

质谱检测联合下一代测序在新生儿遗传代谢病诊断中的应用

于爱真,冯雪,王欣

深圳市儿童医院新生儿科,广东 深圳 518000

【摘要】 目的 探究质谱检测联合下一代测序在新生儿遗传代谢病诊断中的应用效果。方法 回顾性分析 2016 年 6 月至 2020 年 6 月深圳市儿童医院收治的临床表现疑似遗传代谢病高危新生儿 289 例为研究对象,所有患儿均给予质谱检测联合下一代测序筛查遗传代谢病,随访至 6 个月龄结局。结果 以下一代测序检测为金标准,289 例疑似遗传代谢病新生儿中,最终确诊病例为 40 例,其中男性 22 例,女性 18 例;脂肪酸代谢病 15 例,氨基酸代谢病 14 例,有机酸代谢病 11 例。质谱检测提示遗传代谢疾病为 34 例,质谱检测的敏感度 78.8% (95%CI: 61.1%~91.0%),特异度 100% (95%CI: 99.8%~100%),阳性预测值 100%,阴性预测值为 99.7% (95%CI: 99.3%~99.8%)。质谱检测与下一代测序检测提示遗传代谢病可能结果不一致者有 2 例,质谱检测 1 例检测到丙氨酸或酪氨酸代谢异常,但下一代测序基因存在 3-甲基戊烯二酸尿症;1 例质谱检测血酪氨酸异常升高,但下一代测序中存在基因半合变异,诊断为 3-甲基巴豆酰辅酶 A 羧化酶乏症。40 例患儿经随访其中 1 例甲基丙二酸血症患儿出现急性代谢紊乱,家属放弃治疗死亡,其余患儿基于明确的诊断,干预及时,生长发育良好。结论 质谱检测可以相对快速诊断遗传代谢病以指导临床治疗,而下一代测序可对质谱检测结果进行验证,并从基因角度解释病因,从而指导进一步治疗及遗传咨询,质谱检测联合下一代测序可以更加快速且全面确诊临床表现疑似遗传代谢病的高危新生儿,尽早实施个体化治疗,改善患儿预后。

【关键词】 质谱检测;遗传代谢病;下一代测序;新生儿;基因

【中图分类号】 R722 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2021)02-0177-04

Application of mass spectrometry combined with next-generation sequencing in the diagnosis of neonatal genetic and metabolic diseases. YU Ai-zhen, FENG Xue, WANG Xin. Department of Pediatrics, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518000, Guangdong, CHINA

【Abstract】 Objective To explore the application effect of mass spectrometry combined with next-generation sequencing in the diagnosis of neonatal genetic and metabolic diseases. **Methods** A retrospective analysis was performed on 289 high-risk newborns with suspected clinical manifestations of genetic metabolic diseases admitted to Shenzhen Children's Hospital from June 2016 to June 2020. All children were given mass spectrometry combined with next-generation sequencing to screen for genetic metabolic diseases, and they were followed up till 6 months-old. **Results** With next-generation sequencing as the gold standard, among 289 neonates with suspected genetic metabolic diseases, 40 were finally confirmed, including 22 males and 18 females; there were 15 neonates with fatty acid metabolism diseases, 14 neonates with amino acid metabolism diseases, and 11 neonates with organic acid metabolism diseases. Mass spectrometry detection revealed 34 cases of genetic and metabolic diseases, with the sensitivity of 78.8% (95%CI: 61.1% to 91.0%), the specificity of 100% (95%CI: 99.8% to 100%), the positive predictive value of 100%, and the negative predictive value of 99.7% (95%CI: 99.3% to 99.8%). Mass spectrometry detection and next-generation sequencing detection showed inconsistent results in 2 cases, of which 1 case was detected as abnormal metabolism of alanine or tyrosine by mass spectrometry but as 3-methylglutaconic aciduria by the next-generation sequencing, the other case as abnormally elevation of blood tyrosine by mass spectrometry but as gene hemizygous mutations by next-generation sequencing (diagnosed as 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency). During the follow-up, among the 40 children, 1 child with methylmalonic acidemia developed acute metabolic disorders and then died after giving up treatment, and the rest received timely intervention based on diagnosis and developed well. **Conclusion** Mass spectrometry can diagnose genetic and metabolic diseases relatively quickly to guide clinical treatment, while next-generation sequencing can verify the results of mass spectrometry and explain the cause from a genetic perspective, thereby guiding further treatment and genetic counseling. Mass detection combined with next-generation sequencing can diagnose high-risk newborns with clinical manifestations suspected of genetic metabolic diseases more quickly and comprehensively, and enable the doctors to implement individualized treatment as soon as possible to improve the prognosis of children.

【Key words】 Mass spectrometry; Genetic metabolic diseases; Next-generation sequencing; Newborns; Genes

遗传代谢病(inherited metabolic diseases, IMD)是一种病种繁多的先天性代谢缺陷,包括氨基酸、有机酸、脂肪酸、激素、糖、溶酶体贮积等缺陷,且对于婴幼儿

来说,虽然体内生化激素水平实质已有显著变化,但临床表现常为非特异性,因此仅依靠临床表现早期诊断困难,且一经发病,往往病情危重^[1-2]。根据相关

文献报道,对部分患儿在疾病明显出现临床表现之前,通过先天性遗传代谢病筛查,可以有效改善预后。随着医学检测技术的不断完善及提高,串联质谱技术引入遗传代谢病筛查之中,能够同时对多种代谢物进行快速检测,实现一种实验检测多种疾病,极大的提高了试验效率^[3-4]。但由于串联质谱技术检测极易受患儿病情、治疗等因素影响,造成误诊、漏诊,下一代测序技术通过对患儿的数百万条基因进行大规模平行测序,生物信息学分析,整合基因表达及调控,提供准确的分子诊断,有效弥补了串联质谱技术的不足^[5-6]。本研究旨在探究质谱检测联合下一代测序在新生儿遗传代谢病诊断中的应用效果。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性分析2016年6月至2020年6月深圳市儿童医院收治的289例临床表现疑似遗传代谢病新生儿为研究对象。纳入标准:①临床资料完整;②本研究经医院伦理学委员会讨论通过,家属对本研究知情同意,且签署相关文书。排除标准:①特殊面容者;②神经、心血管、消化、泌尿生殖等系统畸形或严重障碍者。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 液相串联质谱检测采用美国Waters公司Acquity TM TQD串联质谱仪,多种氨基酸、肉碱和琥珀酰丙酮测定试剂盒(Neo BaseNon-derivatized MSMS Kit)由美国Perkin Elmer公司提供;变异按照人类基因组变异协会规则命名。

1.2.2 采集标本 干血片标本采集须严格遵守新生儿疾病筛查技术规范,采血时间约为72 h后,且所有受试者均得到6次以上的充分哺乳,增加代谢疾病诊断准确率。取受试者空腹静脉血,滴至滤纸片,等待自然渗透,保证采集滤纸片上具有均匀血斑4枚,≥8 mm,滤纸架悬空自然干燥约3 h,血斑呈现出深褐色,塑料袋密封,置于4℃温度保存待检。如果采集的干血片样本过小,出现污染、无法渗透或者不干燥等情况,应退回重新采集血样。

1.2.3 串联质谱仪初筛 对滤纸干血片中含有的氨基酸和酰基肉碱经甲醇溶剂萃取后,由液相泵混合流动相输送进入质谱离子源,应用电离学原理行质谱分析,具体操作如下:①首先将滤纸干血片样本与质控品打孔,直径为3 mm,呈圆形滤纸片,置于96微孔板中;②对氨基酸和酰基肉碱进行稀释,加入萃取液,琥珀酰丙酮加入分析,配制工作液,混匀2 min;③而后96微孔板中工作液分别为100 μL/孔,封膜标记,预热振荡仪,以700 r/min的转速震荡约45 min,注意对相关仪器进行预维护与清洗,自动进样器每次进样2 μL,样品平均测试时间约为7 min/个。检测结果由本院质谱室专业技术人员根据患儿血尿酸代谢谱变

化,结合患儿临床资料分析判断。

1.2.4 复查所有病例 按照各遗传代谢病生化代谢途径的特异性指标,阴性确诊者及时提供随访治疗,阳性进行原血片复查;对于明显高于截断值判断出的可疑阳性病例,立即召回复查,对于进行复查后的各阴性及时治疗,阳性进行下一代测序基因诊断。

1.2.5 基于下一代测序技术的基因诊断 下一代测序通过Ion Torrent PGM技术,通过目的DNA提取、基因扩增、文库构建、乳液PCR和测序流程分析,由本院委托外部专业分子诊断中心临床人员进行最终分子遗传学诊断。具体操作方法:①取上述质谱检测可疑阳性患儿静脉血5 mL,抗凝处理,对其中血样2 mL采用Qiagen Blood DNAMinikit提取基因组DNA,Qubit测定浓度后-20℃保存待测,3 mL血样留存;②采用遗传代谢病基因检测捕获Panel,多重探针杂交方法靶向富集目标区域序列,按照Vazyme建库说明处理纯化产物,经Qubit以及2100 Bioanalyzer质检分析确定浓度与大小及格,Hi Seq 2500平台进行测序;③最后进行数据处理,利用BWA序列对比法,质控序列对比人类基因组参考序列,注释软件Annovar注释突变位点到公共突变数据库,结合患儿情况,进行致病性解读。

1.3 统计学方法 选择SPSS24.0软件进行数据统计学分析,以下一代测序结果为金标准,根据四格表计算质谱检测结果诊断新生儿遗传代谢病的敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值及其95%CI。

2 结果

2.1 一般情况 289例临床表现疑似遗传代谢病新生儿,男性156例,女性133例,最终确诊病例为40例,男性22例,女性18例,出生体质量1 402~1 780 g,平均(2.27±1.38) g;年龄≥2 h,随访至6个月龄结局。其中脂肪酸代谢病15例、氨基酸代谢病14例、有机酸代谢病11例,见表1。

表1 40例遗传代谢病新生儿一般情况

疾病类型	例数	构成比(%)
脂肪酸代谢病	15	37.50
原发性肉碱转运障碍	10	25.00
中链酰基辅酶A脱氨基缺乏症	4	10.00
短链酰基辅酶A脱氨基缺乏症	1	2.50
氨基酸代谢病	14	35.00
高甲硫氨酸血症	5	12.50
同型胱氨酸尿症	4	10.00
苯丙酮尿症	4	10.00
精氨酸血症	1	2.50
有机酸代谢病	11	27.50
甲基丙二酸血症	6	15.00
异戊酸血症	3	7.50
3-甲基巴豆酰辅酶A羧化酶缺乏症	2	5.00

2.2 串联质谱联合下一代测序检测 疑似遗传代谢疾病的 289 例高危新生儿质谱检测初筛时,检测提示遗传代谢疾病结果为 34 例,有机酸代谢病 14 例、氨基酸代谢病 12 例、脂肪酸代谢病 8 例。以下一代测序检测为金标准,遗传代谢疾病结果为 40 例,以质谱检测待测标准提示遗传代谢疾病结果为 34 例,证明质谱检测的敏感度为 78.8% (95%CI: 61.1%~91.0%),特异度为 100% (95%CI: 99.8%~100%),阳性预测值为 100%,阴性预测值为 99.7% (95%CI: 99.3%~99.8%)。质谱检测与下一代测序检测提示遗传代谢病可能结果不一致的有 2 例,包括质谱检测中 1 例检测到丙氨酸或酪氨酸代谢异常,但下一代测序基因提示存在 3-甲基戊烯二酸尿症;质谱检测中 1 例血酪氨酸异常升高,但下一代测序中提示存在基因半合变异,诊断为 3-甲基巴豆酰辅酶 A 羧化酶乏症。

2.3 确诊患儿随访 40 例确诊患儿临床表现为代谢性酸中毒、血氨水平升高和低血糖等,具有呕吐、拒奶、呼吸困难、四肢张力异常等特征,所有患儿均建立了随访治疗档案,对症治疗,随访 6 个月,其中 1 例甲基丙二酸血症患儿出现急性代谢紊乱,对部分患儿在疾病明显临床表现出现之前,通过先天性遗传代谢病筛查,可以有效改善预后;其余患儿基于明确的诊断,干预及时,生长发育良好。

3 讨论

新生儿期发病的遗传代谢病情危重,早期临床表现缺乏特异性,难以进行及时诊断和提供干预,严重威胁新生儿的生命安全^[7]。但临床显示并非所有遗传代谢性疾病的患儿均都在新生儿时期发病,因此如果能够做到早期诊断,在发病之前给予科学正规的治疗与随访,有效避免高发诱因,可以一定程度上延缓疾病,同时在发病时可以及时提供针对性治疗,减少疾病死亡率^[8-9]。

根据遗传性代谢病发病机制发现,患儿体内生化代谢的酶催化反应受损导致体内代谢紊乱,从而继发各种临床症状,因此其检测方法需要满足检测全面的代谢产物的紊乱状态,推测其代谢异常的反应阻滞环节,可以得到反应异常酶的靶向定位。随着近年来对疾病谱研究的深入和分析仪器设备技术的更新,质谱分析在医学检验领域中的应用不断得到扩展^[10-12]。

串联质谱联合下一代测序是首先通过质谱检测快速定量检测患儿血样本中多种氨基酸和酰基肉碱,拓展可筛查疾病的种类,应用于临床,降低了临床儿科各疑难杂症的漏诊率,使许多遗传代谢疾病得到了早期的干预和治疗,串联质谱技术检测的各指标切值是疾病判断的重要依据,但临床制定较为困难,需要结合大临床数据,并进行本地化研究^[13-14]。因此,临床纳入下一代测序以期提高早期诊断率。下一代测序这一种大规模平行测序涵盖了全基因组、外显子和基因包测序等能够对血清中金银片段进行测序,对蛋白

质、核酸等生物大分子进行分离检测,从而对质谱检查难以确诊的疾病诊断具有重要价值^[15-16]。

本研究结果显示,通过质谱检测联合下一代测序可以确诊为遗传代谢疾病患儿的有 40 例,其中脂肪酸代谢病 15 例、氨基酸代谢病 14 例、有机酸代谢病 11 例。本研究先采用质谱检测进行初筛,解读质谱分析得到的数据,根据数据判读、结果分析得到的资料做出本次质谱分析的检查报告。而后对于所有阴性确诊者及时提供随访治疗,阳性进行原血片复查;对于明显高于截断值判断出的可疑阳性病例,立即召回复查,对于进行复查后的各阴性及时治疗,阳性进行下一代测序基因诊断。由于遗传代谢病涉及人体代谢的广泛途径,极其复杂,途径相互交叉,质谱结果易受患儿饮食、病情、治疗和检测时间等因素的影响,因此体内代谢物水平常无显著性差异。质谱检测联合下一代基因测序可以使临床对于代谢疾病的诊断模式从传统的表型诊断上升到基因型诊断的新阶段,在基因水平上对疾病作出明确诊断^[17-18]。本研究中质谱检测与下一代测序检测提示遗传代谢病可能结果不一致的有 2 例,质谱检测 1 例检测到丙氨酸或酪氨酸代谢异常,但下一代测序基因存在 3-甲基戊烯二酸尿症;1 例质谱检测血酪氨酸异常升高,但下一代测序中存在基因半合变异,诊断为 3-甲基巴豆酰辅酶 A 羧化酶乏症,这提示串联质谱联合下一代测序检测可以大大提高了突变检出率,从而能够在随访治疗中及时提供有效干预措施,减少患儿死亡率^[19]。

综上所述,采用质谱检测联合下一代测序能够在涉及多个亚型基因的罕见变异的检测中作用突出,有助于在新生儿期对于临床异质性高、表型错综复杂的代谢性疾病的高危儿进行积极的检测及评估,从而提供积极的治疗措施。

参考文献

- [1] 赵振东,王洁,王绍胜,等. 实施海南省新生儿苯丙酮尿症筛查的建议[J]. 海南医学, 2017, 28(12): 2039-2040.
- [2] 刘洪喜,朱志平,虞斌,等. 串联质谱与高通量测序技术在新生儿疾病筛查中的应用[J]. 现代预防医学, 2020, 47(1): 115-118.
- [3] 国家卫生健康委员会临床检验中心新生儿遗传代谢病筛查室间质评委员会. 新生儿遗传代谢病筛查指标切值建立方法专家共识[J]. 中国实用儿科杂志, 2019, 34(11): 881-884.
- [4] ELLIOTT S, BUROKER N, COURNOYER JJ, et al. Pilot study of newborn-screening for six lysosomal storage-diseases-using Tandem-Mass-Spectrometry [J]. Mol Genet Metab, 2016, 118(4): 304-309.
- [5] BURLINA AB, POLO G, SALVIATI L, et al. Newborn screening for lysosomal storage disorders by tandem mass spectrometry in North East Italy [J]. J Inher Metab Dis, 2018, 41(2): 209-219.
- [6] 赵得雄,吴梦圆,吴冰冰,等. 串联质谱检测和高通量测序对青海地区新生儿出生缺陷筛查和诊断的横断面调查[J]. 中国循证儿科杂志, 2019, 14(4): 247-253.
- [7] 涂文军,何健,陈惠,等. 串联质谱技术在新生儿重症监护病房患儿遗传代谢病检测中的应用[J]. 中国医学科学院学报, 2013, 35(4): 476.

T2DM 并发 DR 患者 FBG、HbA1c 及 C 肽水平的变化及临床意义

洗朝丽, 李钦, 张满

吴川市人民医院检验科, 广东 吴川 524500

【摘要】 目的 探讨 2 型糖尿病(T2DM)并发视网膜病变(DR)患者空腹血糖(FBG)、糖化血红蛋白(HbA1c)及血清 C 肽水平的变化及临床意义, 为患者诊疗提供依据。方法 选取 2018 年 7 月至 2019 年 7 月在吴川市人民医院住院治疗的 216 例 T2DM 患者作为研究对象。根据有无 DR 分为单纯 T2DM 组 100 例和 DR 组 116 例, 选择同期健康体检者 100 例作为对照组。DR 组根据眼底病变分为 I 期 34 例, II 期 25 例, III 期 30 例, IV 期 27 例。测定并比较所有受试者的 FBG、HbA1c、C 肽、C 反应蛋白(CRP)水平, 并分析各指标与 DR 的关系。结果 DR 组患者的 FBG、HbA1c 和 CRP 水平分别为(7.98±1.37) mmol/L、(11.67±2.10)%和(5.97±1.41) mg/L, 明显高于单纯 T2DM 组[(7.21±0.92) mmol/L、(9.10±1.21)%、(3.12±0.85) mg/L]和对照组[(5.13±0.87) mmol/L、(5.46±0.87)%、(1.02±0.33) mg/L], DR 组的 C 肽水平为(0.71±0.12) ng/L, 明显低于单纯 T2DM 组的(0.94±0.13) ng/L 和对照组的(1.27±0.21) ng/L, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); I 期患者的 FBG、HbA1c、CRP 水平分别为(5.99±1.02) mmol/L、(7.12±1.02)%、(3.25±0.74) mg/L, 明显低于 II 期[(6.85±0.91) mmol/L、(9.20±1.13)%、(4.89±0.85) mg/L]、II 期[(7.89±1.21) mmol/L、(10.87±0.97)%、(5.62±0.76) mg/L]及 IV 期[(9.13±1.37) mmol/L、(13.25±1.32)%、(6.99±0.91) mg/L], 而 I 期患者的 C 肽水平为(1.08±0.41) ng/L, 明显高于 II 期[(0.92±0.30) ng/L]、III 期[(0.85±0.12) ng/L]及 IV 期[(0.76±0.21) ng/L], 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 相关性分析结果显示, T2DM 并发 DR 程度与 FBG、HbA1c、CRP 水平呈明显正相关($r = 0.621, 0.527, 0.417; P < 0.05$), 与 C 肽水平呈明显负相关($r = -0.749; P < 0.05$)。结论 T2DM 并发 DR 与 FBG、HbA1c、CRP 及 C 肽密切相关, 可用于诊断 T2DM 并发 DR 的病情严重程度, 密切监测上述指标变化有助于 T2DM 并发 DR 患者的早期诊断及预防。

【关键词】 2 型糖尿病; 视网膜病变; 空腹血糖; 糖化血红蛋白; C 肽; 临床意义

【中图分类号】 R587.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2021)02-0180-04

Changes and clinical significance of fasting blood glucose, glycosylated hemoglobin, and C-peptide levels in patients with type 2 diabetes mellitus complicated with diabetic retinopathy. XIAN Chao-li, LI Qin, ZHANG Man. Department of Laboratory Medicine, Wuchuan People's Hospital, Wuchuan 524500, Guangdong, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the changes and clinical significance of fasting blood glucose (FBG), glycosylated hemoglobin (HbA1c), and serum C-peptide levels in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) complicated with diabetic retinopathy (DR). **Methods** A total of 216 T2DM patients who were hospitalized in Wuchuan People's

基金项目: 广东省湛江市科技计划项目(编号: 2020B01318)

通讯作者: 洗朝丽, E-mail: cxian1982@126.com

- *****
- [8] 韩连书. 质谱技术在遗传代谢病及产前诊断中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2017, 40(10): 761-765.
- [9] LIN Y, ZHENG Q, ZHENG T, et al. Expanded newborn screening for inherited metabolic disorders and genetic characteristics in a southern Chinese population [J]. Clin Chim Acta. 2019, 494: 106-111.
- [10] WASSERSTEIN MP, CAGGANA M, BAILEY SM, et al. The New York pilot newborn screening program for lysosomal storage diseases: Report of the First 65 000 Infants [J]. Genet Med, 2019, 21(3): 631-640.
- [11] 徐素华, 杨琳, 吴冰冰, 等. 疑似遗传代谢病的高危新生儿行质谱检测与高通量测序检测诊断准确性研究[J]. 中国循证儿科杂志, 2019, 14(1): 1-7.
- [12] 胡真真, 杨建滨, 尚世强, 等. Region 4 Stork 系统在新生儿遗传代谢病串联质谱筛查中的初步应用[J]. 中华检验医学杂志, 2018, 41(4): 300-304.
- [13] 韩连书. 遗传代谢病检测技术的应用及其结果的临床判读[J]. 中国实用儿科杂志, 2014, 29(8): 569-574.
- [14] KANG E, KIM YM, KANG M, et al. Clinical and genetic characteristics of patients with fatty acid oxidation disorders identified by newborn screening [J]. BMC Pediatr, 2018, 18(1): 103.
- [15] BROWN M, ASHCRAFT P, ARNING E, et al. Gamma-Hydroxybutyrate content in dried bloodspots facilitates newborn detection of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency [J]. Mol Genet Metab, 2019, 128(1-2): 109-112.
- [16] 林书祥, 舒剑波, 王朝, 等. 15851 例遗传代谢病高危患儿的临床分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2017, 19(12): 1243-1247.
- [17] 郝虎, 石聪聪, 吴鹰军, 等. 基于目的基因捕获的高通量测序技术在遗传代谢病诊断中的应用[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2015, 30(22): 1721-1724.
- [18] DIBATTISTA A, MCINTOSH N, LAMOUREUX M, et al. Metabolic signatures of cystic fibrosis identified in dried blood spots for newborn screening without carrier identification [J]. J Proteome Res, 2019, 18(3): 841-854.
- [19] 孙丽芳, 李杰. 串联质谱技术应用于新生儿遗传代谢病筛查, 以甘肃省为例[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(4): 1955-1960.

(收稿日期: 2020-08-15)