به حجم رسانده و محلول را همگن نمایید.

۸-۳-۲-۱- استخراج / افزایش استاندارد داخلی

از خون خشک شده روی کاغذ صافی (نمونه شاهد یا بیمار) دایره ای با قطر ۳/۲ میلی متری را پانچ کرده و آن را به خانه مورد نظر در پلیت ۹۶ خانه ته صاف منتقل کنید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر استاندارد داخلی (رقیق شده با حلال استخراج) را به نمونه بیفزایید.

برای استخراج نمونه، پلیت ۹۶ خانه ای را با پوشش محافظ بپوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۷۰۰ دور در دقیقه، در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد، به وسیله شیکر مخصوص پلیت به هم بزنید و فرآیند استخراج را انجام دهید.

۸-۳-۲-۲- انتقال

پوشش محافظ پلیت را بردارید و مایع رویی نمونه را به یک پلیت ۹۶ خانه ۷ شکل، منتقل کنید. تا خشک شدن کامل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد تبخیر کنید.

۸-۳-۲-۳- مشتق سازی

۵۰ میکرولیتر از واکنشگر مشتق سازی را روی نمونه پیپت کنید. پلیت ۹۶ خانه را با پوشش محافظ بپوشانید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد حرارت دهید. در مرحله بعد، پوشش محافظ را برداشته و نمونه را تا خشک شدن کامل تبخیر کنید (۳۰ دقیقه، در ۴۰ درجه سانتیگراد).

۸-۳-۲-۴- رقیق سازی

یکصد میکرولیتر حلال رقیق سازی را روی نمونه پیپت کنید. با استفاده از پوشش محافظ فویل آلومینیومی بپوشانید و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۷۰۰ دور در دقیقه بهم بزنید تا نمونه به طور کامل حل شود (شیکر مخصوص پلیت).

۸-۳-۲-۵- آنالیز LC-MS-MS

پلیت ۹۶ خانه دارای پوشش محافظ را داخل اتوسمپلر قرار دهید. ۱۰-۲۰ میکرولیتر از مایع رویی را به سیستم LC-MS-MS تزریق کنید. حجم تزریق باید با توجه به حساسیت طیف سنج جرمی متوالی مورد استفاده انتخاب شود.

۸-۳-۲-۶- دستگاه طیف سنج جرمی متوالی

توصیه می شود به طور منظم صحت جرمی دستگاه را بررسی کنید. در صورت لزوم، طیف سنج را مجدد کالیبره کنید.

۸-۴-۱- بهینه سازی طیف سنج جرمی متوالی و آنالیز آزمایشی

بهینه سازی پارامترهای عملیاتی منبع یونساز و انتقالات جرم ترکیب باید در فرآیند بهینه سازی دستگاه انجام شود. برای بهینه سازی می توان از محلول های ترکیبی بهینه سازی تجاری و نمونه های کنترل لکه های خون خشک شده استفاده کرد.



۸-۴-۲- پایداری تجهیز آنالیزی

اجازه دهید عملکرد اجزاء تجهیز آنالیزی قبل از تزریق نمونه، حداقل به مدت ۳۰ دقیقه به پایداری برسد. توصیه می شود که در ابتدای هر سری آنالیز، سه تزریق بلانک انجام شود تا نتایج آنالیز تکرارپذیر شوند. برای اطمینان از پایداری نتایج آنالیز، نمونه‌های کنترل لکه‌های خون خشک آماده شده را در دو سطح غلظتی ۱ و ۲ برای چندین مرتبه تزریق کنید تا دو کروماتوگرام قابل مقایسه متوالی، از نظر زمان بازداری و سطح زیر پیک بدست آید.

۸-۴-۳- اندازه گیری و ارزیابی نمونه

محلول استاندارد داخلی به نمونه افزوده می شود و غلظت های آنالیت موجود در نمونه، با استفاده از غلظت های معلوم استاندارد داخلی مطابق با بند ۶-۱-۱ و بروشور استاندارد داخلی محاسبه می گردند. غلظت آنالیت بر اساس این فرمول محاسبه می شود:

$$C (Analyte)[\mu\text{mol/l}] = \frac{A (analyte) \times C(IS)[\mu\text{mol/l}]}{A (IS)} \times \frac{V (IS)[\mu\text{l}]}{V (A)[\mu\text{l}]}$$

که:

C (Analyte) : غلظت آنالیت در نمونه

A (Analyte) : سطح زیر پیک آنالیت در نمونه

C (IS) : غلظت آنالیت نشاندار ایزوتوپی در استاندارد داخلی

A (IS) : سطح زیر پیک آنالیت نشاندار ایزوتوپی در استاندارد داخلی

V (IS) : حجم استاندارد داخلی

V (A) : حجم نمونه

مبنای این محاسبه، حجم ۱۰۰ میکرولیتر از استاندارد داخلی و دایره پانچ شده از نمونه با قطر ۳/۲ میلی متر می باشد. حجم واقعی نمونه ممکن است از موردی به مورد دیگر متفاوت باشد، اما حجم نمونه متوسط، برای کاغذهای فیلتر تایید شده در نظر گرفته می شود. بنابراین، این روش نمی تواند برای آنالیز کمی اسیدهای آمینه و آسپیل کارنیتین ها به کار گرفته شود. این روش یک روش اندازه گیری نیمه کمی برای غربالگری نوزادان است.

۹- ارزیابی عملکرد

ارزیابی عملکرد کیت کامل با محصولات زیر مورد مطالعه قرار گرفت :

Order no.:	PH 2001
Product name:	PH NBS (Complete Kit for Amino Acids and Acylcarnitines from Dried Blood Spots)
Order no.:	PH 2002
Product name:	PH NBS-D (Complete Kit for Amino Acids and Acylcarnitines from Dried Blood Spots)

۹-۱-۱- درستی اندازه گیری

۹-۱-۱-۱- صحت اندازه گیری



۹-۱-۱-۲- مقایسه روش

نمونه‌های کنترل لکه خون خشک شده پس از آماده‌سازی نمونه با کیت کامل PH NBS و کیت کامل PH-NBS-D با استفاده از دستگاه AB SCIEX 3200 اندازه‌گیری شدند.

جدول ۸: مقادیر میانگین ۱۵ نمونه کنترلی سطح $[\mu\text{mol/L}]$ و درصد انحراف نتایج برای کیت های PH NBS و PH-NBS-D

Analyte	AB SCIEX 3200		
	PH NBS-D kit	PH-NBS kit	Deviation %
Amino Acids			
Ornithine	183.44	237	23
Proline	295.02	311	5
Methionine	47.15	52	9
Leucine	271.55	305	11
Glutamic acid	464.16	507	9
Citrulline	69.04	65	-7
Arginine	111.97	109	-2
Tyrosine	200.17	212	6
Aspartic acid	100.20	102	2
Valine	264.22	268	1
Glycine	312.67	253	-24
Phenylalanine	112.17	133	16
Alanine	320.94	379	15
Acylcarnitines and free Carnitine			
C0	40.52	58.28	29
C2	23.90	21.63	-11
C3	4.32	4.50	4
C4	0.76	0.84	9
C5	0.44	0.54	18
C5DC	0.50	0.54	9
C6	0.40	0.41	3
C8	0.41	0.41	-1
C10	0.33	0.36	9
C12	0.48	0.52	7
C14	0.51	0.44	-15
C16	5.25	4.47	-17
C18	2.31	2.59	11

جدول ۹: مقادیر میانگین ۱۵ نمونه کنترلی سطح II [μmol/L] و درصد انحراف نتایج برای کیت های PH NBS و PH-NBS-D

Analyte	PH NBS-D kit	PH-NBS kit	Deviation %
Amino Acids			
Ornithine	409.52	522	21
Proline	817.68	807	-1
Methionine	220.50	209	-6
Leucine	580.38	568	-2
Glutamic acid	797.77	856	7
Citrulline	286.10	262	-9
Arginine	288.67	260	-11
Tyrosine	581.11	626	7
Aspartic acid	268.68	260	-4
Valine	519.12	508	-2
Glycine	814.24	628	-28
Phenylalanine	439.36	524	16
Alanine	641.91	671	4
Acylcarnitines and free Carnitine			
C0	88.38	121.69	27
C2	59.35	58.90	-1
C3	12.30	12.49	2
C4	3.23	3.58	10
C5	1.86	2.23	16
C5DC	1.95	1.16	-
C6	1.97	1.89	-4
C8	1.95	1.82	-7
C10	1.44	1.48	3
C12	2.16	2.27	5
C14	2.19	1.85	-18
C16	14.21	11.65	-22
C18	8.38	8.70	4

۹-۱-۲- دقت اندازه گیری

۹-۱-۲-۱- تکرار پذیری (دقت درون سنجی)

دقت درون سنجی با استفاده از تجهیز AB SCIEX 3200 با ۲۰ مرتبه آماده سازی و اندازه گیری نمونه های کنترل لکه خون خشک شده در یک سری کاری مورد ارزیابی قرار گرفت.



جدول ۱۰- دقت درون سنجی - CV [%]

Analyte	PH NBS-D kit (PH 2002)		PH NBS kit (PH 2001)	
	Level I	Level II	Level I	Level II
Amino Acids				
Ornithine	6.66	4.52	9.42	7.43
Proline	4.81	4.88	6.00	4.36
Methionine	5.91	10.45	4.24	4.46
Leucine	5.03	4.84	5.27	3.74
Glutamic acid	5.44	5.13	7.30	5.29
Citrulline	3.95	4.08	6.25	6.37
Arginine	13.17	6.16	8.83	4.68
Tyrosine	5.20	4.27	4.10	2.99
Aspartic acid	4.36	3.92	15.49	7.75
Valine	5.29	4.79	6.74	3.87
Glycine	4.60	4.53	12.65	5.67
Phenylalanine	4.97	4.91	4.39	3.41
Alanine	4.52	4.85	4.11	4.24
Acylcarnitines and free Carnitine				
C0	7.20	5.49	5.14	6.97
C2	4.36	4.81	9.29	4.55
C3	7.89	5.95	5.32	4.69
C4	4.31	5.83	5.83	4.34
C5	6.50	5.11	5.83	4.47
C5DC	3.96	5.00	14.31	9.82
C6	5.92	5.37	5.57	6.09
C8	4.93	5.66	4.62	4.68
C10	5.78	4.76	5.26	4.68
C12	9.37	5.09	5.03	4.50
C14	6.21	5.98	8.09	3.98
C16	9.68	5.11	2.73	3.40
C18	3.86	4.50	3.45	3.41

۹-۲-۲-۱-۲- تجدید پذیری (دقت برون سنجی)

دقت برون سنجی با استفاده از تجهیز AB SCIEX 3200 با ۲ مرتبه آماده‌سازی و اندازه‌گیری نمونه‌های کنترل لکه‌های خون خشک شده در ۵ سری کاری متفاوت ارزیابی شد.

کد مدرک: PH-IM-001

شماره بازبینی: یک

تاریخ بازبینی: ۱۴۰۰/۱۲/۰۱

جدول ۱۱: دقت برون سنجی برای اسیدهای آمینه - CV [%]

Analyte	CV	PH NBS-D kit (PH 2002)		PH NBS kit (PH 2001)	
		Level I	Level II	Level I	Level II
Amino Acids					
Alanine	Total	5.64	9.85	4.21	8.22
	Repeatability	3.51	9.85	3.94	6.16
	Between Day	4.42	0.00	1.49	5.45
Arginine	Total	9.06	15.11	9.25	12.40
	Repeatability	4.53	5.06	5.20	1.81
	Between Day	7.84	14.24	7.64	12.27
Aspartic acid	Total	5.62	9.78	9.32	10.37
	Repeatability	3.56	7.48	5.66	4.42
	Between Day	4.34	6.31	7.41	9.38
Ornithine	Total	11.97	17.31	16.16	7.91
	Repeatability	7.10	5.89	6.81	2.63
	Between Day	9.63	16.27	14.66	7.46
Proline	Total	5.34	10.11	4.81	8.87
	Repeatability	3.50	10.11	2.61	5.06
	Between Day	4.04	0.00	4.04	7.28
Methionine	Total	15.15	13.58	7.22	9.91
	Repeatability	11.86	13.58	5.48	6.01
	Between Day	9.42	0.00	4.71	7.88
Glutamic acid	Total	10.79	13.65	5.11	8.74
	Repeatability	4.10	9.55	3.05	5.49
	Between Day	9.98	9.75	4.10	6.80
Leucine	Total	12.60	17.38	5.46	9.76
	Repeatability	4.97	9.31	4.07	5.95
	Between Day	11.58	14.67	3.64	7.74
Citrulline	Total	5.92	9.35	5.60	6.40
	Repeatability	2.98	7.42	5.60	4.34
	Between Day	5.11	5.69	0.00	4.70
Tyrosine	Total	4.01	8.48	4.62	8.59
	Repeatability	3.40	7.38	3.81	5.15
	Between Day	2.13	4.19	2.62	6.88
Valine	Total	8.30	11.60	6.37	9.81
	Repeatability	3.67	10.01	3.24	5.71
	Between Day	7.45	5.87	5.48	7.97
Glycine	Total	8.56	10.94	13.45	7.84
	Repeatability	2.32	8.21	13.45	6.18
	Between Day	8.24	7.24	0.00	4.83
Phenylalanine	Total	10.08	13.26	5.02	8.85
	Repeatability	2.70	8.91	3.50	5.98
	Between Day	9.71	9.81	3.60	6.53



جدول ۱۲: دقت برون سنجی برای کارنیتین آزاد و آسیل کارنیتین ها - CV [%]

Analyte	CV	PH NBS-D kit (PH 2002)		PH NBS kit (PH 2001)	
		Level I	Level II	Level I	Level II
Acylcarnitines and free Carnitine					
C0	Total	8.05	11.03	6.42	12.50
	Repeatability	6.67	9.09	5.97	6.50
	Between Day	4.49	6.25	2.35	10.67
C2	Total	8.46	8.47	5.92	8.14
	Repeatability	5.38	8.47	3.19	4.47
	Between Day	6.53	0.00	4.99	6.80
C3	Total	9.43	9.21	3.92	8.62
	Repeatability	7.45	9.21	3.43	6.04
	Between Day	5.78	0.00	1.89	6.16
C4	Total	5.84	9.09	5.48	6.60
	Repeatability	5.80	8.66	3.93	5.53
	Between Day	0.62	2.75	3.82	3.60
C5	Total	8.97	13.63	5.20	7.89
	Repeatability	5.15	10.37	5.20	5.75
	Between Day	7.34	8.84	0.00	5.39
C5DC	Total	10.74	12.89	7.87	17.83
	Repeatability	9.45	8.06	4.44	7.29
	Between Day	5.09	10.06	6.50	16.27
C6	Total	12.39	12.71	5.32	6.76
	Repeatability	7.65	10.90	4.89	5.83
	Between Day	9.74	6.53	2.08	3.43
C8	Total	12.50	13.18	5.18	10.94
	Repeatability	11.37	12.64	4.71	7.36
	Between Day	5.19	3.73	2.16	8.09
C10	Total	9.49	14.83	4.17	10.81
	Repeatability	5.03	13.74	4.10	7.00
	Between Day	8.05	5.58	0.78	8.23
C12	Total	13.00	14.75	3.13	9.59
	Repeatability	7.11	12.14	2.45	7.72
	Between Day	10.88	8.38	1.95	5.69
C14	Total	9.25	13.11	6.34	9.59
	Repeatability	8.17	11.70	4.44	6.06
	Between Day	4.33	5.91	4.52	7.43
C16	Total	12.56	11.43	3.52	6.74
	Repeatability	8.48	9.15	3.39	5.78
	Between Day	9.26	6.85	0.97	3.46
C18	Total	10.17	11.70	4.11	5.54
	Repeatability	7.49	9.68	3.47	4.80
	Between Day	6.87	6.57	2.22	2.77

۲-۹- حساسیت آنالیز (LOD, LLOQ)

نمونه‌های کنترل لکه‌های خون خشک شده با "استاندارد داخلی + حلال استخراج" با نسبت‌های زیر رقیق شدند: ۱:۱۰۰۰; ۱:۵۰۰; ۱:۲۰۰; ۱:۱۰۰; ۱:۵۰; ۱:۲۰; ۱:۱۰. نمونه‌های رقیق شده به دستگاه AB SCIEX 3200 تزریق شد. یک بار اندازه‌گیری در سطح غلظتی ۱ و دو بار اندازه‌گیری در سطح غلظتی ۱۱ نمونه کنترل، در ۵ روز متفاوت انجام گرفت.

جدول ۱۳: نتایج LOD, LLOQ [$\mu\text{mol/L}$]

Amino Acids				
Analytes	PH NBS-D kit (PH 2002)		PH NBS kit (PH 2001)	
	LOD	LLOQ	LOD	LLOQ
Ornithine	4.10	12.30	4.16	12.48
Proline	1.30	3.90	2.69	8.06
Methionine	2.10	6.30	0.77	2.30
Leucine	1.30	3.90	1.32	3.97
Glutamic acid	4.60	13.80	2.97	8.91
Citrulline	1.20	3.60	2.39	7.17
Arginine	1.10	3.30	1.11	3.33
Tyrosine	1.10	3.30	1.12	3.35
Aspartic acid	2.20	6.60	2.14	6.42
Valine	4.40	13.20	2.23	6.69
Glycine	6.90	20.70	6.91	20.72
Phenylalanine	1.20	3.60	1.17	3.51
Alanine	3.50	10.50	3.54	10.61
Acylcarnitines and free Carnitine				
C0	0.20	0.60	0.41	1.22
C2	0.10	0.30	0.29	0.88
C3	0.03	0.09	0.03	0.09
C4	0.04	0.12	0.04	0.12
C5	0.01	0.03	0.01	0.03
C5DC	0.01	0.03	0.02	0.06
C6	0.02	0.06	0.01	0.02
C8	0.03	0.09	0.00	0.01
C10	0.01	0.03	0.01	0.03
C12	0.02	0.06	0.02	0.07
C14	0.01	0.03	0.01	0.02
C16	0.01	0.03	0.03	0.08
C18	0.01	0.03	0.01	0.03



۳-۹- اختصا صیت آنالیتیکال

۱-۳-۹- تداخلات

۱-۱-۳-۹- تداخل آسپارژین و ارنیتین (M= ۱۳۲ Da)

نمونه‌های کنترل لکه‌های خون خشک قبل و بعد از افزایش آسپارژین (Asn) تا ۲۵۰۰ میکرومول در لیتر، با خوانش انتقال جرم ارنیتین مورد آنالیز قرار گرفتند. بطور متوسط، کمتر از ۲۰ درصد آسپارژین به عنوان ارنیتین شناسایی می‌شود.

۲-۱-۳-۹- تداخل گلوتامیک اسید و آسیل کارنیتین (C2) (M= ۲۶۰ Da)

نمونه‌های کنترل لکه‌های خون خشک شده قبل و بعد از افزایش اسید گلوتامیک (Glu) تا ۲۵۰۰ میکرومول در لیتر با خوانش انتقال جرم استیل کارنیتین (C2) آنالیز شدند. هیچ تداخل قابل توجهی از Glu در C2 (>۲٪) مشاهده نمی‌شود.

۳-۱-۳-۹- تداخل لوسین و ایزولوسین (M= ۱۳۲ Da)

ایزولوسین و لوسین مواد ایزوبار با الگوی شکست یکسان هستند و قابل شناسایی از یکدیگر نیستند. بنابراین غلظت اندازه گیری شده در نمونه مجموع غلظت هر دو ترکیب است.

۴-۱-۳-۹- تداخل لوسین و هیدروکسی پرولین (M= ۱۳۲ Da)

هیدروکسی پرولین و لوسین مواد ایزوبار با الگوی شکست یکسان هستند و قابل شناسایی از یکدیگر نیستند. با این حال، حتی در موارد نادر هیدروکسی پرولینمیا، نتایج مثبت کاذب MSUD قابل انتظار نیست.

۲-۳-۹- تست بلانک

کاغذهای صافی بلانک، مانند نمونه بیمار آماده سازی شده و با دستگاه AB SCIEX 3200 اندازه گیری گردید. مقادیر اندازه گیری شده در نمونه های کاغذ صافی بلانک کمتر از LLOQ است.

۳-۳-۹- اثر حافظه

نمونه‌های کاغذ صافی بلانک، مستقیماً پس از تزریق ۲ مرتبه نمونه کنترل لکه‌های خون خشک شده سطح II غلظتی، به دستگاه AB SCIEX 3200 تزریق شد. مقادیر اندازه گیری شده در نمونه های کاغذ صافی بلانک کمتر از LLOQ است.

۴-۹- محدوده اندازه گیری سنجش (خطی بودن)

نمونه‌های کنترل لکه‌های خون خشک شده برای افزایش غلظت آنالیت به گونه ای که کل محدوده مورد مطالعه بالینی را پوشش دهند، تغلیظ شدند. با دو مرتبه آماده سازی نمونه، خطی بودن روش با استفاده از دستگاه AB SCIEX 3200 ارزیابی شد.

جدول ۱۴ - نتایج بررسی خطی بودن روش [μmol/L] برای کیت (PH 2002) PH NBS-D

Analyte	Repeatability [CV%]	Nonlinearity [%]	Linear Range [μmol/L]
Amino Acids			
Orn	16.82	-14.48-4.31	15.94-1001.25
Pro	11.6	-6.60-3.23	37.76-1208.25
Met	27.86	-2.51-7.58	27.7-886.5
Leu	19.43	-10.17-5.28	46.48-1487.25
Glu	15.48	-6.56-3.17	64.125-2052
Cit	10.61	-8.02-3.93	16.8-537.75
Arg	2.54	-14.32-5.08	14.86-475
Tyr	12.05	-11.49-1.72	19.55-1251
Asp	8.99	-12.35-3.45	7.52-481.5
Val	19.59	-8.02-4.09	38.67-1237.5
Gly	14.51	-14.69-1.94	24.27-3107.25
Phe	17.51	-10.58-5.65	52.38-1676.25
Ala	12.82	-14.16-2.88	50.5-3235.5
Acylcarnitines and free Carnitine			
C0	11.23	-14.28-2.38	5.3-337.5
C2	9.20	-13.70-7.70	4.11-131.4
C3	15.31	-13.39-2.68	0.358-22.95
C4	11.12	-6.18-2.82	0.55-17.48
C5	14.76	-14.78-3.02	0.078-4.973
C5DC	8.79	-3.93-14.74	0.478-7.65
C6	6.71	-5.49-4.36	0.165-2.64
C8	11.76	-8.04-3.69	0.13-4.16
C10	12.99	-10.41-5.28	0.08-2.56
C12	11.52	-9.03-4.23	0.426-13.63
C14	13.09	-11.88-5.58	0.223-7.15
C16	14.07	-11.53-0.73	0.206-26.325
C18	11.66	-8.14-1.31	0.127-8.145



جدول ۱۵ - نتایج بررسی خطی بودن روش [μmol/L] برای کیت (PH 2001) PH NBS

Analyte	Repeatability [CV%]	Nonlinearity [%]	Linear Range [μmol/L]
Amino Acids			
Orn	10.15	-10.66-6.89	31.29-1001.25
Pro	6.62	-9.03-4.78	37.76-1208.25
Met	10.77	-5.76-2.46	27.7-886.5
Leu	7.00	-8.55-1.61	23.24-1487.25
Glu	10.42	-9.65-5.45	64.125-2052
Cit	8.02	-7.05-3.36	16.8-537.75
Arg	8.91	-3.12-12.19	15.61-249.75
Tyr	6.99	-5.95-1.92	39.1-1251
Asp	7.74	-3.17-14.85	30.1-481.5
Val	8.57	-2.76-1.26	38.67-1237.5
Gly	13.92	-1.72-7.91	24.27-3107.25
Phe	9.13	-7.5-3.49	52.38-1676.25
Ala	7.02	-11.75-2.62	50.55-3235.5
Acylcarnitines and free Carnitine			
C0	8.36	-9.15-0.77	2.837-337.5
C2	9.93	-0.46-11.52	0.513-131.4
C3	6.92	-12.94-0.95	0.179-22.95
C4	7.77	-1.10-7.64	0.273-17.48
C5	9.11	-11.32-0.57	0.019-4.973
C5DC	13.21	-4.01-12.56	0.119-0.956
C6	9.01	-11.95-6.47	0.072-2.295
C8	7.80	-6.76-1.17	0.065-4.1625
C10	8.51	-1.33-8.43	0.04-2.565
C12	7.64	-5.78-2.59	0.426-13.635
C14	9.79	-0.38-10.71	0.028-7.155
C16	7.13	-13.41-2.20	0.411-26.325
C18	7.65	-13.76-2.23	0.127-8.145

کد مدرک: PH-IM-001

شماره بازبینی: یک

تاریخ بازبینی: ۱۴۰۰/۱۲/۰۱



PH NBS

Amino Acids and Acylcarnitines
From Dried Blood Spots



S873476

LOT 7098417 W171

Expiration 12-31-2050



آدرس: ایران، اراک، بلوار دانشگاه، دانشگاه آزاد، ساختمان چمران، شرکت توسعه فناوری پایا همسان
کد پستی ۳۸۱۸۱۴۶۷۵، تلفن: ۰۸۶-۳۳۶۷۰۰۱۱