

新生儿疾病串联质谱筛查技术专家共识



扫一扫下载指南原文

卫生部临床检验中心新生儿遗传代谢疾病筛查室间质量评价委员会

北京医院 国家老年医学中心 卫生部临床检验中心/北京市临床检验工程技术研究中心, 北京 100730

通信作者: 王治国, Email: zgwang@nccl.org.cn

【摘要】 串联质谱(TMS)技术已用于新生儿氨基酸代谢障碍、有机酸血症及脂肪酸氧化代谢障碍等遗传代谢病筛查,但各实验室技术参差不齐,缺乏统一标准。为了规范我国TMS新生儿筛查实验室与技术各环节,卫生部临床检验中心新生儿疾病筛查室间质评委员会组织专家,制定新生儿疾病串联质谱筛查技术专家共识,用以促进TMS技术在我国新筛中标准化和规范应用,提升技术水平与实验室能力。

【关键词】 串联质谱法; 婴儿, 新生, 疾病

基金项目: 国家重点研发计划“生殖健康及重大出生缺陷防控研究”重点专项(2017YFC1001700, 2017YFC1001703, 2017YFC1001704);重庆市科委社会与民生保障创新专项(Cstc2015shmszx120012);重庆市教委科学技术研究项目(KJQN201800409);国家自然科学基金(81870126)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2019.02.004

采用串联质谱技术(tandem mass spectrometry, TMS)检测新生儿滤纸干血片中数十种氨基酸、游离肉碱及酰基肉碱的水平,筛查氨基酸代谢障碍、有机酸血症及脂肪酸氧化代谢障碍等多种遗传代谢病,已广泛应用于新生儿出生缺陷的防治。为了规范我国利用串联质谱技术进行新生儿疾病筛查的实验室技术各环节,卫生部临床检验中心新生儿疾病筛查室间质评专家委员会组织专家,参照国内外最新文献与指南,制定本版新生儿疾病筛查串联质谱技术专家共识,用以督促各实验室加强质量管理,提供标准化的筛查服务,以促进串联质谱技术在新生儿疾病筛查中的规范应用^[1-3]。

一、串联质谱技术新生儿疾病筛查概况

(一)筛查实验过程

利用串联质谱技术对收集的婴儿足跟干血斑(dried blood spot, DBS)样本中的分析物进行检测。DBS样本中加入含有对应的内标的提取液,在适当的提取时间之后,转移提取物,去除残留DBS样本。提取液可被直接分析(非衍生化法)或经衍生化后再进行分析,以提高一些化合物检测的灵敏度。分析时,提取物经流动注射方式被引入到质谱仪并进行分析,无需对分析物进行前期层析分离。串联质

谱仪通过组合三台四极质量分析器对目标分析物(例如,氨基酸、酰基肉碱)进行检测,第一个四极杆质量分析器对目标分析物进行检测,第二个四极杆质量分析器对目标分析物进行碎裂处理,第三个四极杆质量分析器对目标分析物的碎片离子进行分类排列,这个过程被反复执行,从采样到完成检测的整个分析过程总时间一般不超过到2 min^[4-5]。

样本中分析物的浓度通过计算每个分析物和已知浓度的内标物之间的信号强度比率而得到。结果分析时通过关联每种目标分析物对应的疾病种类,进行综合分析。结果报告应简洁明了,同时注意时效性。

(二)工作流程

根据《新生儿疾病筛查管理办法》(卫生部令64号)及《新生儿疾病筛查技术规范》(2010版)的要求^[6-7],基于串联质谱技术的新生儿疾病筛查(newborn screening, NBS)工作必须在省、自治区、直辖市人民政府卫生行政部门指定的新生儿遗传代谢病筛查中心开展。实验室筛查工作流程符合规范要求,并制定从样本接收到报告解读及随访复查整个环节的标准操作流程,以便于对整个筛查流程进行监控,确保筛查质量(图1)^[8-10]。

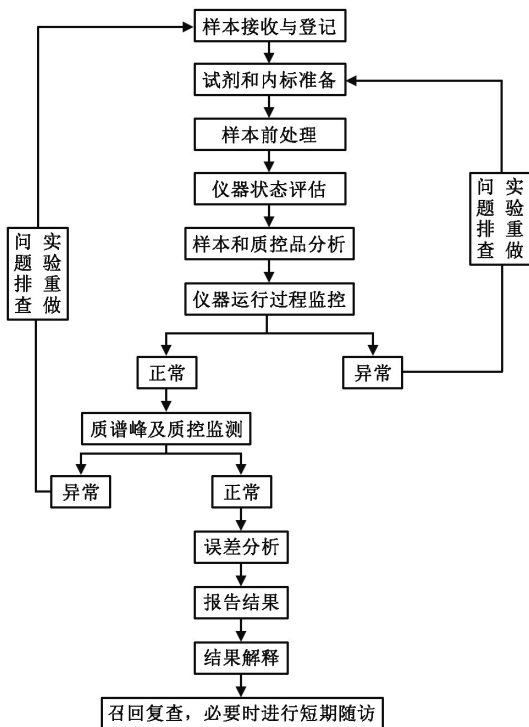


图1 串联质谱技术用于新生儿疾病筛查工作流程

二、试剂及内标

用于NBS的主要试剂须取得国家食品药品监督管理局的产品注册证^[11]。

(一) 试剂

1. 试剂要求：(1)所有试剂要求色谱级或以上级别；(2)实验室应建立商品化试剂的验收程序，并完成检验程序的确认和验证；(3)试剂应标明批号、储存条件和稳定性(有效期限)，建立使用记录及余量信息；(4)应根据健康和安全管理要求制定有毒有害物质处理程序，危化品保存与管理程序，填写相关记录文件，保护实验人员安全。

2. 试剂组成：筛查试剂由萃取试剂、流动相、衍生化试剂(衍生化法)、复溶试剂组成。(1)萃取试剂：纯甲醇或甲醇和水的混合物组成，添加(<1%)的有机酸(如乙酸或甲酸)以帮助分析物电离；(2)衍生化试剂：盐酸正丁醇，由正丁醇和乙酰氯按一定比例配制；(3)复溶试剂：主要成分为流动相，或类似流动相配比的混合液；(4)流动相：主要成分为乙腈或甲醇的溶液。以一定比例(例如20%)与水少量(<1%)有机酸如乙酸或甲酸混合。如果使用商品化试剂盒，则按说明书操作。

(二) 内标

采用分析指标的稳定同位素标记物作为内标，由相应的稳定同位素取代化学结构中的两个或多

个原子制备而成(表1)。当分析物没有相应的同位素内标时，可以用一个适当标记的接近类似物来替代，替代的内标应与被分析物存在至少2个质量单位的差异，以避免潜在的峰重叠(表1)^[9]。在选择内标时，应避免使用位于不稳定位置的氘标记内标(如-OH或-NH₂)。为避免加样误差，内标一般与萃取试剂混合后使用。

表1 常见目标分析物及内标品

待测分析物	同位素内标	待测分析物	近似同位素内标
Ala	d4-Ala	C3DC	d3-C4
Asp	d3-Asp	C4OH	d3-C4
Glu	d3-Glu	C4DC	d9-C5
Met	d3-Met	C5-OH	d9-C5
Phe	d6-Phe	C5:1	d9-C5
Tyr	¹³ C ₆ -Tyr	C5DC	d6-C5DC
Leu/Ile/Pro-OH	d3-Leu	C6OH	d6-C5DC
Pro	¹³ C ₅ -Pro	C6DC	d6-C5DC
Gly	¹⁵ N, ²⁻¹³ C-Gly	C8:1	d3-C8
Orn	d6-Orn	C10:1	d3-C10
Val	d8-Val	C10:2	d3-C10
Arg	d5-Arg	C12:1	d3-C12
Cit	d2-Cit	C14:1	d9-C14
SA	¹³ C ₅ -MPP ^a	C14:2	d9-C14
C0	d9-C0	C14-OH	d9-C14
C2	d3-C2	C16:1-OH	d3-C16
C3	d3-C3	C16:1	d3-C16
C4	d3-C4	C16-OH	d3-C16
C5	d9-C5	C18:1	d3-C18
C6	d3-C6	C18:2	d3-C18
C8	d3-C8	C18:1-OH	d3-C18
C10	d3-C10	C18-OH	d3-C18
C12	d3-C12	-	-
C14	d3-C14	-	-
C16	d3-C16	-	-
C18	d3-C18	-	-

注：^a示¹³C₅-MPP为琥珀酰丙酮(SA)衍生物3-(5甲基-1H-吡唑-3yl)丙酮(MPP)；-表示无待测分析物和近似同位素内标

三、样本处理

酰基肉碱和氨基酸均可以通过衍生化(酯化，主要是丁基酯)或非衍生(非酯化，游离酸)两种方法来分析，但两种方法实验流程不同，检测能力各异，实验室应综合考虑配套设施、安全防护及项目需求等情况进行合理选择^[12-13]。

(一) 衍生化法

衍生化法处理步骤：(1)准备包含内标的萃取溶液；(2)从干血斑样本上打出血斑(约3.2 mm)；

(3)将血斑置于96孔板中;(4)使用校准的移液器或液体处理装置,添加萃取溶液的等分试样到每孔,孵育合适时间;(5)贴上封片以减少蒸发,摇动孵育平板,使萃取溶液与血斑相互作用;(6)萃取后,将血斑洗脱液转移到干净耐热的96孔板上,留下剩余的血斑;(7)在通风橱中用氮气吹干或加热蒸发萃取溶液;(8)通过加入衍生化试剂,与吹干的代谢物进行反应;(9)封盖96孔板,并在合适的烘箱中或恒温孵育器中加热至约 $(62.5\pm 2.5)^{\circ}\text{C}$,孵育15 min;(10)取出96孔板,在 $45\sim 55^{\circ}\text{C}$ 用氮气吹干或蒸发衍生化试剂;但应避免吹干过度造成降解;(11)用复溶试剂溶解干燥的分析物,并密封96孔板;(12)将96孔板置于串联质谱仪自动进样器中进行后续分析。

(二)非衍生化法

非衍生化法处理步骤:(1)准备包含内标的萃取溶液;(2)从干血斑标本上打出血斑(3.2 mm);(3)将血斑置于96孔板中;(4)使用校准的移液器或液体处理装置,添加萃取溶液的等分试样到每孔,孵育合适时间;(5)贴上封片以减少蒸发,摇动孵育平板,孵育合适时间,使萃取溶液与血斑相互作用;(6)取出96孔板,每孔转移适量萃取液至新的耐热96孔微孔板,铝箔覆盖,以防挥发;(7)如果测试琥珀酰丙酮,含转移液的微孔板需静置至少2 h;(8)将96孔板置于串联质谱仪自动进样器中进行后续分析。

(三)检测指标设置

1. 基于串联质谱技术的新生儿疾病筛查中氨基酸、游离肉碱、酰基肉碱检查指标的设置见表2。

2. 串联质谱技术新生儿疾病筛查中设置检测指标相互间比值,可以提高对某些疾病诊断的准确性,相关比值的设置见表3。

四、仪器与方法^[14]

(一)仪器及软件选择

1. 仪器选择:用于NBS的检测仪器须取得国家食品药品监督管理总局的产品注册证。首选三重四极杆串联质谱仪,确保全离子扫描(Full-Scan,含中性丢失和前体离子检测)和选择离子扫描(Selected ion monitoring, SRM, 含子离子检测)方便配置和调用,能提供准确度高和重现性好的结果。选择串联质谱仪时,需考虑:(1)离子源主要考虑峰型、离子化效率、数据采集时间、检测效率、灵敏度等;(2)仪器容量主要考虑仪器检测能力,即每天可检测的标本量;(3)其他因素实验室偏好、成本等。

2. 软件选择:仪器应配备软件系统,实现数据快速分析。NBS专用软件应简化数据分析任务。系统软件需要:(1)控制分析仪器(即自动进样器、泵和质谱),收集样本数据,并计算多种分析物的浓度(或预测浓度);(2)将计算出的分析物浓度与设定的正常参考区间进行自动比较;(3)确定并显示超出正常参考区间的结果;(4)结果自动纳入含有患者信息的数据库;如果实验室信息系统不能执行这些任务,则可以通过离线软件完成;(5)允许快速计算单个样本以及批量计算分析样本的检测结果;(6)允许自动输出结果文件。

(二)数据采集模式选择

1. 全扫描采集模式:在全扫描采集模式下,串联质谱仪可检测给定质量范围内的所有质量数。包括脂肪酸氧化障碍及有机酸血症相关的分析物,如C0~C18-OH;氨基酸代谢异常相关的分析物,如Gly-Tyr。

游离酸和酯化的肉碱、酰基肉碱经衍生化反应,在质谱碰撞室可产生质荷比为85 m/z的产物离子。第一个质量分析仪扫描定义的m/z范围,第二个质量分析仪设置为只允许85 m/z产物离子到达检测器。丁基化(衍生的)氨基酸经历甲酸丁酯(102 m/z)的中性丢失。两个m/z分析仪同时扫描定义的m/z范围,在碰撞室反应期间失去102 m/z的氨基酸残基被检测到。如果氨基酸没有丁基化,中性丢失片段质荷比是46 m/z。

要实现一次采样同时检测肉碱、酰基肉碱和氨基酸,质谱仪必须在前体离子和中性丢失模式之间切换。扫描速度应不超过每秒100 m/z。特定产品离子的扫描时间应确保足够的灵敏度,并以50%的峰强度产生至少8次扫描(或数据点),将其平均值作为每个分析物的信号强度。实验室必要时可调整扫描时间,以便获得足够的数据点。

2. 选择反应监测模式:选择反应监测模式(SRM),用于定量检测前体离子/产物离子对所对应的特定分析物。在一般情况下,该分析物已明确为某种疾病的标志物。SRM模式下测定特定前体离子/产物离子对的停留时间需要保证足够的灵敏度。停留时间太短可能会导致灵敏度损失和信号噪声过大,停留时间太长会减少单个分析物的数据点。建议取50%以上峰强度下产生的至少8次扫描(或数据点),将其平均值作为每个分析物的信号强度。

(三)仪器校验

表 2 串联质谱技术新生儿疾病筛查氨基酸、游离肉碱、酰基肉碱等指标设置

名称	缩写	非衍生化质荷比[M+H] ⁺	衍生化质荷比[丁脂化+H] ⁺
丙氨酸	Ala	90.1	146.1
精氨酸	Arg	175.1	231.2
^a 天冬氨酸	Asp	134.1	246.1
瓜氨酸	Cit	176.1	232.1
^a 谷氨酸	Glu	148.1	260.2
甘氨酸	Gly	76.1	132.1
亮氨酸族 ¹	Xle ¹	132.1	188.2
甲硫氨酸	Met	150.1	206.1
鸟氨酸	Orn	133.1	189.2
苯丙氨酸	Phe	166.1	222.1
酪氨酸	Tyr	182.1	238.1
缬氨酸	Val	118.1	174.1
脯氨酸	Pro	116.1	172.1
^a 亮氨酸族 ²	Xle+Pro-OH	132.1	-
^b 琥珀酰丙酮	SUCC	-	212.1
精氨酸琥珀酸	Asa	290.1	459.3
游离肉碱	C0	162.1	218.2
乙酰肉碱	C2	204.1	260.2
丙酰肉碱	C3	218.1	274.2
丙二酰肉碱	C3DC	248.1	360.2
丁酰肉碱	C4	232.2	288.2
3-羟基丁酰肉碱	C4-OH	248.2	304.2
^a 丙二酰肉碱+3-羟基丁酰肉碱	C3DC+C4-OH	248.1	-
丁二酰肉碱	C4DC	262.1	374.3
异戊酰肉碱	C5	246.2	302.2
异戊烯酰肉碱	C5:1	244.2	300.2
3-羟基异戊酰肉碱	C5-OH	262.2	318.2
戊二酰肉碱	C5DC	276.1	388.3
^a 丁二酰肉碱+3-羟基异戊酰肉碱	C4DC+C5-OH	262.1	-
己酰肉碱	C6	260.2	316.3
己二酰肉碱	C6DC	290.2	402.3
^a 戊二酰肉碱+3-羟基己二酰	C5DC+C6-OH	276.1	-
辛酰肉碱	C8	288.2	344.3
辛烯酰肉碱	C8:1	286.2	342.3
癸酰肉碱	C10	316.3	372.3
癸烯酰肉碱	C10:1	314.2	370.3
癸二烯酰肉碱	C10:2	312.2	368.3
十二碳酰基肉碱(月桂酰肉碱)	C12	344.3	400.3
十二碳烯酰肉碱(月桂烯酰肉碱)	C12:1	342.3	398.3
十四碳酰基肉碱(肉豆蔻酰肉碱)	C14	372.3	428.4
十四碳烯酰肉碱(肉豆蔻烯酰肉碱)	C14:1	370.3	426.4
十四碳二烯酰肉碱(肉豆蔻二烯酰肉碱)	C14:2	368.3	424.3
3-羟基十四碳酰基肉碱(3-羟基肉豆蔻酰肉碱)	C14-OH	388.3	444.4
十六碳酰基肉碱(棕榈酰肉碱)	C16	400.3	456.4
十六碳烯酰肉碱(棕榈烯酰肉碱)	C16:1	398.3	454.4
3-羟基十六碳烯酰肉碱(3-羟基棕榈烯酰肉碱)	C16:1-OH	414.3	470.4
3-羟基十六碳酰基肉碱(3-羟基棕榈酰肉碱)	C16-OH	416.3	472.4
十八碳酰基肉碱(硬脂酰肉碱)	C18	428.4	484.4
十八碳烯酰肉碱(油酸肉碱)	C18:1	426.4	482.4
十八碳二烯酰肉碱(亚油酸肉碱)	C18:2	424.3	480.4
3-羟基十八碳烯酰肉碱(3-羟基油酸肉碱)	C18:1-OH	442.4	498.4
3-羟基十八碳酰肉碱(3-羟基硬脂酰肉碱)	C18-OH	444.4	500.4

注:^a表示采用非衍生方法不能区分的指标,检测参数可根据所用质控或内标种类进行增减;^b表示非氨基酸,但是某氨基酸代谢病的重要标志物,可以利用串联质谱进行检测;亮氨酸族¹和亮氨酸族²分别代表用衍生方法和非衍生方法检测的指标,不能区分同分异构体类;-表示非衍生化或衍生化方法未设指标

表3 建议设置的氨基酸及酰基肉碱间比值指标

氨基酸比值指标	酰基肉碱比值指标	酰基肉碱比值指标	酰基肉碱比值指标
Arg/Orn	C3/Met	C5/C3	C14:1/C12:1
Arg/Phe	C3/C0	C5-OH/C3	C12/C3
Cit/Arg	C3/C2	C5-OH/C8	C14/C3
Cit/Phe	C3/C16	C5DC/C3	C14:1/C8:1
*Glu/Cit	C3DC/C4	C5DC/C5-OH	C4-OH/C16
*Glu/Phe	C3DC/C10	C5DC/C3DC	C4-OH/C8
Gly/Phe	C4/C2	C5DC/C8	C16/C3
Phe/*Xle	C4/C3	C6/C3	C18/C3
*Xle/Phe	C4/C8	C8/C2	C16-OH/C16
Met/Phe	C4-OH/C3	C8/C3	C16-OH/C14
Phe/Tyr	C4-OH/C4	C8/C10	C18-OH/C3
Orn/Cit	C5:1/C8	C10/C3	(C16+C18:1)/C2
Tyr/Phe	C5/C2	C14:1/C16	(C16+C18)/C0

注:*表示采用非衍生方法不能区分的指标

1. 仪器校准:仪器只有在质量数和分辨率正确的条件下才能保证分析结果可靠。因此,在首次装机运行或做全面性维护后需要对串联质谱仪进行校准。校准通常采用标准液(PPG)对质谱仪质量进行校正,校正溶液及流速:① 负离子(Neg PPG):10 $\mu\text{l}/\text{min}$;② 正离子(Pos PPG):10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。

不同品牌、型号的仪器所使用的校准液浓度不同,请参考校准试剂盒的说明来完成。如ABI 3200(美国ABI公司),校准时进行仪器的Q1、Q3的正负离子的校正,重点关注各离子的半峰宽(0.6~0.8)和质量偏移(± 0.1 以内),其次查看核心离子(正离子906 m/z、负离子933 m/z)的灵敏度有无明显下降。若使用其他品牌与型号的仪器,校准需按照相应的条件与标准来完成。

2. 性能验证:仪器在校准后还应当进行验证与优化。验证通常采用含有酰基肉碱和氨基酸的溶液进行质谱仪参数的校正以获得最大的总离子反应(灵敏度)。其他的调谐液可以是标记过或没有标记的化合物,通常浓度高出其检出限的8~10倍。在仪器安装和质量校准后,采用标准原液进行验证,流速与流动相流速一致。通过调节仪器参数如锥孔电压、碰撞能量、喷雾情况来调节峰形、灵敏度和酰基肉碱与氨基酸的分辨率,并记录下来,可作为以后再次验证的一个参考。

在每次检测样本前也应当对仪器进行验证。验证通常采用与标准原液成分一样的检测液来完成。检测液含有酰基肉碱与氨基酸,但其浓度在检测限范围内,应当对标准原液进行适当稀释至分析

物的靶值浓度左右以获得检测液。检测液常常作为每天的第一个样品进行检测分析。在检测完成分析时,应当评估它的总离子流图(TIC)峰形、离子强度和流出时间是否正常,用以评估每天仪器性能的一个参考。每天使用检测液来评估仪器性能可以发现仪器的一些问题,如因管道堵塞产生的灵敏度降低或峰形不佳。

(四)结果计算(定量)

确定分析物浓度可以通过两种方式完成。最常见的是通过内部校准,如DBS分析物提取液中包含内标品(内标法)。另一种方法通过氨基酸和酰基肉碱标准品制备的外部校准曲线进行定量,无需稳定的同位素标记(外标法)。

1. 内标法:内标法结果计算(定量)的基本原则是确定目标分析物峰强度与内标物之间的比率。待测分析物浓度通过将该比率乘以内标浓度来确定。

目标分析物的浓度计算包含几个变量,需要将这些变量输入到计算软件中,才能实现浓度值的自动分析。公式(I)给出了分析物浓度的计算公式以及相关的变量:

$$C_{\text{分析物}} = I_{\text{分析物}} \times V_{\text{样本}} \times C_{\text{IS}} / (I_{\text{IS}} \times V_{\text{BS}} \times \text{RRF}) \quad (\text{I})$$

注: $C_{\text{分析物}}$ =目标分析物浓度($\mu\text{mol}/\text{L}$); $I_{\text{分析物}}$ =目标分析物质谱响应强度(计数每秒); $V_{\text{样本}}$ =样本提取量(μl); C_{IS} =内标浓度($\mu\text{mol}/\text{L}$); I_{IS} =内标质谱响应强度(每秒计数); V_{BS} =一个DBS血斑所含血量[一个1/8英寸(3.2 mm)的DBS血斑在55%血细胞比容时相当于3.4 μl 血量];RRF=相对响应因子(提取效率)

2. 外标法:

校准品准备:外标法结果计算(定量)需要预设一组具有已知分析物浓度的DBS样本,制备用于浓度计算的标准曲线。至少准备3个已知分析物浓度的样本,但一般采用5个已知分析物浓度的样本。浓度值设定时,建议其中2个值设在临界值以下,1个在临界值附近,另外2个在临界值以上。这样做是确保待测样本中分析物浓度在检测的线性范围内,并提高对临界浓度样本测定的灵敏度。

校准品浓度验证:校准品的浓度需要在使用前进行验证。建议将校准品发送到参考实验室进行分析。应建立验收标准以确定校准品是否可用。不符合既定标准的校准品需要重新制备。在初始校准品分析物浓度经参考实验室确认之后,随后的校准品制备可以通过常规分析进行验证。

校准曲线:校准品分析的频率取决于实验室的情况。通常情况下,同时进行检测的一批样本需要运行一次校准品分析。每批的质控品检测结果决定何时需要重新分析校准曲线。利用校准曲线计算分析物浓度的公式如下(II):

$$Y=MX+B \text{ (II)}$$

注:Y=校准浓度;M=斜率;X=质谱响应强度(每秒计数);B=截距

按照校准品浓度值和质谱响应强度绘制校准曲线,确定斜率和截距。将每个样本的响应强度代入式为“X”,通过公式(II)求解,确定分析物的浓度“Y”。

(五)检验程序确认和验证

TMS 新生儿筛查的方法评估对氨基酸,游离肉碱和酰基肉碱的准确定量非常重要。方法评估方式包括测试方法开发、检验程序确认、性能验证。新方法建立后,应进行严格的方法评价,以评估其检验效能。对于商品化试剂盒,其操作说明书中关于检测性能的声明也应最终由用户进行评估。如果该方法展示出如声明一样的检测性能,则认为其通过“验证”,可以用于临床服务。如果实验室修改了商业化体外诊断(in vitro diagnostic, IVD)试剂盒的操作方法,那么该方法应被归类为实验室自建方法(laboratory developed tests, LDT),在临床应用前需执行完整的确认方案以建立性能指标。

1. 确认:(1)确认的时机是在实验室或制造商首次开发或修改测定方法之后进行,实施方可以是实验室或者制造商。在新仪器启用之前,也应进行全面的确认。(2)确认用以证明产品符合性能要求和预期用途。评价时需包含以下要素:基质效应、干扰试验、线性、精密性、正确性、特异性和携带污染。其中,在进行正确性评估时,应完成回收率、方法比较、仪器间比较等分析。

2. 验证:性能验证用于再次评估以前经过确认的方法或制造商公布的方法性能特征(如精密性、线性、可报告范围等)。用于验证的材料必须是 DBS 样本,可以是跨越可报告范围的质控品或标准品,校准品,能力验证样本和先前已完成测试的样本。实验方法需要在完成方法验证且结果达到要求,经实验室质量负责人确认后方能再次使用。

五、NBS 样本分析

(一)临界值建立与评估

筛查中心应建立本实验室各检测指标的临界值,并结合基因诊断和其他确诊实验结果进行定期

评估,以评价各检测指标临界值的适宜性,必要时进行适当的调整^[14]。

1. 临界值建立:临界值建立应遵循以下步骤:

(1)方法确认:对采用的串联质谱方法进行确认,通过确认的方法才能用于筛查指标临界值的建立。(2)样本分析:收集足够数量的正常样本,至少 10 000 例健康新生儿样本进行分析;针对不同时期新生儿(大于 7 d、早产儿)所采集的样本,建议设立不同的样本组,分别建立检测指标浓度临界值。(3)临界值计算:推荐采用百分位数法计算临界值,以排除检测指标浓度值非正态分布的影响。百分位数范围从 98.0%~99.9%,具体取决于检测指标在疾病组和正常组分布的重叠情况。(4)临界值验证:初次建立的临界值需要进行验证。可以同已发表的文献及其他实验室采用同样方法和仪器建立的临界值进行比较;推荐利用室间质评能力测试计划来验证本实验室设立的检测指标临界值的适宜性。

2. 临界值评估:检测指标临界值应进行定期和持续的评估。在常规测试的前几个月应该密切监测临界值,根据假阳性率或数量,对临界值进行调整。如果假阳性结果的数量高于预期,则应考虑下调临界值。如果阳性结果的数量低于预期,则应考虑上调临界值。在更新临界值以降低假阳性率时,应考虑增加假阴性结果的潜在风险。当仪器、方法学、内标物发生改变或筛查方法用于已有临床症状儿童检测时,应当对检测指标的临界值进行重新评估。定期评估时可并结合基因诊断和其他确诊实验的结果,以评价各检测指标临界值的适宜性,必要时进行适当的调整。

(二)质量保证和质量控制^[15-18]

质量保证是对 NBS 各步骤进行标准化的限定,确保所采用实验方法的测定结果真实可信。质量保证所监测指标包括但不限于:样本质量、仪器性能监测(例如,泵的压力、温度、真空度、气体压力)、内部质量控制标准、结果可接受规则、周转时间、异常结果随访等。实验室应明确质量保证对于确保整个检测体系精密性和可靠性的重要性,并常态化监测(例如,每天、每周、每月)这些参数。

质量控制是一个监控实验室坚持质量保证标准情况的具体过程。记录试验方法的性能以及偏离质量保证标准时的纠正措施。质量控制主要通过每批实验中增加已知浓度的样本与患者样本一起检测,并依照本实验室的质量控制规则进行分析而完成。质量指标请参考卫生部临床检验中心

新生儿遗传代谢病筛查实验室专家组讨论通过的《新生儿遗传代谢病筛查质量指标共识》(2017)^[19]。

质量保证和质量控制包括但不限于以下要素。

1. 质控品:质控品可以通过商品化途径购买或实验室自制,但都要求质控品的基质与NBS样本一致。质控品应设立至少两个浓度值,浓度区间跨越待测分析物的临界值。

2. 最小质控品数量:单个96孔板至少设两个浓度的质控品,一个高于临界值,一个位于临界值附近,且至少在96孔板前端和末端分别设置质控品。增加质控品时,位置可随机设置。

3. 质控品稳定性要求:商品化质控品,应明确质控品有效期及储存条件。实验室自制质控品则应通过实验验证有效期及最适储存条件。质控品通常需要储存于-20℃以下,湿度小于30%。实验室应注意监测质控品的稳定性,确保质控品中分析物没有降解。

4. 质控品评价:实验室自制质控品在常规使用前要进行合格与否评价。一般采用多批实验、最小20次质控值,计算均值和标准偏差(standard deviation, SD),并参照质控品可接受标准进行评价,不符合标准的质控品应重新制作。

5. 质控规则:筛查实验室应采用合适的质控规则以监控检验误差的发生。如采用质控品中每种分析物的平均浓度值 $\pm 3SDs$ 作为控制限,监控随机误差。常规实验中,质控品的测定结果应参照Levey-Jennings表进行分析,以每日、每周、每月为单位进行监控。失控时需采取必要的纠正措施。

6. 质控趋势和偏移:根据每次实验绘制的Levey-Jennings表,观察质控品分析物浓度的变化趋势和偏移情况。异常时应当分析原因并采取纠正措施。

7. 总离子流图谱:实验中应监测质谱总离子流图,主要观察峰型、保留时间、基线水平的信号强度,确保质谱系统运行正常。当发生异常时,可能造成结果计算错误,需要排除影响因素,重新分析样本。

8. 方法性能监测:由于每个样本中均加入了内标,监测内标离子信号强度,可反映样本制备和分析过程是否适当,如内标添加与否,注射质量,液流稳定性等。每个类型的分析物应至少检测一个对应的内标离子信号,如酰基肉碱(d_3 -C8),中性和酸性氨基酸($^{13}C_6$ -苯丙氨酸)。如果实验采用了两种数据采集模式(SRM或Full-scan),还应监测每种模

式下每个类型至少一个对应的内标离子信号。实验室应建立可接受的离子信号强度标准(通常10%至50%的所述期望平均响应值)。

9. 健康人群统计:每日、每月累积并监控健康人群每个分析物的平均值可作为另一种方式来监测方法的性能。每种分析物的群体平均值应在每次检测基础上计算(如一个96孔板),并与累积平均值 and SD 进行比较。超出范围则意味着本次实验分析前或分析阶段可能存在问题,例如试剂错误、滤纸批号变化、样本和质控品打孔差异,或者在运输过程中发生样本降解。纠正措施应在既定程序的指导下完成。

(三)能力验证

能力验证(proficiency testing, PT)是对采用盲法编码的已知浓度标本检测结果的可比性和有效性进行定期评估的系统工作。PT计划又被称为“外部质量评价”(external quality assessment, EQA)。根据国际组织的规定,PT是公认的术语。参加并通过PT计划是体现一个实验室检测能力和质量的最好方式。PT计划按周期进行,需要专门机构组织实施,我国由卫生部临床检验中心负责。PT样本在测试时,应按照NBS常规样本相同的方式进行处理和分析。

六、结果解释与报告

(一)结果解释

1. 报告解释应基于特定疾病的关键生物标志物的检测值和已建立的临界值。可设立不同检测指标的比值,以提高筛选结果筛查的灵敏度和准确性(表4)。

2. 结果解释还应考虑到婴儿在采集时的年龄,营养状况,输血情况,婴儿的出生体重或采集体重,胎龄以及其他因素(如标本状况)。

3. 串联质谱同时检测数十种分析物,可提示多种遗传代谢性疾病。其中表4(序号1~38)列出了新生儿期推荐采用串联质谱法进行筛查的遗传代谢病种类。但一些疾病仅可筛查出部分的患者(表4,序号39~51),建议在结果分析和报告时进行合理解释。

(二)结果报告

结果报告无论是阴性或阳性,都需要符合一般标准,至少包括以下信息:(1)姓名或其他标识;(2)患者出生日期和性别;(3)送检单位名称;(4)样本采集日期和时间;(5)实验室的名称、地址及联系方式;(6)样本验收日期和测试日期;(7)报告发布日

表 4 串联质谱新生儿遗传代谢病筛查病种

序号	疾病名称	简称	串联质谱检测指标
1	苯丙氨酸羟化酶缺乏症	PAHD	Phe, Phe/Tyr, Phe/(Leu+Ile)
2	四氢生物蝶呤缺乏症	BH4D	Phe, Phe/Tyr, Phe/(Leu+Ile)
3	枫糖尿病	MSUD	Leu+Ile, Val, (Leu+Ile)/Phe
4	酪氨酸血症 (I、II、III)	TYR	SUAC, Tyr
5	高甲硫氨酸血症	MET	Met, Met/Phe
6	同型半胱氨酸血症 I 型	HCY	Met, Met/Phe
7	瓜氨酸血症 I 型	CIT-I	Cit, Cit/Arg
8	瓜氨酸血症 II 型 (希特林蛋白缺乏症)	CIT-II	Cit, Met, Tyr
9	精氨酸琥珀酸血症	ASA	Asa, Cit, Arg, Cit/Arg
10	精氨酸血症	ARG	Arg, Arg/Orn
11	甲基丙二酸血症 (Mut, cblA, cblB)	MMA	C3, C3/C2, C3/C0, C3/C16
12	甲基丙二酸血症伴同型半胱氨酸血症	cblC, cblD	C3, C3/C2, C3/C16
13	丙酸血症	PA	C3, C3/C2
14	异戊酸血症	IVA	C5, C5/C2
15	戊二酸血症 I 型	GAI	C5DC, C5DC/C8, C5-DC/C5-OH, C5DC/C0, C5DC/C3DC
16	生物素酶缺乏症	BTD	C5-OH, C3, C5-OH/C3
17	全羧化酶合成酶缺乏症	HCS	C5-OH, C3, C5-OH/C8
18	2-甲基-3-羟基丁酰辅酶 A 脱氢酶缺乏症	2M3HBA	C5-OH, C5:1, C5-OH/C8
19	3-甲基巴豆酰辅酶 A 羧化酶缺乏症	3-MCC	C5-OH, C5-OH/C8
20	3-甲基戊烯二酰辅酶 A 水解酶缺乏症	3-MGA	C5-OH, C5-OH/C8
21	3-羟-3-甲基戊二酰辅酶 A 裂解酶缺乏症	3-HMG	C5-OH, C6DC, C5-OH/C3
22	β -酮硫解酶缺乏症	BKT	C5:1, C5-OH, C4-OH, C5-OH/C8
23	原发性肉碱缺乏症	PCD	C0(降低), C2(下降), C3(下降)
24	短链酰基辅酶 A 脱氢酶缺乏症	SCAD	C4, C4/C3, C4/C8
25	异丁酰辅酶 A 脱氢酶缺乏症	IBD	C4, C4/C2, C4/C3
26	丙二酸血症	MAL	C3DC, C3DC/C10, C5-DC/C3-DC(下降)
27	2-甲基丁酰辅酶 A 脱氢酶缺乏症	2MBAD	C5, C5/C2, C5/C3
28	2,4-二烯酰辅酶 A 脱氢酶缺乏症	DERED	C10:2
29	中链 3-酮酰基辅酶 A 硫解酶缺乏症	MCKAT	C8, C10
30	中链酰基辅酶 A 脱氢酶缺乏症	MCAD	C8, C6, C10:1, C10, C8/C2, C8/C10
31	极长链酰基辅酶 A 脱氢酶缺乏症	VLCAD	C14:1, C14:2, C14, C12:1, C12:1, C12, C14:1/C16, C14:1/C12:1
32	中链/短链-3-羟酰基辅酶 A 脱氢酶缺乏症	M/SCHAD	C4-OH, C6-OH, C4/C3, C4-OH/C16, C4-OH/C8, C4-OH/C4
33	长链-3-羟酰基辅酶 A 脱氢酶缺乏症	LCHAD	C16-OH, C18-OH, C16:1-OH, C18:1-OH, C14-OH, C18-OH/C18, 16-OH/C16, C16-OH/C14
34	多种酰基辅酶 A 脱氢酶缺乏症	MADD	C4-C18(C8,C10)
35	三功能蛋白缺乏症	TFP	C16:1-OH, C16-OH, C18-OH, C18:1-OH, C14-OH, C18-OH/C18, C16-OH/C16, C16-OH/C14
36	肉碱棕榈酰转移酶-I 缺乏症	CPT-I	C0, C16 (下降), C18 (下降), C0/(C16+C18)
37	肉碱棕榈酰转移酶-II 缺乏症	CPT-II	C14, C16, C18:2, C18:1, C18, C0/(C16+C18) (下降), (C16+C18:1)/C2
38	肉碱/酰基肉碱移位酶缺乏症	CACT	C14, C16, C18:2, C18:1, C18, C0/(C16+C18) (下降), (C16+C18:1)/C2
39	丙酮酸羧化酶缺乏症	PC	Cit, Glu/Cit (下降), Cit/Phe, Cit/Arg
40	氨甲酰磷酸合成酶 I 缺陷症	CPSID	Cit (下降), Glu, Glu/Cit
41	鸟氨酸氨甲酰转移酶缺陷症	OTCD	Cit (下降), Glu, Glu/Cit
42	亚甲基四氢叶酸还原酶缺乏症	MTHFR	Met (下降), Met/Phe (下降)
43	高鸟氨酸血症	OAT	Orn, Orn/Cit
44	高脯氨酸血症	HP	Pro, Pro/Phe
45	母源性维生素 B12 缺乏症	B12-D (mat)	C3, C3/C2, C3/C16, C3/Met
46	甲基丙二酸血症伴同型半胱氨酸血症	cblF	C3, C3/C16, C3/C2
47	甲基丙二酸血症转钴胺素受体缺陷	TcblR	C3, C3/C16, C3/C2
48	转钴胺素 II 缺陷病	TCN2	C3, C3/C2
49	乙基丙二酸脑病	EE	C4, C5, C4/C3, C5/C3
50	非酮性高甘氨酸血症	NKH	Gly, Gly/Phe
51	高鸟氨酸血症-高氨血症-同型瓜氨酸血症综合征	HHHS	Orn, Orn/Arg

期;(8)实验操作分析人员及审核人员;(9)检测指标定量检测值;(10)结论及建议^[20]。

新生儿多种遗传代谢病筛查是比普通遗传代谢病筛查更为复杂的系统工程,要求专业化的技术人员和更先进的筛查技术^[21-22]。检测指标的增加,对检测质量控制、不同实验室间检测结果可比性等提出了更大的挑战^[23-24]。制定本共识,以提高不同筛查实验室间筛查方案的一致性,督促各筛查实验室加强质量管理,提供标准化的筛查服务。

执笔人:邹琳 余朝文

参加本共识制定的单位及人员(按单位首字拼音排序):

北京医院国家老年医学中心/卫生部临床检验中心/北京市临床检验工程技术研究中心(王治国、何法霖、王薇);重庆医科大学附属儿童医院(邹琳、余朝文);福建省新生儿疾病筛查中心(朱文斌);广东省梅州市新生儿疾病筛查中心(黄烁丹);广东省妇幼保健院、广东省新生儿遗传代谢病筛查中心(江剑辉);广西壮族自治区妇幼保健院(范歆);贵州省疾病预防控制中心妇幼保健所(张宏红);海南省妇幼保健院新生儿疾病筛查中心(王洁);湖北省妇幼保健院医学检验科(王维鹏);湖南省妇幼保健院(唐华);江苏省徐州市妇幼保健院(顾茂胜);山东省青岛市妇女儿童医院(李文杰);山东省青岛大学附属医院(刘世国);山东省妇幼保健院(周玉侠);陕西省妇幼保健院新生儿疾病筛查中心(强荣);上海市儿童医院新生儿疾病筛查中心(田国力);上海交通大学医学院附属新华医院(韩连书);四川省妇幼保健院新生儿疾病筛查中心(欧明才);云南省妇幼保健院(顾菟茜);浙江大学医学院附属儿童医院(曲一平、尚世强、黄新文、杨茹莱);浙江宁波市妇女儿童医院(陈意振);郑州大学第三附属医院(河南省妇幼保健院)新生儿疾病筛查中心(赵德华)

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] 赵正言, 顾学范. 新生儿遗传代谢病筛查. 第2版[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- [2] 尚世强, 杨建滨, 王治国. 新生儿遗传代谢病串联质谱筛查存在的问题及展望[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(4): 237-239. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2016.04.001.
- [3] 赵正言. 国际新生儿疾病筛查进展[J]. 中国儿童保健杂志, 2012, 20(3):193-195.
- [4] 黄新文, 杨建滨, 杨茹莱, 等. 串联质谱技术对新生儿遗传代谢病的筛查及随访研究. 中华儿科学杂志, 2011, 49(10): 765-770. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2011.10.013.
- [5] 龚振华, 田国力, 王燕敏. 新生儿期至青春期血中肉碱和酰基肉碱的变化[J]. 中华儿科杂志, 2010, 48(12):922-927. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2010.12.011.
- [6] 卫生部令64号:《新生儿疾病筛查管理办法》(2009).

- [7] 卫生部关于印发《新生儿疾病筛查技术规范(2010年版)》的通知, 卫妇社发〔2010〕96号, 2010-11-10.
- [8] 王治国, 李小鹏, 武平原. 2001年全国新生儿疾病筛查实验室质量评价[J]. 中国公共卫生, 2002, 18(11):1324-1327. DOI:10.3321/j.issn:1001-0580.2002.11.020.
- [9] 王维鹏, 邹琳, 王治国. 新生儿疾病筛查与产前诊断实验室管理[M]. 北京:人民卫生出版社, 2018.
- [10] Shahangian S, Snyder SR. Laboratory Medicine Quality Indicators A Review of the Literature[J]. Ame J Clin Pathol, 2009, 131(3):418-431. DOI: 10.1309/AJCPJF8JI4ZLDQUE.
- [11] 国家卫生计生委. 医学检验实验室基本标准和管理规范(试行)〔国卫医发(2016)37号〕, 2016-07-20.
- [12] 韩连书, 高晓岚, 叶军, 等. 串联质谱分析干血滤纸片酰基肉碱方法的建立. 中华检验医学杂志, 2005, 28(1):88-91. DOI: 10.3760/j.issn:1009-9158.2005.01.028.
- [13] 韩连书, 高晓岚, 叶军, 等. 串联质谱检测干血滤纸片氨基酸方法的建立[J]. 检验医学, 2005, 20(3):220-223. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2005.03.017.
- [14] American College of Medical Genetics Newborn Screening Expert Group. Newborn Screening: Toward a Uniform Screening Panel and System. Gene Med, 2006, 8(Suppl1): 1S-252S.
- [15] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL02: 2012. 医学实验室质量和能力认可准则(ISO15189: 2012, IDT). 2013-11-22.
- [16] 王治国. 临床检验质量控制技术. 第3版[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014.
- [17] 王治国, 费阳, 康凤凤, 等. 国家卫生计生委发布临床检验专业15项医疗质量控制指标(2015年版)内容及解读[J]. 中华检验医学杂志, 2015, 38(11):777-781. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2015.11.016.
- [18] 叶圆圆, 王薇, 何法霖, 等. 我国新生儿遗传代谢病串联质谱筛查室内质控变异系数分析[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(12):901-903. DOI: 10.13602/j.cnki.jcls.2016.12.05.
- [19] 国家卫生计生委临床检验中心新生儿遗传代谢病筛查实验室专家组. 新生儿遗传代谢病筛查质量指标共识[J]. 中华检验医学杂志, 2017, 40(5):352-355. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2017.05.005.
- [20] CLSI. Newborn Screening by Tandem Mass Spectrometry. 2nded. CLSI guideline NBS04. Wayne, PA: CLSI; 2017.
- [21] Pass KA, Lane PA, Fernhoff PM, et al. US newborn screening system guidelines II: follow-up of children, diagnosis, management, and evaluation. Statement of the Council of Regional Networks for Genetic Services (CORN)[J]. J Pediatr, 2000, 137(4 Suppl):S1-46.
- [22] Kronn D, Mofidi S, Braverman N, et al. Diagnostic Guidelines for Confirmation of Screen-Positive Newborn Screening Results. New York Mid-Atlantic consortium for genetic and newborn screening services, 2014.
- [23] 蔡娜, 谢云, 马晓萍, 等. 串联质谱技术在新生儿遗传代谢病筛查中的临床应用研究[J]. 现代生物医学进展, 2017(31): 6083-6087. DOI:10.13241/j.cnki.pmb.2017.31.019.
- [24] Lindner M, Hoffmann G F, Matern D. Newborn screening for disorders of fatty-acid oxidation: experience and recommendations from an expert meeting[J]. J Inher Metab Dis, 2010, 33(5):521-526. DOI: 10.1007/s10545-010-9076-8.

(收稿日期:2018-02-23)

(本文编辑:唐栋)