

新生儿异戊酸血症串联质谱法与相关基因突变检测的价值研究

郑泉志, 傅清流, 彭维林, 林壹明 (泉州市妇幼保健院·儿童医院检验科, 福建泉州 362000)

摘要: **目的** 了解福建省泉州地区新生儿异戊酸血症 (isovaleric acidemia, IVA) 串联质谱法与相关基因突变检测情况。**方法** 2019年1月~2020年12月, 泉州地区共有151 917例新生儿进行串联质谱遗传代谢病筛查, 异戊酰基肉碱 (isovalerylcarnitine, AISO-C5) 浓度升高的筛查样本应用 MassARRAY 技术进行 IVD 基因突变筛查, IVA 疑似样本采用高通量测序技术诊断。**结果** 研究期间共有132例新生儿表现为浓度升高, 采用传统筛查规则需召回132例新生儿, 召回复查阳性人数20例, 1例确诊为 IVA 患者, IVA 的阳性预测值为0.76%。此外, 3例新生儿被诊断为2-甲基丁酰辅酶A脱氢酶缺乏症 (2-methylbutyryl-CoA dehydrogenase deficiency, 2-MBAD) 患者。联合应用基因突变筛查后, 仅5例新生儿结果异常, 基因诊断证实4例新生儿为 IVA 携带者, 1例新生儿为 IVA 患者, 因此 IVA 的阳性预测值提高至20%。所有患者的新生儿筛查和召回复查结果均显示 AISO-C5 浓度升高。1例 IVA 患者携带 IVD 基因 c.499A > G (p.M167V) 和 c.1208A > G (p.Y403C) 复合杂合突变, 3例 2-MBAD 患者均携带 ACADSB 基因 c.1165A > G (p.M389V) 纯合突变。**结论** 联合应用 MassARRAY 技术进行 IVD 基因突变筛查可以有效排除 AISO-C5 升高的假阳性标本, 提高阳性预测值, 明显提高 IVA 的新生儿筛查效率。

关键词: 异戊酸血症; 新生儿筛查; 串联质谱技术; 异戊酰辅酶A脱氢酶基因

中图分类号: R722.11; Q503 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2022) 05-061-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2022.05.013

Study on the Value of Tandem Mass Spectrometry and Related Gene Mutation Detection in Neonates with Isovaleric Acidemia

ZHENG Quan-zhi, FU Qing-liu, PENG Wei-lin, LIN Yi-ming

(Department of Clinical Laboratory, Quanzhou Woman's and Children's Hospital, Fujian Quanzhou 362000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the value of tandem mass spectrometry and related gene mutation detection of neonates with isovaleric acidemia (IVA) in Quanzhou of Fujian Province. **Methods** From January 2019 to December 2020, a total of 151 917 newborns in Quanzhou were screened for inherited metabolic diseases by tandem mass spectrometry (MS/MS). Newborns with elevated levels of isovalerylcarnitine (AISO-C5) were subjected to IVD gene mutation screening using MassARRAY assay, and suspected patients were diagnosed by second-generation sequencing. **Results** During the study period, 132 newborns with elevated AISO-C5 levels had to be recalled by conventional MS/MS screening, of which 20 were still positive when recalled, and one patient was confirmed as IVA. The positive predictive value of IVA was 0.76%. In addition, three neonates were diagnosed with 2-methylbutyryl-CoA dehydrogenase deficiency (2-MBAD). After the application of mutation screening, only 5 newborns had abnormal genetic screening results, and the genetic analysis confirmed that four newborns were IVA carriers and one patient newborn was IVA, so the positive predictive value of IVA was increased to 20%. The NBS results showed that all patients with increased concentrations of AISO-C5, and the AISO-C5 concentration was still elevated during recall. The IVA patient carried the compound heterozygous mutation of c.499A > G (p.P167V) and c.1208A > G (p.Y403C) in the IVD gene, and all three 2-MBAD patients carried the homozygous mutation of c.1165A > G (p.M389V) in the ACADSB gene. **Conclusion** The application of MassARRAY assay for IVD gene mutation screening could effectively eliminate AISO-AISO-C5 false positive samples and increase the positive predictive value, thus significantly improved the efficiency of newborn screening for IVA.

Keywords: isovaleric acidemia; newborn screening; tandem mass spectrometry; IVD gene

异戊酸血症 (isovaleric acidemia, IVA) 又称异 传的有机酸代谢病^[1]。其发病机制为异戊酰辅酶A
戊酰辅酶A脱氢酶缺乏症, 是一种常染色体隐性遗 脱氢酶 (IVD) 缺陷, 导致亮氨酸分解过程中的代

基金项目: 福建省卫生健康科技计划项目 (2020QNA083): 异戊酸血症的二阶基因筛查。

作者简介: 郑泉志 (1978-), 男, 本科, 副主任技师, 研究方向为临床检验学, E-mail: 78334180qq.com。

通讯作者: 林壹明 (1987-), 男, 硕士, 主管技师, 研究方向为医学遗传学, E-mail: linyiming0819@sina.com。

谢产物异戊酰辅酶A正常代谢途径被阻断,旁路代谢生成的异戊酰甘氨酸和3-羟异戊酸在体内蓄积,引起发育迟缓、代谢酸中毒和神经系统损害,甚至死亡^[2]。引起IVA致病的IVD基因定位于染色体15q14-15,编码394个氨基酸。该病临床表现多样且缺乏特异性,典型的IVA患儿出生时无异常表现,在新生儿早期起病,表现为拒乳、呕吐、反应差、嗜睡、抽搐和四肢肌张力低等症状^[3]。若不能得到及时诊断和治疗,患儿多出现严重的代谢性酸中毒、酮尿和高氨血症,病情发展迅速,发病后致死和致残率极高。

近年来,随着串联质谱技术的应用和诊治水平的提高,新生儿筛查疾病种类逐渐扩展丰富^[4-6]。IVA患者表现为血液中异戊酰基肉碱(isovaleryl-carnitine, AISO-C5)浓度升高可以通过基于串联质谱技术的新生儿筛查检测出来,早期诊断并及时治疗可以明显改善患者预后^[2,7]。然而,AISO-C5酰基肉碱包含了异戊酰肉碱、2-甲基丁酰肉碱和特戊酰肉碱这些同分异构体,采用串联质谱技术无法将这些同分异构体区分出来。2-甲基丁酰肉碱是2-甲基丁酰辅酶A脱氢酶缺乏症(2-methylbutyryl-CoA dehydrogenase deficiency, 2-MBAD)的筛查指标,2-MBAD患者也表现为AISO-C5升高^[8]。匹氨西林、头孢菌素类抗生素和特戊酸酯软膏含特戊酰肉碱,母亲使用这些药物会引起小孩的AISO-C5水平暂时升高。因此,目前IVA的新生儿筛查存在假阳性偏高的问题,这不仅给家属带来极大的心理负担,而且明显增加了医疗费用。

针对IVA筛查的假阳性问题,利用分辨率更高的超高效液相色谱串联质谱技术测定于血斑中的异戊酰甘氨酸可以提高筛查效率,但超高效液相色谱串联质谱仪器昂贵且操作相对繁琐,国内目前尚未见相关的应用报道,因此探索一种新的策略来减少IVA筛查的假阳性显得尤为重要。随着基因检测的深入开展,越来越多的IVD基因突变位点被检出,这为基因突变筛查奠定了良好的基础。因此本研究探讨通过联合应用MassARRAY技术进行基因筛查的手段来提高IVA的新生儿筛查效率。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2019年1月~2020年12月,福建省泉州市新生儿疾病筛查分中心共筛查151 917例新生儿,其中男性83 206例,女性68 711例。选择标准:新生儿筛查异常(AISO-C5 > 0.35 $\mu\text{mol/L}$)的新生儿纳入本研究。本研究经泉州市儿童医院学术伦理委员会批准通过,所有参与遗传代谢病筛查的新生儿父母或监护人均签署知情同意书。

1.2 试剂和仪器 新生儿琥珀酰丙酮和非衍生化

多种氨基酸、肉碱测定试剂盒(串联质谱法)(广州市丰华生物工程有限公司);AQCUTY TQD串联质谱检测系统(美国Waters公司)。基因组DNA提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;ABI verity-384 PCR仪(美国ABI公司);iPLEX Reagent Kit(美国Sequenom公司);芯片(384-well SpectroCHIP),MassARRAY Nanodispenser RS1000芯片点样仪和MALDI-TOF质谱仪(Agena MassARRAY Analyzer 4.0)(美国Sequenom公司)。

1.3 方法

1.3.1 样本采集及新生儿疾病筛查:按照国家卫生健康委员会新生儿疾病筛查样本采集技术规范,采集新生儿足底末梢血4滴,滴于专用的滤纸片上自然晾干,采用冷链运输的方式在3个工作日内将滤纸干血片送至筛查中心。干血片经有机溶剂萃取后,应用TQD串联质谱仪进行检测,分析样本的琥珀酰丙酮、氨基酸和酰基肉碱浓度。

1.3.2 IVD基因突变筛查:本研究结合国内外已报道的文献、基因突变数据库与同行交流合作的经验,选择30种IVD基因突变作为MassARRAY技术的检测位点,具体包括c.39G>A(p.W13X),c.145C>T(p.Q49*),c.149G>A(p.R21H),c.153+1G>T,c.157C>T(p.R53C),c.158G>A(p.R53H),c.158G>T(p.R53L),c.214G>A(p.D72N),c.356C>T(p.S119F),c.359G>A(p.R120Q),c.395A>G(p.H132R),c.458T>C(p.L153P),c.466-1G>T,c.466-3_466-2CA>GG,c.476G>C(p.G159A),c.499A>G(p.M167V),c.597C>G(p.I199M),c.640A>G(p.T214A),c.740G>A(p.G247E),c.832G>C(p.V278L),c.841A>G(p.S281G),c.1016G>A(p.C339Y),c.1039G>A(p.A347T),c.1076A>G(p.D359G),c.1144T>G(p.F382V),c.1199A>G(p.Y371C),c.1183C>G(p.R395G),c.1193G>A(p.R398Q),c.1195G>C(p.D399H)和c.1208A>G(p.Y403C)。检测流程如下:首先依照提取试剂盒说明书提取AISO-C5增高样本的基因组DNA,同时应用自动化紫外分光光度计对提取的DNA进行定量和稀释;然后采用Verity仪器进行PCR扩增,扩增产物用虾碱性磷酸酶处理以去除体系中游离的脱氧核苷三磷酸(dNTPs),进行针对突变的单一碱基延伸反应;最后依据Agena iPLEX操作手册进行所有反应试剂的配置与温度条件的设定,设定质谱范围在4 300~9 400 Da之间,应用芯片点样仪将最终反应产物点到芯片上供质谱仪检测,使用配套分析软件Typer4.0对检测结果进行分析与判读。

1.3.3 基因诊断:采用高通量测序技术对疑似IVA的新生儿进行检测,对检测到的相关致病突变进行

Sanger 测序验证, 基因检测的具体流程见文献 [9] 报道。若检出两个致病基因突变并确认突变遗传自父母, 则诊断为 IVA 阳性患儿。

2 结果

2.1 检测结果 研究期间共有 132 例新生儿表现为 AISO-C5 浓度升高, 采用传统筛查规则需召回 132 例新生儿, 召回复查阳性人数 20 例, 经高通量测序诊断 1 例为 IVA 患者, 因此 IVA 的阳性预测值为 0.76%。此外, 3 例新生儿被诊断为 2-MBAD 患者。联合应用 MassARRAY 技术进行基因突变筛查后, 仅 5 例新生儿结果异常, 进一步的基因诊断证

实 4 例新生儿为 IVA 携带者, 1 例新生儿为 IVA 患者, 因此 IVA 的阳性预测值提高至 20%。

2.2 确诊患儿资料 4 例确诊患儿的生化与基因检测结果见表 1。共确诊 1 例 IVA 患者和 3 例 2-MBAD 患者, 所有患者的新生儿筛查和召回复查结果均显示 AISO-C5 浓度升高。1 例 IVA 患者携带 IVD 基因 c.499A > G (p.M167V) 和 c.1208A > G (p.Y403C) 复合杂合突变, 3 例 2-MBAD 患者均携带 ACADSB 基因 c.1165A > G (p.M389V) 纯合突变。Sanger 测序验证所有患者的突变都遗传自父母双方。

表 1 4 例确诊患儿的生化与基因检测结果

病例	确诊疾病	性别	AISO-C5 (μ mol/L)		突变基因	基因型
			筛查浓度	召回浓度		
1	IVA	男	0.55	0.45	IVD	c.499A > G (p.M167V) c.1208A > G (p.Y403C)
2	2-MBAD	女	0.51	0.4	ACADSB	c.1165A > G (p.M389V) c.1165A > G (p.M389V)
3	2-MBAD	男	0.67	0.59	ACADSB	c.1165A > G (p.M389V) c.1165A > G (p.M389V)
4	2-MBAD	男	1.16	1.11	ACADSB	c.1165A > G (p.M389V) c.1165A > G (p.M389V)

注: AISO-C5 参考范围 0.03 ~ 0.35 μ mol/L。

3 讨论

优生优育是我国基本国策, 是关系我国人口素质提高和中华民族复兴的重要课题。据全国出生缺陷监测统计资料表明, 我国每年新增出生缺陷病例总数约 90 万例, 其中出生时临床明显可见的患儿约有 25 万例, 出生缺陷已成为日益严重的公共卫生问题。新生儿疾病筛查是出生缺陷第三级预防的主要措施, 是预防出生缺陷的最后一道防线, 对出生缺陷的防控尤为重要。我国新生儿疾病筛查起始于 1981 年, 迄今为止已有 40 多年的历史。近年来, 串联质谱技术应用于新生儿筛查已在世界范围内得到广泛认可, 并在国内被积极推广应用。

异戊酸血症 (IVA) 是第一个被报道的常染色体隐性遗传有机酸血症, 会导致患者出现严重的临床症状, 死亡率较高。预防的关键在于早期筛查和诊断, 并进行及时的干预治疗。2006 年, 美国推荐将 IVA 纳入新生儿疾病筛查目录, 该病也是全世界大多数筛查机构规定的筛查病种。IVA 的发病率在不同种族或国家有明显差异, 据文献报道美国的发病率约为 1:250 000, 德国约为 1:62 500, 我国台湾约为 1:365 000, 我国浙江省约为 1:234 000^[9-11]。虽然我国基于串联质谱技术的新生儿疾病筛查起步较晚, 多数发达城市也已普遍开展 IVA 的新生儿筛查, 但 AISO-C5 并非特异性的筛查指标, IVA 新生儿筛查一直面临着假阳性率偏高的严峻挑战, 需结合尿有机酸分析及基因检测进行进一步的鉴别

诊断。

针对 IVA 筛查的假阳性问题, 国外研究表明通过应用分辨率更高的超高效液相色谱串联质谱技术可以实现对 AISO-C5 相关同分异构体的鉴别诊断, 从而提高 IVA 的筛查效率^[12-13]。然而, 超高效液相色谱串联质谱仪器昂贵、操作相对繁琐, 而且部分轻型和非典型患者很难被检出, 因此该技术在国内外尚未被推广应用。本研究总结分析了 IVA 新生儿串联质谱法和相关基因突变的检测情况, 研究表明应用 MassARRAY 技术进行基因突变筛查可以排除 96.21% (127/132) 的 AISO-C5 假阳性样本, 将 IVA 的阳性预测值提高至 20%, 因此可以明显提高 IVA 的新生儿筛查效率。值得注意的是, 虽然有 3 例 2-MBAD 无法通过基因突变筛查检出, 但 2-MBAD 是一种良性的有机酸代谢病, 通过新生儿筛查诊断的患儿并无明显临床症状, 是否将其纳入新生儿筛查病种尚存争议。该病可能只是一种生化表型而非疾病, 因此国外很多筛查机构不建议将其纳入新生儿筛查病种^[14]。

传统串联质谱筛查属于生化筛查, 筛查结果存在一定的假阳性及假阴性。基因突变筛查有一定的优越性, 可作为串联质谱筛查的有效补充, 但基因结果应结合生化检测结果进行综合判断, 并不能直接代替串联质谱筛查。本研究的基因突变位点筛查也存在一定的局限性, 尽管应用该技术可以检测 30 种东亚人群常见的 IVD 基因突变, 但仍会有少部分

患者由于携带低频突变或新突变而漏筛。因此可以通过多种技术相结合的方式来提高新生儿疾病筛查的效率,这样才能在新生儿期筛查出更多的遗传代谢病,达到早诊断、早治疗的三级预防目的,从而降低遗传代谢病患者的死亡率及残疾率。

综上所述,IVA是一种严重威胁儿童健康的遗传代谢病,新生儿期发病的患儿病情危重,死亡率较高,早期诊断和及时治疗尤为重要。然而,IVA新生儿筛查一直存在假阳性偏高的问题,这不仅会明显增加医疗费用,还给家属带来了极大的心理负担。本研究表明联合应用MassARRAY技术进行IVD基因突变筛查可以提高IVA的筛查效率,该策略的实施可以减轻不必要的召回负担和家长的焦虑,为IVA的早期筛查、精确诊断与辅助治疗提供可靠的途径与依据,对出生缺陷防治具有重要意义。

参考文献:

- [1] LI Yanhan, SHEN Ming, JIN Ying, et al. Eight novel mutations detected from eight Chinese patients with isovaleric acidemia[J]. Clinica Chimica Acta, 2019, 498: 116-121.
- [2] SZYMAŃSKA E, JEZELA-STANEK A, BOGDAŃSKA A, et al. Long term follow-up of polish patients with isovaleric aciduria. Clinical and Molecular Delineation of Isovaleric Aciduria[J]. Diagnostics (Basel), 2020, 10(10):738.
- [3] MÜTZE U, HENZE L, GLEICH F, et al. Newborn screening and disease variants predict neurological outcome in isovaleric aciduria[J]. Journal of Inherited Metabolic Disease, 2021, 44(4): 857-870.
- [4] 钟锦平, 傅清流, 林壹明. 福建省泉州地区新生儿有机酸血症的发病率与疾病谱筛查结果分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(5):52-55.
ZHONG Jinping, FU Qingliu, LIN Yiming. Systematic analysis of the incidence and disease spectrum of organic acidemia newborn screening results in Quanzhou, Fujian Province[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(5):52-55.
- [5] 钟锦平, 彭维林, 傅清流, 等. 福建泉州地区新生儿氨基酸代谢障碍的筛查结果分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(4):41-44, 78.
ZHONG Jinping, PENG Weilin, FU Qingliu et al. Retrospective analysis of the neonatal screening results of amino acid disorders in Quanzhou Region, Fujian Province [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(4):41-44, 78.
- [6] 刘芙蓉, 王兴, 孙小红, 等. 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 [J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33 (2): 31-34, 37.
- [7] LIU Furong, WANG Xing, SUN Xiaohong, et al. Investigation on the medical reference range of the normal neonates with the amino Acid and Acyl carnitine tandem mass spectrometry in Gansu Province [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(2):31-34,37.
- [8] SCHLUNE A, RIEDERER A, MAYATEPEK E, et al. Aspects of newborn screening in isovaleric acidemia[J]. International Journal of Neonatal Screening, 2018, 4(1): 7.
- [9] LIN Yiming, GAO Hongzhi, LIN Chunmei, et al. Biochemical, clinical, and genetic characteristics of short/branched chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Chinese patients by newborn screening[J]. Front Genet, 2019, 10:802.
- [10] 胡真真, 杨建滨, 胡凌微, 等. 浙江省新生儿异戊酸血症筛查及临床分析 [J]. 浙江大学学报 (医学版), 2020, 49(5):556-564.
HU Zhenzhen, YANG Jianbin, HU Lingwei, et al. Screening and clinical analysis of isovaleric acidemia newborn in Zhejiang Province [J]. Journal of Zhejiang University (Medical Sciences), 2020, 49(5):556-564.
- [11] WU Fang, FAN Sujuan, ZHOU Xihui. Neonatal isovaleric acidemia in China: A case report and review of literature[J]. World Journal of Clinical Cases, 2021, 9(2): 436-444.
- [12] CARLING R S, BURDEN D, HUTTON I, et al. Introduction of a simple second tier screening test for AISO-C5 isobars in dried blood spots: reducing the false positive rate for isovaleric acidemia in expanded newborn screening[J]. JIMD Reports, 2018, 38: 75-80.
- [13] MINKLER P E, STOLL M S K, INGALLS S T, et al. Selective and accurate AISO-C5 acylcarnitine quantitation by UHPLC-MS/MS: Distinguishing true isovaleric acidemia from pivalate derived interference[J]. Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2017, 1061-1062: 128-133.
- [14] PORTA F, CHIESA N, MARTINELLI D, et al. Clinical, biochemical, and molecular spectrum of short/branched-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency: two new cases and review of literature[J]. Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism, 2019, 32(2): 101-108.

收稿日期:2021-08-10

修回日期:2022-02-22