

文章编号: 1673-8640 (2019) 06-0479-07 中图分类号: R446-1 文献标志码: A DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2019.06.001

编者按: 串联质谱 (MS/MS) 技术因其高通量、样本用量少、分析速度快、敏感性高、结果可靠等优点, 被广泛用于生物、医药、食品、临床、环境等领域。采用 MS/MS 技术筛查新生儿遗传代谢病, 不仅扩大了筛查疾病的种类, 还提高了筛查效率。中国医师协会检验医师分会临床质谱检验医学专业委员会结合目前已公布的 MS/MS 技术相关指南、文献及实际操作经验撰写的“MS/MS 技术在新生儿氨基酸、有机酸及脂肪酸氧化代谢障碍性疾病筛查中的应用共识”, 系统介绍了 MS/MS 技术在新生儿遗传代谢病筛查中的关键流程以及方法验证的关键因素, 旨在协助新生儿疾病筛查相关实验人员使用 MS/MS 技术检测新生儿滤纸干血片 (DBS) 中氨基酸、游离肉碱及酰基肉碱含量, 为筛查新生儿氨基酸、有机酸及脂肪酸氧化代谢障碍性疾病提供实验室依据。

MS/MS 技术在新生儿氨基酸、有机酸及脂肪酸氧化代谢障碍性疾病筛查中的应用共识

中国医师协会检验医师分会临床质谱检验医学专业委员会



扫一扫下载指南全文

新生儿疾病筛查是指在临床症状出现之前对一些危害严重的先天性疾病、遗传性疾病进行的实验室诊断, 以便及早发现、及早治疗, 避免患儿出现机体功能障碍和不可逆的损伤, 降低婴儿残疾率和死亡率。新生儿疾病筛查最早可以追溯到 1961 年美国 Guthrie 博士建立的细菌抑制法, 通过检测新生儿滤纸干血片 (dried blood spot, DBS) 中的苯丙氨酸 (phenylalanine, Phe) 浓度来筛查苯丙酮尿症 (phenylketonuria, PKU)。1975 年, 放射免疫法 (radioimmunoassay, RIA) 被用于检测新生儿 DBS 样本中的促甲状腺激素 (thyroid-stimulating hormone, TSH), 以筛查先天性甲状腺功能减低症 (congenital hypothyroidism, CH)。目前, 检测 Phe 的方法主要有荧光分析法和定量酶法; 检测 TSH 的方法主要有酶联免疫吸附法和时间分辨荧光免疫分析法等。但这些方法均是 1 次实验只能检测 1 种分析物, 筛查 1 种疾病。

近年来, 随着串联质谱 (tandem mass spectrometry, MS/MS) 技术的发展, 其敏感性和信噪比显著提高, 能在 2 min 内对 1 个样本进行数十种小分子物质的检测。MS/MS 技术于 20 世纪 90 年代初开始被用于新生儿遗传代谢病筛查, 通过同时检测多种氨基酸、游离肉碱、酰基

肉碱水平来筛查氨基酸、有机酸及脂肪酸氧化代谢障碍的遗传代谢病, 实现了从“1 次实验检测 1 种疾病”到“1 次实验检测多种疾病”的转变。2006 年, 美国医学遗传学会 (American College of Medical Genetics, ACMG) 建议对 29 种首选筛查疾病中的 20 种及 25 种次选筛查疾病中的 22 种采用 MS/MS 技术进行筛查^[1]。随着 MS/MS 技术的发展以及对疾病认识的深入和治疗方法的多样化, 一些当初暂不筛查的疾病, 如溶酶体贮积症、X-连锁肾上腺脑白质营养不良症已被纳入采用 MS/MS 技术进行筛查的范畴。目前可采用 MS/MS 技术筛查的遗传代谢病见表 1。

中国医师协会检验医师分会临床质谱检验医学专业委员会针对 MS/MS 技术在新生儿遗传代谢病筛查中的关键流程及方法验证的关键因素制定本共识, 旨在协助新生儿疾病筛查相关实验人员使用 MS/MS 技术检测新生儿 DBS 中氨基酸、游离肉碱和酰基肉碱水平, 用于新生儿氨基酸、有机酸及脂肪酸氧化代谢障碍性疾病的筛查。

1 MS/MS 技术在新生儿氨基酸、有机酸及脂肪酸氧化代谢障碍性疾病筛查中的应用规范

1.1 MS/MS 检测原理

质谱技术是通过质量分析器测定带电粒子质荷比的一种分析技术; MS/MS 是将 2 个质量分

通信作者: 曹 正, E-mail: zhengcao2011@hotmail.com。

表1 可采用MS/MS技术筛查的遗传代谢病^[2]

中文名称	英文全称	英文缩写	主要标志物	相关比例
氨基酸代谢病				
高苯丙氨酸血症	hyperphenylalaninemia	HPA	Phe	Phe/Tyr
枫糖尿病	maple syrup urine disease	MSUD	Leu+Ile、Val	Leu/Phe
氨甲酰磷酸合成酶缺乏症	carbamyl phosphate synthase deficiency	CPS	Cit	
鸟氨酸氨甲酰磷酸转移酶缺乏症	ornithine transcarbamylase deficiency	OTCD	Cit	
瓜氨酸血症 I 型	citrullinemia type I	CIT I	Cit	Cit/Arg
瓜氨酸血症 II 型 (希特林蛋白缺乏症)	citrullinemia type II (citrin deficiency)	CIT II	Cit	Cit/Arg
精氨酸琥珀酸尿症	argininosuccinic aciduria	ASA	Cit	
精氨酸血症	arginemia	ARG	Arg	
高鸟氨酸血症、高氨血症、同型瓜氨酸尿症综合征	hyperornithinemia、hyperammonemia、homocitrullinuria syndrome	HHH	Orn、Cit	
高鸟氨酸血症	hyperornithinemia	ORN	Orn	
同型半胱氨酸尿症	homocystinuria	HCY	Met	Met/Phe
高甲硫氨酸血症	hypermethioninemia	MET	Met	Met/Phe
酪氨酸血症 I 型	tyrosinemia type I	TYR I	Tyr、SUAC	Tyr/Cit
酪氨酸血症 II 型	tyrosinemia type II	TYR II	Tyr	Tyr/Cit
酪氨酸血症 III 型	tyrosinemia type III	TYR III	Tyr	Tyr/Cit
非酮性高甘氨酸血症	nonketotic hyperglycinemia	NKHG	Gly	
高脯氨酸血症	hyperprolinuria	PRO	Pro	
5-羟脯氨酸血症	5-oxprolinuria (pyroglutamic aciduria)	5-OPRO	Leu+Ile+ Pro-OH	
有机酸血症				
甲基丙二酸血症	methylmalonic acidemia	MMA	C3	C3/C2、C3/Met
丙酸血症	propionic acidemia	PA	C3	C3/C2
异戊酸血症	isovaleric acidemia	IVA	C5	C5/C2、C5/C3
戊二酸血症 I 型	glutaric acidemia type I	GA- I	C5-DC	C5-DC/C8
3-甲基巴豆酰辅酶A羧化酶缺乏症	3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency	3-MCC	C5-OH	C5-OH/C8
3-甲基戊烯二酰辅酶A水解酶缺乏症	3-methylglutaconyl-CoA hydratase deficiency	3-MGA	C5-OH	C5-OH/C3
3-羟-3-甲基戊二酰辅酶A裂解酶缺乏症	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency	HMG	C5-OH、 C6-DC	C5-OH/C3
全羧化酶合成酶缺乏症	holocarboxylase synthetase deficiency	HCS	C5-OH	C5-OH/C3
生物素酶缺乏症	biotinidase deficiency	BTD	C5-OH	C5-OH/C3
β-酮硫解酶缺乏症	beta-ketothiolase deficiency	BKD	C5: 1、 C5-OH	C5-OH/C3
丙二酸血症	malonic acidemia	MAL	C3-DC	C3-DC/C3
2-甲基丁酰辅酶A脱氢酶缺乏症	2-methylbutyryl-CoA dehydrogenase deficiency	2-MBD	C5	C5/C3
异丁酰辅酶A脱氢酶缺乏症	isobutyryl-CoA dehydrogenase deficiency	IBD	C4	C4/C3
2-甲基-3-羟基丁酰辅酶A脱氢酶缺乏症	2-methyl-3-hydroxybutyryl CoA dehydrogenase deficiency	MHBD	C5-OH	C5-OH/C3
脂肪酸氧化代谢障碍性疾病				
原发性肉碱缺乏症	primary carnitine deficiency	PCD	C0	
肉碱棕榈酰转移酶 I 缺乏症	carnitine palmitoyl transferase deficiency type I	CPT- I	C0	C0 / (C16 + C18)
肉碱棕榈酰转移酶 II 缺乏症	carnitine palmitoyl transferase deficiency type II、	CPT- II	C16、C18: 1、 C18: 2、 C18	C0 / (C16 + C18)

续表1

中文名称	英文全称	英文缩写	主要标志物	相关比例
肉碱/酰基肉碱移位酶缺乏症	carnitine/acylcarnitine translocase deficiency	CACT	C16、C18: 1、 C18: 2、 C18	C0/(C16+C18)
短链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症	short chain acyl CoA dehydrogenase deficiency	SCAD	C4	C4/C3
中链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症	medium chain acyl CoA dehydrogenase deficiency	MCAD	C8、C10: 1	C8/C10
极长链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症	very long chain acyl CoA dehydrogenase deficiency	VLCAD	C14: 1、C14: 2、 C14	C14: 1/C12: 1、 C14: 1/C16
短链羟酰基辅酶A脱氢酶缺乏症	short chain hydroxyacyl CoA dehydrogenase deficiency	SCHAD	C4-OH	
长链羟酰基辅酶A脱氢酶缺乏症	long chain hydroxyacyl CoA dehydrogenase deficiency	LCHAD	C14-OH、 C16-OH、 C18-OH、 C18: 1-OH	C16-OH/C16
多种酰基辅酶A脱氢酶缺乏症	multiple acyl CoA dehydrogenase deficiency	MADD	C4-C18	
2、4-二烯酰辅酶A脱氢酶缺乏症	2、4-dienoyl-CoA reductase deficiency	De-Red	C10: 2	C10: 2/C10
三功能蛋白缺乏症	trifunctional protein deficiency	TFP	C14-OH、C16- OH、C18-OH、 C18: 1-OH	C16-OH/C16
中链3-酮酰基辅酶A硫解酶缺乏症	medium chain 3-keto acyl CoA thiolase deficiency	MCKAT	C3DC、C6DC、 C8DC	
乙基丙二酸脑病	ethylmalonic encephalopathy	EE	C4、C5	

注: Leu为亮氨酸 (leucine); Ile为异亮氨酸 (isoleucine); Val为缬氨酸 (valine); Cit为瓜氨酸 (citrulline); Arg为精氨酸 (arginine); Orn为鸟氨酸 (ornithine); Met为甲硫氨酸 (methionine); Tyr为酪氨酸 (tyrosine); SUAC为琥珀酰丙酮 (succinylacetone); Gly为甘氨酸 (glycine); Pro为脯氨酸 (proline); C3为丙酰肉碱 (propionylcarnitine); C5为异戊酰肉碱 (isovaleryl carnitine); C5-DC为戊二酰肉碱 (glutaryl carnitine); C5-OH为3-羟基异戊酰肉碱 (3-hydroxyisovaleryl carnitine); C6-DC为己二酰肉碱 (adipyl carnitine); C5: 1为异戊烯酰肉碱 (tiglylcarnitine); C3-DC为丙二酰肉碱 (malonylcarnitine); C4为丁酰肉碱 (butyrylcarnitine); C0为游离肉碱 (free carnitine); C16为棕榈酰肉碱 (palmitoylcarnitine); C18: 1为十八碳烯酰肉碱 (octadecen oylcarnitine); C18: 2为十八碳二烯酰肉碱 (linoleylcarnitine); C18为十八碳酰肉碱 (octadecanoylcarnitine); C8为辛酰肉碱 (octanoylcarnitine); C10: 1为癸烯酰肉碱 (decenoylcarnitine); C14: 1为肉豆蔻烯酰肉碱 (tetradecenoylcarnitine); C14: 2为肉豆蔻二烯酰肉碱 (tetradecadienoylcarnitine); C14为肉豆蔻酰肉碱 (myristoylcarnitine); C4-OH为3-羟基丁酰肉碱 (3-hydroxybutyrylcarnitine); C14-OH为3-羟基肉豆蔻酰肉碱 (3-hydroxymyristoylcarnitine); C16-OH为3-羟基棕榈酰肉碱 (3-hydroxypalmitoylcarnitine); C18-OH为3-羟基十八碳酰肉碱 (3-hydroxystearoylcarnitine); C18: 1-OH为3-羟基十八碳烯酰肉碱 (3-hydroxyoleylcarnitine); C10: 2为癸二烯酰肉碱 (decadienoylcarnitine)

析器由碰撞室串接起来的分析设备,即三重四级杆质谱仪。第一级质量分析器筛选出被离子化的样本中特定质量的母离子/前体离子,母离子/前体离子进入碰撞室,通过碰撞诱导解离的方式形成子离子/产物离子;第二级质量分析器筛选出特定的子离子/产物离子,子离子/产物离子进入检测器,最终得到目标分析物的含量。每个母离子/子离子对被称为1个“质量通道”,只有具有特定“质量通道”的待测物质,才能进入检测器。因此,MS/MS具有很好的检测特异性。

1.2 MS/MS检测氨基酸、游离肉碱及酰基肉碱的方法

1.2.1 衍生法 衍生法是在新生儿DBS样本中加入内标萃取液,将氨基酸、游离肉碱和酰基肉碱提取出来,与正丁醇在酸性条件下形成丁基酯衍生物,在MS/MS碰撞诱导解离作用下,多数氨基酸会产生相对分子质量为102的中性碎片丢失,可采用中性丢失扫描或多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 扫描方式,定量检测氨基酸含量;酰基肉碱会产生相对分子质量为85的特征碎片离子,可采用母离

子扫描或MRM扫描方式，定量检测酰基肉碱含量。

1.2.2 非衍生法 非衍生法使用含有内标的溶液将新生儿DBS样本进行萃取后，直接导入MS/MS仪，采用MRM扫描方式，定量检测氨基酸、游离肉碱及酰基肉碱含量。

1.3 对实验室的要求

MS/MS技术对场地环境的要求包括空间、温度、湿度、气体、电源及生物安全等，具体要求可参照中华医学会检验医学分会和国家卫生健康委临床检验中心2017年联合发布的《液相色谱-质谱临床应用建议》^[3]。

由于新生儿疾病筛查与常规临床检验相比有其特殊性，建议使用经国家食品药品监督管理局批准上市的MS/MS仪器及试剂，以保证新生儿筛查结果的可靠性和可追溯性。

1.4 DBS样本的采集、保存及递送流程^[4]

血片采集是新生儿遗传代谢病筛查过程中最重要的环节。采血质量可直接影响实验室检测结果，必须严格按照以下要求完成血片的采集、保存及递送工作。

1.4.1 采血人员要求 各级新生儿疾病筛查机构负责人及血液样本采集人员在上岗前必须进行新生儿疾病筛查中心认可的业务培训，考核合格后方可上岗。

1.4.2 血液样本采集前的准备工作 各单位必须建立新生儿疾病筛查登记制度，记录采血卡片编号、产妇姓名及住院号、出生时间、采血时间、采血人、联系地址、邮编、电话、样本送出时间及特殊情况记录等；按卡片内容逐项、认真录入每项内容；采血前应将筛查的目的、意义、病种、方式、费用等情况如实告知新生儿监护人，并取得书面同意。

1.4.3 血液样本采集 正常血液样本采集要求在新生儿出生72 h~7 d，且充分哺乳后进行（哺乳至少8次），如新生儿因特殊原因（早产、低体重等）未采血，采血单位应详细记录，并发放补采血通知。采血部位宜选择足跟内、外侧缘。采血人应清洗双手，佩戴无滑石粉手套，用75%乙醇消毒采血部位，待乙醇自然挥发或用无菌棉球擦掉多余乙醇后开始采血。采血时使用一次性采血针刺足跟，刺入深度<3 mm，用消

毒过的干棉球擦掉第1滴血，取第2滴血，将滤纸片接触血滴，使血自然渗透至滤纸背面，共需3个血斑（血斑直径>8 mm）。禁止在1个圆圈处反复多次浸血。采血后用无菌棉球轻压采血部位止血，胶布固定。应将新生儿疾病筛查采集卡填写完整后发给家属，并由家属签字确认。

1.4.4 DBS样本干燥及保存 将血片置于清洁空气中3~4 h，避免阳光直晒，待血片自然干燥后放入封口塑料袋，保存于4℃冰箱中，此样本即为DBS样本。

1.4.5 样本递送 采血单位应于采血后5个工作日内将DBS样本递送至新生儿疾病筛查中心，尽量减少血片在室温中存留的时间，夏季高温时应“冷链”运送。

1.4.6 样本接收和拒收制度 实验室应制定DBS样本接收和拒收制度。不合格样本（血斑直径<8 mm，采血时间不足出生后72 h或未充分哺乳，血滴未完全浸透滤纸正反两面，血样采集后因保管不当造成污染、不溶等）应退回采血机构，重新采集，并且在规定时间内送至新生儿疾病筛查中心。

1.5 样本制备流程

样本制备方法分为衍生法和非衍生法。在制备样本前，首先根据当天的待测样本量准备MS/MS检测工作单。根据工作单准备试剂、质控品及待测样本。使用自动或手动打孔器将DBS样本打3 mm孔，置于96孔板内。建议将每个96孔板中前2~4个孔用于空白对照（仅添加含内标的日常工作萃取液），并根据试剂盒的操作流程制备样本。日常工作萃取液应现配现用。样本制备好后，将96孔板置于自动进样器中，启动程序，创建工作列表，选择合适的数据采集方法，运行测试。

1.6 实验数据处理

根据待测样本中氨基酸和酰基肉碱各指标及对应内标的响应强度、内标浓度、相对响应因子计算目标分析物的浓度。计算公式为： $C_{\text{分析物}} = I_{\text{分析物}} \times V_{\text{分析物}} \times C_{\text{IS}} / (I_{\text{IS}} \times V_{\text{PS}} \times RRF)$ 。式中 $C_{\text{分析物}}$ 为氨基酸或酰基肉碱的浓度（ $\mu\text{mol/L}$ ）， $I_{\text{分析物}}$ 为氨基酸或酰基肉碱的响应强度（CPS）， $V_{\text{分析物}}$ 为氨基酸或酰基肉碱的提取量（ μL ）， C_{IS} 为内标的浓度（ $\mu\text{mol/L}$ ）， I_{IS}

为内标的响应强度 (CPS), V_{PS} 为 1 个 3 mm 血斑的含血量 (μL), RRF 为相对响应因子。

建议实验室检查每个样本的色谱峰 (出峰时间、TIC 信号等) 是否正常、内标响应强度是否在规定范围内 [建议根据实验室连续 1 个月的检测结果制定靶值及合理的变异系数 (coefficient of variation, CV)、质控是否在控 (建议各实验室建立自己实验室的室内质控范围及质控规则, 用于随机误差和系统误差的监控) [5]。实验结果异常的样本应复查。质控失控时, 应进行失控原因分析, 并评估对样本结果的影响, 必要时应对该批次样本重新处理、检测。

1.7 MS/MS 检测报告的解读

MS/MS 技术通过 1 次实验得到数十个目标分析物和相应的浓度比值结果, 既有 1 个指标对应 1 种疾病或多种疾病, 也有多个指标对应 1 种疾病或多个指标对应多种疾病的情况。因此, MS/MS 检测指标 (氨基酸、游离肉碱、酰基肉碱及其对应的浓度比值) 结果正常时, 实验室可发正常报告; 而对于异常指标的报告, 建议实验室联合临床医师结合临床实际, 共同出具正常或提示可能患某种疾病的报告, 并通知家属尽快带新生儿复查。

1.8 数据备份及保存

实验室检测原始数据及资料信息应定期进行安全备份, 并与互联网物理隔离, 存档至少 10 年 [4]。

2 MS/MS 方法学的建立及验证

检测项目、方法、仪器系统在用于检测之前, 实验室相关人员应仔细阅读试剂及仪器说明书, 获取相关的方法验证材料, 做好性能评估方案, 评估内容建议至少包含基质效应、精密度、准确度及携带效应等。完成性能评估后, 需撰写性能评估报告。检测系统完成方法学性能综合评估后, 需经过批准后方可投入使用。在项目开展后, 需根据实际情况定期进行方法学性能核查 (建议至少 1 次/年), 确保检测方法整体性能稳定, 可满足临床检测要求。当检测项目发生检测系统变更时 (如新设备、试剂厂家更换、试剂换代、实验室搬迁等), 需重新进行方法学性能验证。本共识的方法学验证方案参考了美国临床实验室标准化协会

(the Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) C62-A、C50-A 和 EP28-A3C 文件 [6-8]。

2.1 筛查方法的建立

取 1 个 DBS 样本 (3 mm), 置于 96 孔板中, 每孔加入含氨基酸和酰基肉碱同位素内标的无水甲醇 100 μL , 室温放置 30 min, 提取血片中的氨基酸和酰基肉碱, 然后转移至另一个 96 孔板中。非衍生法可直接取 20 μL 进样, 进行流动注射 MS/MS 分析; 衍生法需要将提取液用氮气吹干或减压离心至干燥, 加入 60 μL 正丁醇 (含 3 mol/L HCl), 密封, 孵育 2 h 进行衍生化, 衍生化后的溶液再经氮气吹干或减压离心至干燥后, 用 100 μL 流动相溶解残渣, 取 20 μL 进样, 进行流动注射 MS/MS 分析。MS/MS 分析中液相色谱所用的流动相必须有水相和有机相, 水相必须是去离子水, 有机相可以是甲醇或乙腈, 其纯度需要与质谱相匹配。MS/MS 分析中常用电喷雾离子源 (electrospray ionization, ESI), 主要采用 3 种扫描模式: 母离子扫描、中性丢失扫描和 MRM 扫描。母离子扫描中, 第二级质谱选择特征碎片离子, 扫描检测第一级质谱中能产生该碎片的母离子, 主要用于酰基肉碱的检测。酰基肉碱可产生相对分子质量为 85 的相同碎片离子。在中性丢失扫描中, 两级质谱同时扫描, 二者始终保持固定的质量差, 只有满足固定质量差的离子才会被检测到, 该扫描方式主要用于氨基酸的检测。大多数氨基酸会产生相对分子质量为 102 的中性碎片丢失。MRM 扫描是第一级质谱选择多个特征离子 (母离子), 经过碰撞解离, 第二级质谱再进行选择离子检测, 只有母离子/子离子均符合指定条件的离子才能被检测到。对于新生儿 DBS 样本复杂、干扰组分多、检测分析物种类相对固定的特点, MRM 是最好的扫描方式。

2.2 方法学验证

2.2.1 基质效应实验 MS/MS 将 DBS 洗脱液直接注入 MS/MS 离子源中, 可能会将血液或滤纸上的杂质引入 MS/MS, 导致离子抑制, 降低结果的准确性, 而且 MS/MS 1 次检测的目标分析物可达数十种, 因此评估基质效应是 MS/MS 方法验证的关键。应分别评估每个 “质量通道” (包括内标) 的基质效应。评估基质效应的影

响程度时应参考方法的允许总误差 (total error, TEa) 限值, TEa 包括不精密度、偏移和干扰。建议比较至少 5 个天然样本 (如新生儿样本) 提取后添加标准品与纯溶液 (如流动相) 添加标准品的信号比例。也可以采用混合试验或柱后流动注射评价基质效应^[9]。

2.2.2 精密度验证 精密度验证的具体要求参照中国医师协会检验医师分会临床质谱检验医学专业委员会发布的《液相色谱串联质谱临床检测方法的开发与验证》^[9]。在新生儿筛查 MS/MS 分析中, 不同待测物批内不精密度的 CV 范围为 15% ~ 25%, 批间不精密度的 CV 范围为 20% ~ 35%^[10-11]。

2.2.3 正确度验证 正确度验证的具体要求参照中国医师协会检验医师分会临床质谱检验医学专业委员会发布的《液相色谱串联质谱临床检测方法的开发与验证》^[9]。新生儿筛查 MS/MS 分析的正确度验证可以采用我国国家卫生健康委临床检验中心 (the National Center for Clinical Laboratories, NCCL) 和美国疾病预防控制中心 (the Centers for Disease Control and Prevention, CDC) 发放的室间质量评价 (external quality assessment, EQA) /能力验证 (proficiency test, PT) 计划的材料。

2.2.4 残留 残留是指分析高浓度样本的效应在后面的样本上产生的反应。MS/MS 分析中最常见的残留源是自动进样器注射口和连接 MS/MS 电离针的管道。在确定残留的过程中, 可选择高浓度样本和空白滤纸 (无血滤纸), 采取交替进样方式比较空白滤纸的检测结果。具体要求参照中国医师协会检验医师分会临床质谱检验医学专业委员会发布的《液相色谱串联质谱临床检测方法的开发与验证》^[9]。

2.2.5 认证 认证是为了确认检验的性能特征 (正确度和精密度等)。认证程序的材料包括先前测试的样本、适合的参考材料、校准器以及空白材料, 且必须使用 DBS 基质, 认证程序应每 6 个月执行 1 次。

2.2.6 参考范围的建立与回顾 在项目开展之初, 需建立实验室参考区间。募集足够的可能参考个体, 在其知情同意后筛选参考个体 (建议筛选胎龄 > 37 周、体重 > 2 500 g 的新生儿) 组成参考

样本组, 样本数量建议 > 20 000 例。对所有检测指标的结果进行百分位数统计分析, 取第 97.5 百分位 ~ 第 99.9 百分位作为参考区间上限, 第 2.5 百分位 ~ 第 0.1 百分位作为参考区间下限。应通过比较文献或其他实验室使用相同仪器和方法获得的数据来确定计算得到的参考区间是否恰当。应注意的是, 新生儿的参考区间与非新生儿的参考区间有较大差异, 因此召回婴儿或临床患儿的日龄若已经超过 28 d, 就不能用新生儿的参考区间进行评价, 需要用非新生儿的参考区间进行评价。每个采用 MS/MS 技术进行遗传代谢病筛查的实验室需要有新生儿及非新生儿 2 个参考区间。

3 质量控制

3.1 室内质量控制的要求

室内质量控制参照《临床检验质量控制技术》^[12]及《临床实验室定量测定室内质量控制指南》^[13]执行。

3.2 EQA 要求^[14]

3.2.1 EQA 的参报要求 实验室应根据实际情况积极参与外部机构提供的 EQA 计划。首选国内外权威组织的 EQA 计划。建议参加我国 NCCL 和美国 CDC 的 EQA/PT 计划。

3.2.2 EQA/PT 样本的检测 实验室应由固定的操作人员将 EQA/PT 样本按与新生儿样本相同的操作流程和方法进行检测。

3.2.3 EQA 结果的评价 通过比较实验室的测定值与可接受范围比较来判断 EQA 是否合格。通常情况下, 对单个检测项目的评价为: 本次某项目 EQA 得分 = (某项目测定结果可接受样本数 / 某项目样本总数) × 100, 该项目得分 ≥ 80 分为合格。对所有项目的评价为: 本次所有项目 EQA 得分 = (所有项目测定结果可接受样本数 / 样本总数) × 100, 所有项目得分均 ≥ 80 分为合格。如果实验室得分 < 80 分, 则认为本次 EQA 成绩不合格, 实验室需评估实验操作过程, 探讨可能的原因并予以纠正。

4 其他相关要求

4.1 检验人员要求

实验室应制定 MS/MS 操作、检测、维护等人员的岗位要求, 相关人员应具备分析化学、临床检验等相关的教育背景, 经过 MS/MS 操作培训并通过相应的技能考核, 以证明相关人员

掌握的理论知识、实际技能及经验与所承担的工作相适应。培训可采用上岗前教育、内部及外部培训、能力评估及继续教育等方式。

4.2 信息化管理

实验室应建立科学的新生儿疾病筛查计算机管理系统^[4], 规定计算机的使用权限、用户密码和维护要求。收到样本后能迅速应用计算机管理系统输入数据、准备实验名单、进行数据分析、发出报告和追踪患儿。应定期备份MS/MS仪器的检测数据, 确保相关信息的安全。

5 结论

MS/MS技术于20世纪90年代初开始被应用于新生儿疾病的筛查, 主要是采用新生儿DBS检测数十种氨基酸、游离肉碱及酰基肉碱的水平, 筛查包括氨基酸、有机酸和脂肪酸氧化代谢障碍在内的40多种遗传代谢性疾病。随着MS/MS技术的发展和遗传代谢病认识的深入, MS/MS筛查的疾病种类将不断扩大。在采用MS/MS检测系统进行患者样本检测前应对其进行严格的性能验证; 在项目开展后, 需根据实际情况定期进行方法学性能核查(建议至少每年1次), 确保检测方法整体性能稳定, 能够满足临床检测要求。

执笔: 马志军(首都医科大学附属北京妇产医院检验科); 韩连书(上海交通大学医学院附属新华医院上海市儿科医学研究所小儿内分泌遗传科); 李水军(上海市徐汇区中心医院中心实验室); 沈敏(美康生物科技股份有限公司参考实验室); 程雅婷(广州金域检验医学中心临床质谱检测中心); 曹正(首都医科大学附属北京妇产医院检验科)

审阅、校验: 翟燕红(首都医科大学附属北京妇产医院检验科); 赵贞(美国康奈尔大学医学院病理与检验医学系); 张天娇(国家卫生健康委临床检验中心); 朱宇宁(浙江大学医学院附属妇产科医院检验科); 张钧(浙江大学附属邵逸夫医院检验科); 廖志雄(杭州中医院检验科); 李惠玲(首都医科大学附属北京朝阳医院毒化实验室); 田国力(上海市儿

童医院新生儿筛查中心); 蒋黎(四川省人民医院检验科); 程黎明(华中科技大学同济医学院附属同济医院检验科); 赵蓓蓓(广州金域检验医学中心临床质谱检测中心); 尹沛源(杭州汉库检验所); 杨鹤(美国Quest诊断-尼古拉斯研究所); 苏增留(美国Ameritox检验医学公司); 贾继明(北京和合医学诊断工程技术研究院); 刘华芬(迪安诊断凯莱谱精准检测公司); 李幽然(首都医科大学附属北京妇产医院检验科); 万智慧(首都医科大学附属北京妇产医院检验科)

参考文献

- [1] Newborn screening: toward a uniform screening panel and system[J]. Genet Med, 2006, 8 (Suppl 1): 1S-252S.
- [2] 顾学范. 临床遗传代谢病[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 370.
- [3] 中华医学会检验医学分会, 卫生计生委临床检验中心. 液相色谱-质谱临床应用建议[S]. 2017.
- [4] 卫生部. 新生儿疾病筛查技术规范[S]. 2010.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Metrological traceability and its implementation[S]. EP32-R, CLSI, 2006.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. Liquid chromatography-mass spectrometry methods[S]. C62-A, CLSI, 2014.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Mass spectrometry in the clinical laboratory: general principles and guidance[S]. C50-A, CLSI, 2007.
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory[S]. EP28-A3C, CLSI, 2010.
- [9] 中国医师协会检验医师分会临床质谱检验医学专业委员会. 液相色谱串联质谱临床检测方法的开发与验证[S]. 2019.
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures[S]. EP05-A3, CLSI, 2014.
- [11] Clinical and Laboratory Standards Institute. Preliminary evaluation of quantitative clinical laboratory measurement procedures[S]. EP10-A3, CLSI, 2014.
- [12] 王治国. 临床检验质量控制技术[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 197-290.
- [13] 王治国. 《临床实验室定量测定室内质量控制指南》简介[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30 (3): 254.
- [14] Clinical and Laboratory Standards Institute. Using proficiency testing to improve the clinical laboratory[S]. GP27-A2, CLSI, 2007.

(收稿日期: 2018-06-25)

(本文编辑: 龚晓霖)