

甘肃省正常新生儿干血斑氨基酸及酰基肉碱串联质谱检测指标医学参考范围的调查^{*}

刘芙蓉, 王 兴, 孙小红, 郑 雷, 周秉博, 郝胜菊

(甘肃省妇幼保健院医学遗传学中心, 甘肃省出生缺陷防控重点实验室, 兰州 730050)

摘要:目的 确立甘肃省正常新生儿干血斑中氨基酸及酰基肉碱串联质谱检测指标的医学参考范围, 为该省新生儿遗传代谢病筛查中氨基酸及酰基肉碱检测结果的判读提供依据。**方法** 采用非衍生串联质谱检测试剂盒, 对甘肃省 77 957 例新生儿足跟血滤纸片进行遗传代谢病筛查。检测结果中的 11 种氨基酸和 31 种酰基肉碱按照 95% 的参考范围用 SPSS19.0 统计软件进行分析。**结果** 甘肃省正常新生儿干血斑中氨基酸及酰基肉碱串联质谱检测指标医学参考值($\mu\text{mol/L}$)分别为: ALA(216.17~727.58), ARG(1.80~33.03), CIT(4.87~30.67), GLY(183.43~841.46), LEU(79.85~289.45), MET(3.32~25.86), ORN(34.09~225.15), PHE(27.04~83.37), PRO(79.44~337.59), TYR(37.61~177.79), VAL(59.31~250.95), C0(9.35~45.35), C2(2.62~25.40), C3(0.46~3.3), C3DC_C4OH(0.02~0.20), C4(0.08~0.31), C4DC_C5OH(0.10~0.32), C5(0.05~0.30), C5:1(0.00~0.01), C5DC_C6OH(0.04~0.22), C6(0.01~0.06), C6DC(0.03~0.13), C8(0.02~0.08), C8:1(0.05~0.31), C10(0.02~0.12), C10:1(0.03~0.10), C10:2(0.01~0.10), C12(0.02~0.13), C12:1(0.02~0.10), C14(0.07~0.30), C14:1(0.03~0.13), C14:2(0.01~0.03), C14OH(0.00~0.02), C16(0.59~4.91), C16:1(0.03~0.30), C16:1-OH(0.01~0.08), C16OH(0.01~0.03), C18(0.29~1.30), C18:1(0.57~2.32), C18:1-OH(0.01~0.05), C18:2(0.08~0.51) 和 C18OH(0.00~0.02)。**结论** 甘肃省正常新生儿干血斑氨基酸及酰基肉碱串联质谱检测指标医学参考范围的建立, 为该省新生儿群体串联质谱检测的结果判断提供参考依据。

关键词: 甘肃省; 串联质谱; 氨基酸; 酰基肉碱; 医学参考范围

中图分类号: R446.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2018)02-031-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2018.02.010

Investigation on the Medical Reference Range of the Normal Neonates with the Amino Acid and Acyl Carnitine Tandem Mass Spectrometry in Gansu Province

LIU Fu-rong, WANG Xing, SUN Xiao-hong, ZHENG Lei, ZHOU Bing-bo, HAO Sheng-ju

(Medical Genetics Center, Gansu Provincial Maternity and Child-care Hospital/Key Laboratory of Birth Defects Prevention and Control in Gansu Province, Lanzhou 730050, China)

Abstract: **Objective** To establish the medical reference range of amino acid and acyl carnitine tandem mass spectrometry in normal neonates in Gansu province, and provide the basis for the determination of amino acid and acyl carnitine test results in the screening of neonatal genetic metabolic diseases. **Methods** A non-derivatization tandem mass spectrometry kit was used to screen 77 957 samples of neonates in Gansu province. Statistical software SPSS19.0 was used to analyze the 95% reference range of 11 amino acids and 31 kinds of acylcarnitine indexes. **Results** The medical reference value($\mu\text{mol/L}$) of the series mass spectra of newborn genetic metabolic diseases in Gansu province was established: ALA (216.17~727.58), ARG (1.80~33.03), CIT (4.87~30.67), GLY (183.43~841.46), LEU (79.85~289.45), MET (3.32~25.86), ORN (34.09~225.15), PHE (27.04~83.37), PRO (79.44~337.59), TYR (37.61~177.79), VAL (59.31~250.95), C0 (9.35~45.35), C2 (2.62~25.40), C3 (0.46~3.3), C3DC_C4OH (0.02~0.20), C4 (0.08~0.31), C4DC_C5OH (0.10~0.32), C5 (0.05~0.30), C5:1 (0.00~0.01), C5DC_C6OH (0.04~0.22), C6 (0.01~0.06), C6DC (0.03~0.13), C8 (0.02~0.08), C8:1 (0.05~0.31), C10 (0.02~0.12), C10:1 (0.03~0.10), C10:2 (0.01~0.10), C12 (0.02~0.13), C12:1 (0.02~0.10), C14 (0.07~0.30), C14:1 (0.03~0.13), C14:2 (0.01~0.03), C14OH (0.00~0.02), C16 (0.59~4.91), C16:1 (0.03~0.30), C16:1-OH (0.01~0.08), C16OH (0.01~0.03), C18 (0.29~1.30), C18:1 (0.57~2.32), C18:1-OH (0.01~0.05), C18:2 (0.08~0.51) and C18OH (0.00~0.02). **Conclusion** The establishment of the medical reference range of the normal neonatal dryblood spot amino acid and acyl carnitine tandem mass spectrometry in Gansu province can provide reference for the determination of the results of the cluster mass spectrometry in this region.

^{*} 基金项目: 兰州市科技计划项目(由兰州市科技局资助项目研究), 项目编号: 2016-2-26。

作者简介: 刘芙蓉(1984—), 女, 硕士, 检验师, 研究方向: 医学遗传学。

通讯作者: 郝胜菊(1965—), 女, 硕士, 主任医师, 研究方向: 医学遗传学, E-mail: 76108060@qq.com。

Keywords: gansu province; tandem mass spectrometry; amino acid; acyl carnitine; medical reference range

串联质谱(MS/MS)是目前在国内新生儿遗传代谢病筛查领域快速推广的先进检测技术,它具有单次实验检测数十种代谢物指标的特性,极大拓展了筛查的遗传代谢病谱。而任何医学检验技术都需结合当地人群的个体指征,积累大量的数据库资源,以建立本地区人群的正常参考范围,为实验室及临床诊治提供可靠的判读标准^[1~3]。本研究通过对甘肃地区已取得的MS/MS检测数据进行统计分析,确定该法在甘肃地区新生儿群体中11种氨基酸、31种酰基肉碱指标的95%医学参考范围。

1 材料和方法

1.1 研究对象 选取2015年1月~2016年12月,自甘肃省各地州市送往本中心进行串联质谱法遗传代谢病检测的足跟血滤纸血片进行检测。选取标准:按照《新生儿疾病筛查技术规范》^[4]的要求,剔除未渗透、发霉及采血时间不足等标本,由本院新生儿疾病筛查中心人员对血片质量严格审核,将77 957例合格标本进行检测。

1.2 仪器与试剂 美国Waters串联质谱仪、PerkinElmer恒温孵育振荡器、超声清洗仪、全自动打孔器Wallac DBS Puncher 9,试剂是PerkinElmer公司生产的NeoBase™ Non-derivatized MSMS Kit。

1.3 方法

1.3.1 样本采集和发送:采集新生儿足跟血,要求充分哺乳72 h后,滴注于专用滤纸片上,使血斑自然渗透,室温下自然晾干。要求血斑直径>8 mm,每份标本至少2~3个血斑。2℃~6℃存放于干燥低温环境中,一周内将标本寄送至本院新生儿疾病筛查中心,初审合格标本送至本中心进行检测。

1.3.2 方法:按NeoBase™ Non-derivatized MSMS Kit说明书中规定进行实验操作。利用全

自动打孔器选取血斑半径3/4处进行打孔。每一个反应板均带有试剂盒中提供的室内质控样本,以保证实验的正确性及稳定性。将直径3.2 mm的待测样品血斑和质控品置于96孔V型底萃取板中,每孔中加入现配的100 μl内标工作液,其中V(氨基酸/酰基肉碱内标原液):V(萃取工作液)=1:110;反应液封板,置于45℃700 r/min的恒温孵育振荡器中震荡45 min;转移75 μl萃取液于V型截底96孔板内,以铝箔封套密封微孔板;利用串联质谱仪检测各萃取标本中酰基肉碱的浓度。

1.4 统计学分析 应用SPSS19.0软件将整理后的检测结果进行统计分析,采用单样本Kolmogorov-Smirnov检验判断资料的正态性,检验结果 $P>0.05$ 时符合正态分布资料,正态分布资料95%,99%的参考范围,分别取“ $1.96s\pm 1.96s$ ”,“ $2.58s\pm 2.58s$ ”值;非正态分布资料应用百分位数法,95%,99%的参考范围分别取“ $P2.5\sim P97.5$ ”,“ $P0.5\sim P99.5$ ”值。

2 结果

2.1 正态分布检验 本研究应用单样本Kolmogorov-Smirnov检验对串联质谱检测结果中11种氨基酸和31种酰基肉碱进行正态性检验,结果显示均呈非正态分布。

2.2 甘肃省新生儿干血斑样本中11种氨基酸、31种酰基肉碱正常医学参考范围的确立 医学上通常将生化指标中95%人群所在范围作为该指标的正常参考范围^[2]。本研究通过检测甘肃省77 957例新生儿足跟血标本,将结果进行统计分析,以百分位数($P2.5, P97.5$)表示,统计出甘肃省新生儿遗传代谢病筛查串联质谱指标中11种氨基酸(见表1)和31种酰基肉碱(见表2)代谢物的正常参考范围。

表1 串联质谱检测的11种氨基酸指标参考范围(μmol/L)

分析物	极大值	极小值	中位数	95%参考范围($P2.5\sim P97.5$)	99%参考范围($P0.5\sim P99.5$)
ALA	6 407.33	2.00	381.91	216.17~727.58	181.18~981.60
ARG	1 539.97	0.13	9.42	1.80~33.03	1.29~46.26
CIT	961.95	0.11	11.49	4.87~30.67	3.28~53.65
GLY	3 623.11	2.49	368.63	183.43~841.46	147.60~1 117.08
LEU	4 734.27	0.93	150.16	79.85~289.45	65.49~360.58
MET	561.34	0.16	10.40	3.32~25.86	2.35~33.64
ORN	1 714.87	0.75	80.11	34.09~225.15	26.55~324.98
PHE	1 929.75	0.28	47.19	27.04~83.37	22.42~104.88
PRO	2 618.46	0.98	154.42	79.44~337.59	65.04~425.70
TYR	1 216.27	0.58	80.96	37.61~177.79	29.17~240.99
VAL	2 779.27	1.20	117.67	59.31~250.95	48.66~321.40

表 2 串联质谱检测的 31 种酰基肉碱指标参考范围($\mu\text{mol/L}$)

分析物	极大值	极小值	中位数	95%参考范围(P2.5~P97.5)	99%参考范围(P0.5~P99.5)
C0	179.71	0.23	20.90	9.35~45.35	7.25~58.68
C2	82.32	0.06	9.44	2.62~25.40	1.34~33.64
C3	12.15	0.01	1.30	0.46~3.3	0.29~4.46
C3DC_C4OH	1.39	0.00	0.07	0.02~0.20	0.02~0.28
C4	5.21	0.00	0.15	0.08~0.31	0.06~0.42
C4DC_C5OH	7.24	0.01	0.17	0.10~0.32	0.08~0.41
C5	2.41	0.00	0.11	0.05~0.30	0.04~0.49
C5 : 1	1.87	0.00	0.01	0.00~0.01	0.00~0.01
C5DC_C6OH	22.28	0.00	0.10	0.04~0.22	0.03~0.29
C6	2.06	0.00	0.03	0.01~0.06	0.01~0.09
C6DC	2.13	0.01	0.05	0.03~0.13	0.02~0.18
C8	2.80	0.00	0.04	0.02~0.08	0.01~0.12
C8 : 1	1.31	0.01	0.13	0.05~0.31	0.04~0.45
C10	1.71	0.00	0.05	0.02~0.12	0.02~0.17
C10 : 1	1.59	0.01	0.05	0.03~0.10	0.02~0.15
C10 : 2	8.57	0.00	0.03	0.01~0.10	0.01~0.14
C12	4.18	0.00	0.05	0.02~0.13	0.02~0.20
C12 : 1	8.86	0.00	0.04	0.02~0.10	0.01~0.17
C14	4.60	0.00	0.15	0.07~0.30	0.05~0.38
C14 : 1	0	0.01	0.06	0.03~0.13	0.02~0.20
C14 : 2	15.33	0.00	0.01	0.01~0.03	0.00~0.03
C14OH	4.60	0.00	0.01	0.00~0.02	0.00~0.03
C16	25.38	0.02	2.25	0.59~4.91	0.38~6.05
C16 : 1	5.08	0.00	0.12	0.03~0.30	0.02~0.39
C16 : 1-OH	3.67	0.00	0.03	0.01~0.08	0.01~0.11
C16OH	3.67	0.00	0.01	0.01~0.03	0.00~0.04
C18	4.44	0.01	0.68	0.29~1.30	0.20~1.59
C18 : 1	11.45	0.01	1.23	0.57~2.32	0.40~2.84
C18 : 1-OH	4.44	0.00	0.02	0.01~0.05	0.01~0.06
C18 : 2	4.72	0.00	0.22	0.08~0.51	0.06~0.66
C18OH	3.89	0.00	0.01	0.00~0.02	0.00~0.03

3 讨论 串联质谱技术是近年来迅猛发展的一种灵敏、快速、高通量和选择性强的技术,具有高特异度、高敏感度等特点,可同时筛查数十种至上百种遗传代谢病^[5]。近年来先后多项研究报道了使用串联质谱技术检出在不同国家、地区、民族中存在不同的差异^[6,7],我国上海地区首先应用串联质谱技术进行遗传代谢病筛查,目前已有 200 多家机构在新生儿遗传代谢病筛查中开展串联质谱筛查技术,年筛查量达 200 万人次以上^[8~10]。筛查疾病种类拓展至 40 多种遗传代谢病^[11]。因此,以串联质谱技术为基础的筛查治疗系统,提高了新生儿筛查的质量,填补了我国多种遗传代谢病筛查治疗的空白,为提高我国出生缺陷工作做出重要贡献。

甘肃省遗传代谢病发病率高于全国平均水平,其中苯丙酮尿症(PKU)发病率约为 1/3 000^[12,13],

远高于南方及沿海城市^[14,15]。由于我省地处西北内陆区,经济、医疗发展水平相对落后,直到 2015 年才引入串联质谱技术,目前已逐步推广该技术应用于本省新生儿遗传代谢病筛查,而建立适合本地新生儿群体的串联质谱筛查指标医学参考范围是进行检验结果判断的基础。本研究统计分析我省 77 957 例新生儿足跟血标本,结果显示串联质谱检测的 42 项指标均为非正态性分布,这与本中心之前报道^[16]的结果存在偏差,可能与样本量和正态性分布检验方法不同有关。而新生儿用药、营养补液、标本采集与保存等因素会造成部分结果异常增高^[17,18]。另外,本次调查补充了该省正常新生儿干血斑酰基肉碱串联质谱检测指标,由于样本量扩大,本次研究的结果更为准确。

通过对近 8 万例新生儿串联质谱筛查数据统

计分析,建立本地新生儿群体该法检测指标的医学参考范围,能更好地辅助临床对检验结果的解读。

参考文献:

- [1] 董丽萍,牟凯,朱峰,等.山东鲁中地区新生儿体内游离肉碱及酰基肉碱的变化特点[J].中国妇幼保健,2016,31(13):2671-2675.
Dong LP, Mu K, Zhu F, et al. The changes of free carnitine and acyl carnitine in newborns in shandong luzhong region[J]. Maternal and Child Health Care of China, 2016, 31(13): 2671-2675.
- [2] 白静,侯兴宁,兰海琴.新生儿凝血危急值在临床实践中的应用以及正常参考范围的调查分析[J].现代检验医学杂志,2017,32(1):150-153.
Bai J, Hou XN, Lan HQ. Critical value of neonatal coagulation in clinical practice and the investigation of normal reference range[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(1): 150-153.
- [3] 黄金文,李如凯,高婧,等.孕妇血清半胱氨酸蛋白酶抑制剂C参考范围的研究[J].现代检验医学杂志,2016,31(4):133-135.
Huang JW, Li RK, Gao J, et al. Study on the reference interval of serum cysteine C pregnant women[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(4): 133-135.
- [4] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.新生儿疾病筛查技术规范(2010年版)[S].北京:中华人民共和国卫生部,2010.
Notional Health and Famaily Planning Commission of the People's Republiic of China. Technical specification for screening of neonatal diseases (2010 edition) [S]. Beijing: Ministry of Health Bulletin of the People's Republic of China, 2010.
- [5] Millington DS, Kodo N, Norwood DL, et al. Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism[J]. J Inherit Metab Dis, 1990, 13(3): 321-324.
- [6] Lindner M, Gramer G, Haege G, et al. Efficacy and outcome of expanded newborn screening for metabolic diseases-report of 10 years from South-West Germany[J]. Orphanet J Rare Dis, 2011, 6(20): 6-44.
- [7] Touw CM, Smit GP, de Vries M, et al. Risk stratification by residual enzyme activity after newborn screening for medium chain acyl Co A dehydrogenase deficiency: data from a cohort study[J]. Orphanet J Rare Dis, 2012, 3(25): 7-30.
- [8] 何法霖,高振翔,王薇,等.串联质谱检测氨基酸和酰基肉碱的室内质量评价[J].中国医药导报,2014, 11(20): 24-27, 84.
He FL, Gao ZX, Wang W, et al. Current stute of neonatal screening for amino acids and acyl carnitine tandem mass spectrom[J]. China Medical Guide, 2014, 11(20): 24-27, 84.
- [9] 王薇,章晓燕,袁帅,等.全国新生儿遗传代谢病筛查质量指标室内质量调查研究[J].中国儿童保健杂志,2017,25(11):1182-1185.
Wang W, Zhang XY, Yuan S, et al. External quality survey on quality indicators of neonatal screening for inherited metabolic diseases in China [J]. Chinese Child Health Care, 2017, 25(11): 1182-1185.
- [10] 韩炳娟,韩炳超,邹卉.串联质谱技术在新生儿遗传代谢性疾病筛查中的应用[J].中国妇幼保健,2013,28(29):4907-4909.
Han BJ, Han BC, Zou H. The application of tandem mass spectrometry in the screening of neonatal genetic metabolic diseases [J]. Maternal and Child Health Care of China, 2013, 28(29): 4907-4909.
- [11] 蒙萌,胡斌,王丽雁,等.重庆地区46种遗传代谢病筛查结果分析[J].中国妇幼保健,2015, 30(19): 3276-3277.
Meng M, Hu B, Wang LY, et al. Analysis of 46 genetic metabolic diseases in Chongqing [J]. Maternal and Child Health Care of China, 2015, 30(19): 3276-3277.
- [12] 陈丕亮,陈亚.2010~2012年甘肃省新生儿疾病筛查状况及分析[J].中国优生优育,2013, 19(6): 470-472.
Chen PL, Chen Y. Analysis of neonatal diseases screening in Gansu from 2010 to 2012 [J]. Chinese Journal of Healthy Birth and Child Care, 2013, 19(6): 470-472.
- [13] 王兴,郝胜菊,陈丕亮,等.甘肃省56万例新生儿苯丙酮尿症筛查结果分析[J].国际检验医学杂志,2015, 36(24): 3588-3590.
Wang X, Hao SJ, Chen PL, et al. Analysis on screening results of phenylketonuria among 567 691 neonatal in Gansu province [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2015, 36(24): 3588-3590.
- [14] 田国力,王燕敏,许洪平,等.非衍生化串联质谱技术筛查上海部分地区新生儿遗传代谢病的回顾性分析[J].临床检验杂志,2016, 34(12): 909-912.
Tian GL, Wang YM, Xu HP, et al. A retrospective analysis of newborn screening of inherited neonatal genetic metabolic diseases by non-derivative tandem mass spectrometry in some parts of Shanghai [J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2016, 34(12): 909-912.
- [15] 黄新文.应用串联质谱技术进行新生儿遗传代谢病筛查[J].中国儿童保健杂志,2011, 19(2): 99-101.
Huang XW. The genetic metabolic diseases were screened by tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal Child Health Care, 2011, 19(2): 99-101.
- [16] 王兴,刘芙蓉,胡秀琴,等.甘肃地区新生儿干血斑样本11种氨基酸及相关氨基酸
(下转37页)

(上接 34 页)

代谢物间浓度比值正常参考区间的建立[J]. 中国优生与遗传杂志, 2016, 24(9): 11-12, 35.

Wang X, Liu FR, Hu XQ, et al. Gansu region neonatal dried blood samples from 11 kinds of amino acids and amino acid metabolites concentration ratio between the establishment of the normal reference range[J]. Chinese Journal of Birth Health and Heredity, 2016, 24(9): 11-12, 35.

- [17] 李启亮, 宋文琪, 徐樾巍, 等. 液-质联用串联质谱检测干血滤纸氨基酸水平的影响因素[J]. 临床检验杂志, 2009, 27(4): 302-304.

Li QL, Song WQ, Xi XW, et al. The influence factors

of the amino acid level of dry blood filter paper were detected by liquid-mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2009, 27(4): 302-304.

- [18] 林 飞, 徐钰琪, 阙 婷, 等. 新生黄疸患儿与早产低体质量儿体内氨基酸水平变化原因分析[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(21): 2947-2949.

Lin F, Xu YQ, Que T, et al. Causes analysis of amino acid level changes in jaundice neonates and premature low-birth-weight neonates[J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2014, 11(21): 2947-2949.

收稿日期: 2018-02-02

修回日期: 2018-02-22