

# 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

蒋文星<sup>1</sup> 陈丽萍<sup>1</sup> 李红<sup>2</sup> 郭智彬<sup>2</sup> 袁意<sup>3</sup> 周斌<sup>3</sup> 卢文青<sup>1</sup>  
杨琳<sup>4</sup> 吴冰冰<sup>4</sup> 周敏丽<sup>1</sup>

<sup>1</sup>江西省儿童医院新生儿科,南昌 330006;<sup>2</sup>江西省儿童医院中心实验室,南昌 330006;<sup>3</sup>江西省儿童医院内分泌遗传代谢科,南昌 330006;<sup>4</sup>上海市出生缺陷防治重点实验室 复旦大学附属儿科医院儿童发育与疾病转化医学研究中心,上海 201102  
通信作者:陈丽萍,Email: cllpp88@qq.com;李红,Email: icemade@hotmail.com

**【摘要】目的** 评估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价值。**方法** 回顾性分析江西省儿童医院新生儿科 2017 年 3 月至 2019 年 9 月收治的 19 例遗传代谢病新生儿的临床信息、血尿代谢产物检测及基因检测结果。血尿代谢产物分别通过液相色谱-串联质谱及气相色谱-质谱技术检测,全血样本采用基于下一代测序的新生儿遗传病基因 panel 检测。**结果** 19 例患儿中,有 12 例患儿的代谢产物质谱检测结果与基因检测结果一致;2 例患儿的质谱检测结果与基因检测结果不一致;4 例质谱检测未提示病种,经过基因检测得出与患儿临床表型部分相符的疾病诊断;1 例未行质谱检测的患儿,因基因检测而考虑遗传代谢病诊断,并以此为依据进行随访。**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。

**【关键词】** 代谢疾病; 串联质谱法; 基因测定; 新生

**基金项目:** 江西省卫生健康委员会科技计划项目(20195552);江西省自然科学基金(20171BAB205043)

DOI:10.3760/cma.j.cn112137-20191211-02701

## Application of mass spectrometry combined with next generation sequencing in the diagnosis of neonatal inherited metabolic diseases

Jiang Wenxing<sup>1</sup>, Chen Liping<sup>1</sup>, Li Hong<sup>2</sup>, Guo Zhibin<sup>2</sup>, Yuan Yi<sup>3</sup>, Zhou bin<sup>3</sup>, Lu Wenqing<sup>1</sup>, Yang Lin<sup>4</sup>, Wu Bingbing<sup>4</sup>, Zhou Minli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Neonatology, Jiangxi Provincial Children's Hospital, Nanchang 330006, China; <sup>2</sup>Department of Central Laboratory, Jiangxi Provincial Children's Hospital, Nanchang 330006, China; <sup>3</sup>Department of Endocrinology, Metabolism and Genetics, Jiangxi Provincial Children's Hospital, Nanchang 330006, China; <sup>4</sup>Shanghai Key Laboratory of Birth Defects, the Translational Medicine Center of Children Development and Disease of Fudan University, Children's Hospital of Fudan University, Shanghai 201102, China  
Corresponding authors: Chen Liping, Email: cllpp88@qq.com; Li Hong, Email: icemade@hotmail.com

**【Abstract】Objective** To explore the application value of mass spectrometry (MS) combined with next generation sequencing (NGS) in diagnosing neonatal inherited metabolic diseases (IMD). **Methods** The clinical information, metabolites in blood and urine, and gene sequencing results of 19 neonates with IMD coming from the Department of Neonatology of Jiangxi Provincial Children's Hospital from March 2017 to September 2019 were analyzed retrospectively. The metabolites in blood were detected by liquid chromatography tandem mass spectrometry and urine were detected by gas chromatography-mass spectrometry respectively. Meanwhile, the whole bloods were detected by neonatal genetic disease panel based on NGS. **Results** Twelve neonates had the same results between MS and NGS among the 19, 2 had different results from MS to NGS, and 4 had no disease indication by MS but were diagnosed by NGS whose clinical phenotype were partially consistent with NGS results. One of them who did not carry out MS was considered as the diagnosis of IMD because of the detection of gene, and was followed up on this basis.

**Conclusion** MS could diagnose IMD relatively quickly to guide clinical treatment, and while NGS could verify the results of MS detection. Combination of MS and NGS would understand the cause of disease on genetic level, so as to guide further treatment and genetic consultation.

**【Key words】** Metabolic diseases; Tandem mass spectrometry; Genetic testing; Newborn

**Fund program:** Science and Technology Plan Projects of Health Commission of Jiangxi Province (20195552); Natural Foundation of Jiangxi Province (20171BAB205043)

DOI:10.3760/cma.j.cn112137-20191211-02701

遗传代谢病 (inherited metabolic diseases, IMD) 又称先天性代谢异常 (inborn errors of metabolism, IEM), 指由于单一基因缺陷引起酶、载体、受体等蛋白功能缺陷, 从而导致机体生化代谢紊乱, 造成中间或旁路代谢产物蓄积, 或终末代谢产物缺乏, 引起一系列临床症状的一组疾病<sup>[1]</sup>, 目前已达 1 000 余种<sup>[2]</sup>。这组疾病单一病种发病率低, 但总体发病率高, 且随着医学发展, 越来越多的 IEM 可以通过修复紊乱的代谢途径来治疗, 并获得良好的预后<sup>[3]</sup>, 因此 IEM 的症状前诊断对挽救患者生命、减少后遗症的发生非常重要。传统的免疫学方法因为小分子物质干扰, 常无法得到准确结果, 且 1 次仅可检测一种生物成分, 而质谱检测项目相对更多, 1 份标本可以检测多种生物成分, 筛查效率明显提高, 且成本相对低廉, 因此成为目前临床新生儿 IEM 筛查常用的技术手段之一<sup>[4]</sup>。但是其中一些生物标志物的特异性和敏感性并不总是很高, 且存在疾病分型不明确等问题, 因此基因检测开始发挥重要作用<sup>[5]</sup>, 这其中下一代测序技术 (next generation sequencing, NGS) 可以快速对样本的数千个甚至数百万个 DNA 碱基对进行测序, 现在已逐渐应用于重症监护室 (特别是新生儿和儿科) 以及复杂疾病的早期<sup>[6]</sup>。为了降低测序成本、提高检测敏感度, 出现了新的测序策略——基因 Panel 测序 (gene-panel sequencing), 它是测序特定疾病的基因及基因区段的检测方法<sup>[7]</sup>, 比外显子组测序或基因组测序具有更高的诊断率<sup>[6]</sup>。目前下一代测序技术在国内新生儿遗传代谢病诊断中的应用尚不广泛, 本研究拟通过分析 19 例新生儿遗传代谢病的临床表现, 对比质谱检测及下一代测序结果, 探讨两种检测方法联用在新生儿遗传代谢病诊断中的应用价值。

## 对象与方法

### 一、研究对象

本研究已获得伦理委员会批准 (批准文号:

JXSETYY-YXKY--2020002), 并由研究对象监护人签署书面知情同意书。回顾性分析江西省儿童医院新生儿科 2017 年 3 月至 2019 年 9 月住院患儿中存在以下一种或多种临床表现, 临床疑似 IEM, 且家属同意完善基于下一代测序的新生儿遗传病基因检测的患儿: (1) 神经系统: 不明原因的反应差、意识改变、惊厥或易激惹、肌张力异常; (2) 呼吸系统: 不明原因的呼吸困难、反复发绀; (3) 消化系统: 喂养不耐受、反复呕吐、肝脾肿大、胆汁淤积、肝功能异常、不明原因的反复高胆红素血症; (4) 代谢和电解质: 糖代谢异常、高血氨、高乳酸、水电解质酸碱平衡紊乱; (5) 血液系统: 对抗感染治疗疗效不佳的白细胞减少、血小板减少; (6) 特殊体味或气味等。排除标准: (1) 外观明显畸形; (2) 影像学检查提示重要脏器严重畸形。本研究分析的 IEM 不包含质谱检测不可提示异常的 IEM 类型。

### 二、液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 检测

采用干血滴滤纸片法将患儿血液标本滴于采血纸片上形成血斑, 自然风干, 然后以复溶氨基酸和酰基肉毒碱为内标准品, 严格按照非衍生法试剂盒 (美国 PE 公司) 的操作说明对血滤纸片样本进行处理, 处理后上机 (美国生物应用系统公司 API3200 qTrap 型串联质谱仪), 根据所形成的谱图、离子峰强度对分析物进行鉴定和定量, 可检测血液中氨基酸、肉碱及琥珀酰丙酮含量。

### 三、气相色谱-质谱 (GC/MS) 检测

留取清洁中段尿液标本 6 ml, 2 000 转/min 离心 10 min, 测定尿样肌酐值, 并根据尿样肌酐值计算出尿液、水、内标准溶液 (十七烷酸、二十四烷酸、托品酸溶解于乙酸乙酯) 的量, 将计算好量的尿液除尿素后, 加入已计算好量的内标准溶液及水混合, 再经过脲化、萃取、氮吹、衍生等步骤后上机 (日本岛津公司 QP2010 Ultra 型气相色谱质谱联用仪) 进行尿有机酸谱检测。

### 四、质谱检测结果判读

血液 LC-MS/MS 及尿液 GC/MS 检测结果由我院中心实验室专业技术人员结合患儿临床资料综

合分析判断,检测结果分为3类:提示某一种或某一类IEM为阳性结果;某些代谢成份异常升高或降低,但不能明确提示疾病种类,考虑为继发性代谢异常;结果未见显著异常为阴性结果。检测结果1周内获得。

### 五、基因检测

抽取患儿及其父母静脉血各4 ml送至明码(上海)生物科技有限公司,对患儿基因组DNA进行疾病相关基因目标区域捕获和测序。该测序采用Illumina HiSeq X平台,使用安捷伦(Agilent)捕获试剂盒、Illumina Cluster和SBS试剂盒,目标区域平均测序深度110~160X,其中目标序列的98%深度达20X以上,对所有测序片段进行碱基识别。二级分析流程主要采用Sentieon软件套装进行测序数据分析,测序片段通过Sentieon BWA与UCSC hg19参考基因组进行比对。每个碱基的测序深度及变异预测均从所有基因组测序数据中获得,变异采用变异效应预测因子(variant effect predictor, VEP)软件进行注释, ClinVar、在线人类孟德尔遗传(online mendelian inheritance in man, OMIM)和人类基因突变数据库(human gene mutation database, HGMD)这3个主要的收录已知或疑似致病变异的数据库用于筛选已知的致病变异。同时采用多种工具预测错义变异的功能以及非编码调控序列的注释,基于人群的大规模测序数据库用于排除在正常人群中具有较高频率的变异。每个变异均使用明码(上海)生物科技有限公司的临床序列分析软件进行评估,并依据美国医学遗传学与基因组学学会(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)发布的《序列变异解读标准和指南》对每个变异进行分类,序列变异使用人类基因组变异协会(Human Genome Variation Society, HGVS)命名法。对于检测出的变异,进一步由复旦大学附属儿科医院分子基因诊断中心采用Sanger测序验证检测结果及其父母相应序列。报告解读由复旦大学附属儿科医院分子基因诊断中心的临床信息分析人员完成后,我院临床医生根据患儿临

床资料共同确定患儿的分子遗传学诊断。检测结果分为2类:检测到与临床表型部分相符的致病、疑似致病、临床意义未明的变异为阳性结果;其余为阴性检测结果。

### 六、临床信息采集

采集基因检测诊断为IEM患儿的年龄、性别、出生史、家族史、临床症状及体征、实验室检查、影像学检查、电生理学检查、诊治经过,并电话随访患儿的结局。

## 结 果

### 一、筛查流程

我院新生儿科IEM诊治流程如图1。符合纳入标准的共191例,根据排除标准排除52例后,入组分析139例患儿。139例患儿中未做质谱检测10例,质谱检测阳性21例,质谱检测提示继发性代谢异常41例,质谱检测阴性67例。139例患儿中基于下一代测序的新生儿遗传病基因检测阳性结果83例,阴性结果56例。83例基因检测阳性结果中,提示IEM的有19例。19例患儿临床表现及检测结果见表1。

### 二、临床信息

19例IEM患儿中,男10例,女9例。均为足

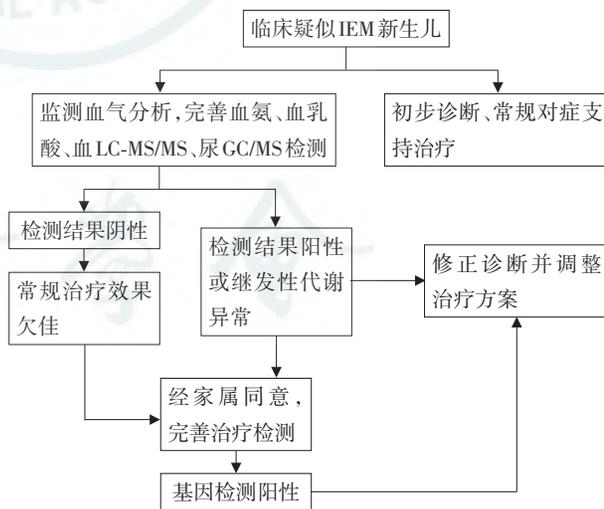


图1 新生儿IEM诊治流程

表1 19例先天性代谢异常新生儿临床信息及检测结果

例序	性别	发病年龄	临床表现	LC-MS/MS及GC-MS检测结果	基因	变异信息	变异来源	合子类型	遗传模式	变异评级	诊断	随访
1	男	1d	意识不清,惊厥,高血氨1586 μmol/L,高乳酸7.1 mmol/L,电解质代谢紊乱	血:丙氨酸、甲硫氨酸↑,瓜氨酸↓;尿:乳酸、丙酮酸、3-羟基丁酸、尿黑酸↑,需排除黑酸尿症	OTC	NM_000531.5:c.784dupA(p.Thr262AsnfsTer31) <sup>a</sup>	母亲	Hemi	XLR	LP	OTCD	生后6d死亡

续表1

例序	性别	发病年龄	临床表现	LC-MS/MS及GC-MS检测结果	基因	变异信息	变异来源	合子类型	遗传模式	变异评级	诊断	随访
2	男	9 d	意识不清,惊厥,呕吐,高血氨815 μmol/L,高乳酸10.4 mmol/L,水电解质酸碱平衡紊乱,肝功能异常	血:丙氨酸↑,需排除丙酮酸脱氢酶、丙酮酸羧化酶缺乏症等; 尿:乳酸、丙酮酸↑,结合血,需考虑原发性代谢性疾病(丙酮酸羧化酶缺乏症)可能,3-羟基戊二酸、4-羟基苯乳酸、4-羟基苯丙酮酸↑	OTC	NM_000531: exon8: c. 725C>T(p.T242I)	母亲	Hemi	XLR	LP	OTCD	生后55 d死亡
3	男	1 d	反应差,高血氨208 μmol/L,高乳酸3.7 mmol/L,凝血功能异常,听性脑干反应:双耳未通过	血:多种氨基酸↑; 尿:3-羟基戊二酸、4-羟基苯乳酸、3-甲基戊二酸↑	SERAC1	NM_032861.3: c. 1339C>T(p.Arg447Ter) <sup>a</sup> ; NM_032861.3: c. 973dupA(p.Met325AsnfsTer5) <sup>a</sup>	母亲、父亲	Het、Het	AR、AR	LP、LP	MEGDEL	存活,耳聋,生长发育差
4	男	2 d	惊厥,肌张力低下,高胆红素血症,高血氨161 μmol/L,水、电解质、酸碱平衡紊乱	血:亮氨酸、缬氨酸↑,需排除枫糖尿症;C3、C3/C2↑,需排除MMA或PA; 尿:-	PCCB	NM_000532: exon8: c. 838dupC(p.L280PfsTer11)	父亲、母亲	Hom	AR	P	PA	生后11 d死亡
5	男	1 d	意识不清,高血氨407 μmol/L,高乳酸7.3 mmol/L,白细胞计数降低,血小板减少	血:C3及比值↑,鉴别MMA及PA; 尿:3-羟基丙酸、丙酰甘氨酸、甲基枸橼酸、2-甲基3-羟基戊酸、乳酸、2-羟基异戊酸、苯乙酸、4-羟基苯乳酸↑,结合血,考虑PA	PCCB	NM_000532: exon15: c. 1535G>A(p.R512H) <sup>a</sup> ; 1号外显子处疑似杂合缺失可能	NA	Het	AR	US	PA	生后17 d死亡
6	男	2 d	意识不清,高血氨1702 μmol/L,水、电解质、酸碱平衡紊乱,糖代谢异常,高胆红素血症	血:酪氨酸↑,需排除外酪氨酸血症;C3、C3/C2↑,排除MMA及PA; 尿:3-羟基丁酸、3-羟基丙酸↑,酮症	MUT	NM_000255: exon11: c. 1850T>G(p.L617R); NM_000255: exon2: c. 323G>A(p.R108H)	母亲、父亲	Het、Het	AR、AR	US、P	MMA	生后6 d死亡
7	女	1 d	意识不清,高血氨1694 μmol/L,高乳酸3.2 mmol/L,电解质代谢紊乱,高胆红素血症,白细胞计数降低	血:亮氨酸、酪氨酸↑,C3、C3/C2↑; 尿:甲基丙二酸、甲基枸橼酸、3-羟基丙酸↑,提示MMA	MUT	NM_000255: exon6: c. 1267G>T(p.D423Y) <sup>a</sup> ; NM_000255: exon10: c. 1777G>T(p.E593X)	母亲、父亲	Het、Het	AR、AR	US、P	MMA	生后8 d死亡
8	男	1 d	呕吐,意识不清,高血氨797 μmol/L,高乳酸5.5 mmol/L,白细胞计数降低,血小板减少	血:丙氨酸↑,需排除丙酮酸羧化酶、丙酮酸脱氢酶缺乏症;C3、C3/C2↑,需排除MMA或PA; 尿:甲基丙二酸、3-羟基丙酸显著↑,提示MMA	MUT	NM_000255: exon13: c. 2179C>T(p.R727X)	母亲	Hom	AR	P	MMA	生后8 d死亡
9	女	1 d	意识不清,高血氨604 μmol/L,水、电解质、酸碱平衡紊乱,白细胞计数降低,血小板减少,肝功能异常	血:C5、C5/C2、C5/C3↑,需排除IVA; 尿:3-羟基异戊酸、异戊酰甘氨酸显著↑,提示IVA	IVD	NM_002225: exon2: c. 158G>C(p.R53P); NM_002225: exon12: c. 1208A>G(p.Y403C)	母亲、父亲	Het、Het	AR、AR	LP、LP	IVA	生长发育正常
10	男	3 d	意识不清,惊厥,呕吐,高血氨114 μmol/L,水、电解质、酸碱平衡紊乱,白细胞计数降低,血小板减少	血:C5、C5/C3显著↑,提示IVA; 尿:异戊酰甘氨酸、3-羟基异戊酸↑,提示IVA	IVD	NM_002225: exon12: c. 1183C>T(p.R395C); NM_002225: exon2: c. 158G>C(p.R53P)	父亲、母亲	Het、Het	AR、AR	LP、P	IVA	生长发育正常
11	女	1 d	意识不清,惊厥,高血氨237 μmol/L,白细胞计数降低,血小板减少,肝功能异常	血:C5、C5/C3↑,提示IVA; 尿:异戊酰甘氨酸、3-羟基异戊酸显著↑,提示IVA	IVD	NM_002225: exon10: c. 1064dupG(p.C355WfsTer4) <sup>a</sup> ; NM_002225: exon12: c. 1208A>G(p.Y403C)	母亲、父亲	Het、Het	AR、AR	P、P	IVA	生长发育正常

续表1

例序	性别	发病年龄	临床表现	LC-MS/MS及GC-MS检测结果	基因	变异信息	变异来源	合子类型	遗传模式	变异评级	诊断	随访
12	女	3 d	意识不清,惊厥,高血氨320 μmol/L,水、电解质、酸碱平衡紊乱,白细胞计数减少,高胆红素血症	血:C5、C5/C2水平↑,注意排外IVA。游离肉碱水平↓,提示肉碱缺乏; 尿:3-羟基异戊酸、2-羟基异戊酸、4-羟基苯乳酸、3-羟基丁酸↑、结合血C5↑,考虑IVA	IVD	NM_002225: exon10: c. 1019C>A(p. R340Q) <sup>a</sup> ; NM_002225: exon6: c. 602A>G(p. N201S) <sup>a</sup>	母亲、父亲	Het、Het	AR、AR	US、US	IVA	失访
13	男	2 d	意识不清,高血氨828 μmol/L,高乳酸5.1 mmol/L,肝功能异常	血:阴性; 尿:3-羟基丙酸、3-羟基戊二酸↑,建议复查监测,3-羟基丁酸↑,见于酮症	CPS1	NM_001875: exon38: c. 4472A>G(p. Y1491C) <sup>a</sup> ; NM_001875: exon11: c. 1145C>T(p. P382L)	NA、NA	Het、Het	AR、AR	US、US	CPS1D	生后5 d死亡
14	男	1 d	意识不清,高血氨132 μmol/L,高乳酸15.1 mmol/L,电解质代谢紊乱,肝功能异常	血:C14、C14: 1、C16、C10↑,提示脂肪酸氧化障碍性疾病:极长链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症(VLCAD)可能性大; 尿:3-羟基异戊酸、戊二酸、4-羟基苯乳酸、4-羟基苯丙酮酸↑	HADHB	NM_000183: exon5: c. 248C>A(p. A83E) <sup>a</sup>	NA	Hom	AR	US	MTPD	生后20 d死亡
15	女	1 d	惊厥,高血氨118 μmol/L	血:阴性; 尿:阴性	GLDC	NM_000170: exon25: c. 2962 C>T(p. R988W); NM_000170: exon20: c. 2405 C>T(p. A802V); NM_000170: exon3: c. 356 C>T(p. T119I) <sup>a</sup>	父亲、母亲、母亲	Het、Het、Het	AR、AR、AR	US、US、US	GCE	失访
16	女	1 d	意识不清,高血氨131 μmol/L,乳酸正常	血:甘氨酸↑,考虑高甘氨酸血症; 尿:-	GLDC	NM_000170: exon4: c. 488C>T(p. P163L) <sup>a</sup> ; NM_000170: exon3: c. 470G>A(p. W157X) <sup>a</sup>	NA、NA	Het、Het	AR、AR	US、LP	GCE	失访
17	女	1 d	惊厥,高血氨106 μmol/L	血:阴性; 尿:-	HSD17B4	NM_000414: exon10: c. 739+1G>T <sup>a</sup> ; NM_000414: exon18: c. 1511_1526dupTG TACC-GCCTCAGTGG(p. D510VfsTer13) <sup>a</sup>	母亲、父亲	Het、Het	AR、AR	LP、P	DBP缺乏症	生后1个月死亡
18	女	1 d	惊厥,高乳酸6 mmol/L,代谢性酸中毒	血:亮氨酸、缬氨酸↑; 尿:乳酸、丙酮酸↑,提示能量代谢障碍,3-羟基戊二酸、2-酮戊二酸↑	DLD	NM_000108: exon11: c. 1189C>A (p. P397T) <sup>a</sup> ; NM_000108: exon14: c. 1465A>G(p. T489A) <sup>a</sup>	父亲、母亲	Het、Het	AR、AR	US、US	DLDD	存活,有间断抽搐
19	女	1 d	高胆红素血症,血小板减少,白细胞计数降低	血:-; 尿:-	SLC25A13	NM_014251: exon1: c.2T>C(p.M1?)	父母	Hom	AR	LP	NICCD	生长发育正常

注:LC-MS/MS:液相色谱-串联质谱检测;GC-MS:气相色谱-质谱检测;“-”未做相关检测;Het:杂合;Hom:纯合;Hemi:半合;AR:常染色体隐性遗传;XLR:X连锁隐性遗传;NA:父母未做Sanger测序,变异来源不明;<sup>a</sup>该变异在HGMD中尚未报道;变异评级依据美国医学遗传学与基因组学学会(ACMG)发布的《序列变异解读标准和指南》,变异按照人类基因组变异协会(HGVS)规则进行命名;P:致病;LP:疑似致病;US:临床意义未明;例9患儿存在IVD基因NM\_002225:exon2:c.158G>C(p.R53P)变异,变异评级为疑似致病,同样的变异在例10患儿中变异评级为致病,系因例10患儿基因检测在例9患儿之后2月余,期间更新了额外的文献证据,故变异评级升级;OTCD:鸟氨酸氨甲酰基转移酶缺乏症;MEGDEL:3-甲基戊二酸尿症伴耳聋、脑病及类Leigh综合征;PA:丙酸血症;MMA:甲基丙二酸血症;IVA:异戊酸血症;CPS1D:氨甲酰磷酸合成酶1缺乏症;MTPD:线粒体三功能蛋白缺乏症;GCE:甘氨酸脑病;DBP缺乏症:D-双功能蛋白缺乏症;DLDD:二氢硫辛酰胺脱氢酶缺乏症;NICCD:Citrin蛋白缺乏所致的新生儿胆内胆汁淤积症

月儿:12 例为适于胎龄儿,7 例为小于胎龄儿(其中 3 例为足月小样低体重儿)。发病年龄为出生后 1(1~2)d。临床表现不典型,存在惊厥、肌张力改变、意识改变等神经系统症状的有 18 例,存在高氨血症的有 17 例(其中血氨 72~300  $\mu\text{mol/L}$  有 8 例,血氨  $\geq 300$   $\mu\text{mol/L}$  有 9 例),存在电解质酸碱平衡紊乱的有 13 例(其中存在高乳酸血症 9 例),存在反复呕吐、肝功能异常、反复不明原因黄疸等消化系统症状的有 10 例,存在白细胞减少、血小板减少等血液系统异常表现的有 8 例。对 19 例新生儿的结局进行随访,失访 3 例,生后 2 个月内死亡 10 例,随访至 2019 年 10 月,存活 6 例,其中生长发育良好、无明显后遗症 4 例。

### 三、质谱及基因检测结果

19 例 IEM 患儿中,有 18 例完善血液 LC-MS/MS 检测,15 例完善尿液 GC/MS 检测。19 例患儿基因检测共检测到基因变异 32 个:移码变异 5 个、终止变异 4 个、错义变异 21 个、起始密码子丢失 1 个、剪切位点变异 1 个。这 32 个基因变异中,已经收录在 HGMD 中的有 15 个。变异评级为致病的有 8 个,疑似致病 11 个,临床意义未明 13 个。完善质谱检测的 18 例患儿中,有 2 例质谱检测为阴性(11.1%):例 15 基因检测提示为甘氨酸脑病(GCE),例 17 基因检测结果为 D-双功能蛋白(DBP)缺乏症。质谱检测提示为继发性代谢异常的有 2 例(11.1%):例 3、例 13,经基因检测分别提示为 3-甲基戊二酸尿症伴耳聋、脑病及类 Leigh 综合征(MEGDEL)以及氨甲酰磷酸合成酶 1 缺乏症(CPS1D)。质谱检测结果为阳性的有 14 例(77.8%),其中 10 例质谱检测提示某种 IEM 可能。这 10 例患儿中,有 2 例患儿基因检测结果与质谱检测结果不一致(11.1%):例 1 质谱检测提示黑酸尿症,例 2 质谱检测提示丙酮酸羧化酶缺乏症,但基因检测结果均为鸟氨酸氨甲酰基转移酶缺乏症(OTCD);另外 8 例最终基因检测结果与质谱检测结果完全一致(44.4%),分别为丙酸血症(PA)1 例(例 5)、甲基丙二酸血症(MMA)2 例(例 7、例 8)、异戊酸血症(IVA)4 例(例 9、例 10、例 11、例 12)、高甘氨酸血症 1 例(例 16)。14 例质谱检测阳性的患儿中,另 4 例患儿质谱检测提示某几种或某一类 IEM,最后经基因检测确定疾病种类(22.2%):例 4 血液 LC-MS/MS 提示枫糖尿病、MMA 或 PA 可能,未完善尿液 GC/MS 检测,而仅凭血液 LC-MS/MS 检测结果无法鉴别 MMA 及 PA;例 6 质谱检测提示需排外酪氨酸血症、MMA 或 PA,最终基因检测确

定为 MMA;例 14 质谱检测提示脂肪酸氧化障碍性疾病,最终基因检测结果为线粒体三功能蛋白缺乏症(MTPD);例 18 质谱检测提示能量代谢障碍,最终基因检测结果为二氢硫辛酰胺脱氢酶缺乏症(DLDD)。

### 四、不同临床表现的 IEM 疾病谱

整理 19 例患儿各临床表现的疾病谱,存在意识不清的有 13 例:其中 3 例为尿素循环障碍(23.1%),8 例为有机酸代谢病(61.5%),1 例为脂肪酸  $\beta$  氧化障碍疾病(7.7%),1 例为氨基酸代谢病(7.7%);存在惊厥的有 9 例:其中 2 例为尿素循环障碍(22.2%),4 例为有机酸代谢病(44.4%),1 例为氨基酸代谢病(11.1%),1 例为脂肪酸  $\beta$  氧化障碍疾病(11.1%),1 例为线粒体能量代谢障碍(11.1%);存在严重高氨血症(血氨  $\geq 300$   $\mu\text{mol/L}$ )合并高乳酸血症的有 6 例:3 例为尿素循环障碍(50.0%),3 例为有机酸代谢病(50.0%),且这 3 例有机酸代谢病中包含 1 例 PA(16.7%),2 例 MMA(33.3%);存在肝功能异常的共 5 例:分别为 2 例有机酸代谢病(40.0%),1 例尿素循环障碍(20.0%),1 例脂肪酸  $\beta$  氧化障碍疾病(20.0%),1 例氨基酸代谢病(20.0%);存在白细胞减少、血小板减少等血液系统异常表现的有 8 例:其中 7 例为有机酸代谢病(87.5%),1 例为尿素循环障碍(12.5%)。

## 讨 论

新生儿期发病的 IEM 通常发病急,进展快,临床表现常缺乏特异性。本研究 19 例 IEM 患儿中,神经系统症状是最常见的临床表现,其中意识不清、自主呼吸弱甚至消失、需要呼吸机辅助通气的患儿常伴随有严重的高氨血症,病情进展迅速,死亡率高,主要出现在尿素循环障碍中的 OTCD、CPS1D 以及有机酸代谢病中的 PA、MMA 及 IVA 这几种疾病的发生发展过程中,这类患儿的成功救治依赖于尽早诊断并进行特殊治疗,因此诊断周期相对较短的质谱检测成为首选。根据临床和生理特征,IEM 通常分为 3 组<sup>[8]</sup>:第一组 IEM 可导致一种物质或化合物的过度积累,见于有机酸代谢病、尿素循环障碍及氨基酸代谢病,这组疾病常常能通过血氨及质谱检测诊断,并且可以治疗;第二组 IEM 直接影响能量代谢,导致代谢活跃的器官出现症状,如线粒体疾病、脂肪酸氧化障碍,这组疾病有些可通过质谱检测提示,有些可以治疗;第三组包括细

胞器中复杂大分子的分解代谢缺陷,如溶酶体贮积紊乱或过氧化物酶体紊乱,这组疾病目前很少能被质谱检测提示,也很少有能治疗的。在本研究中,经过基因检测验证,质谱检测准确诊断的8例患儿(例5、例7、例8、例9、例10、例11、例12、例16)均为第一组IEM中的有机酸代谢病及氨基酸代谢病,而质谱检测提示某几种或某一类IEM、最后经基因检测确定疾病种类的4例患儿中,2例(例4、例6)为第一组中的有机酸代谢病,另2例(例14、例18)属于第二组IEM。治疗方面,在本研究中存活至今且无明显后遗症的4例患儿中,有3例为IVA,均在住院期间质谱检测结果回报后即给予特殊奶粉喂养,因此及时准确的质谱检测对一部分IEM患儿的早期诊断及早期治疗相当重要。

本研究也体现了基因检测在新生儿IEM中应用的重要性。基因检测常用的有两种方法:一种是传统的、更精确的Sanger测序,也称为一代测序,它是对基因的每个片段逐个测序,费时、费力、昂贵;另一种是更先进的下一代测序方法,也称为高通量测序,它可同时测序任意数量的DNA片段,节省了大量的时间和成本,检测基因组范围内包括单碱基变异、插入变异、缺失变异、结构变异、拷贝数变异等遗传变异,并最终筛选出致病变异<sup>[9]</sup>,因此成为大多数基因实验室的标准诊断方法<sup>[10]</sup>。IEM的基因检测始于20世纪90年代<sup>[11]</sup>,至今下一代测序已经成为第二诊断工具<sup>[12]</sup>。本研究中8例患儿的质谱及基因检测结果完全一致,提示对于PA、MMA、IVA这3种有机酸代谢病及氨基酸代谢病GCE,大部分患儿在疾病期完善血液LC-MS/MS及尿液GC/MS检测后,即可以相对快速地得出准确的初步诊断并进行相应的治疗,这时基因检测的意义在于可以进一步明确分型,指导后续治疗及遗传咨询。例如PA及MMA均按缺陷基因的不同而有不同分型,其中MMA的不同分型关系到对维生素B<sub>12</sub>治疗是否有效,而基因突变检测是MMA分型最可靠依据。例1、例2、例3、例13、例15、例17这6例患儿的基因检测结果修正了质谱检测阴性、阳性及继发性改变的结果,例4、例6、例14、例18这4例患儿的基因检测将质谱检测得出的结果进一步具体细化,确定疾病种类并分型,表明下一代测序技术较质谱检测技术具有更高更精确的阳性诊断率,这与既往国内曾报道的结果相符<sup>[13]</sup>。因此仅凭临床表现及质谱检测结果,对于IEM中部分疾病种类难以做出明确的精确的诊断,即使对于理论上应该能检测出的疾

病,也有可能因患者采取标本时的病情状态不同而影响结果准确性,如果基因检测能尽早确诊,则有可能挽救患儿的生命、减少后遗症的发生。例如例15,质谱检测阴性,但基因检测结果回报为GCE后,重阅患儿血液LC-MS/MS结果,发现患儿血中甘氨酸稍高于正常范围,其余成分均在正常范围,因此基因检测避免了质谱检测因代谢产物异常不明显而导致的漏诊;而例1与例2,基因检测结果为OTCD,均与质谱检测结果不一致,回顾这2例患儿的临床表现均病情危重,进展迅速,最终死亡,考虑质谱与基因检测结果不一致是因为质谱检测可因病情危重出现继发性改变而影响结果判定,而OTCD是可治疗的IEM,准确及时的诊断对这类患儿的救治很重要。此外例19未完善质谱检测,但基因检测提示Citrin蛋白缺乏所致的新生儿胆汁淤积症(NICCD),基于此结果患儿一直在我院随诊,目前生长发育良好。因此在IEM诊断中质谱检测有其局限性,而基因检测可协助诊断,并进一步指导治疗、随访。

本研究的局限性:部分患儿或因质谱仪器故障,或因病情危重所限,未能同时完善血液LC-MS/MS检测及尿液GC/MS检测;部分患儿未能完善父母相关基因的Sanger验证,其基因变异来源不明;19例患儿的32个基因变异中,有13个变异评级为临床意义未明的变异,诊断进一步的确定有赖于对患儿的随访及基因变异的功能研究。

综上所述,在新生儿IEM的诊断治疗中,下一代测序检测和质谱检测相辅相成。联合应用两项检测,结合患儿的临床信息,能更精准、及时地诊断、治疗IEM,增加患儿治愈率,减少死亡率及后遗症发生,并对患儿未来疾病的发生发展进行预测、随访、监测,同时可对有不良生育史的家庭提供遗传咨询,以指导优生优育,帮助需要的家庭进行胚胎植入前遗传学诊断。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参 考 文 献

- [1] Fukao T, Nakamura K. Advances in inborn errors of metabolism[J]. *J Hum Genet*, 2019, 64(2): 65. DOI: 10.1038/s10038-018-0535-7.
- [2] Arnold GL. Inborn errors of metabolism in the 21<sup>st</sup> century: past to present[J]. *Ann Transl Med*, 2018, 6(24): 467. DOI: 10.21037/atm.2018.11.36.
- [3] Ezgu F. Inborn errors of metabolism[J]. *Adv Clin Chem*, 2016, 73: 195-250. DOI: 10.1016/bs.acc.2015.12.001. Epub 2016

- Jan 23.
- [4] 王成彬. 质谱技术临床实验室应用[J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(6): 395-398. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-8158.2019.06.001.
- [5] Yubero D, Artuch R. NGS for metabolic disease diagnosis[J]. EJIFCC, 2018, 29(3): 227-229.
- [6] Adams DR, Eng CM. Next-generation sequencing to diagnose suspected genetic disorders[J]. N Engl J Med 2018, 379: 1353-1362. DOI: 10.1056/NEJMra1711801.
- [7] 李剑峰, 严天奇, 崔博文, 等. 基于基因 Panel 测序数据的分析方法[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2017, 37(11): 1574-1580. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8115.2017.11.022.
- [8] Kwon JM. Testing for inborn errors of metabolism[J]. Continuum (Minneapolis), 2018, 24(1): 37-56. DOI: 10.1212/CON.0000000000000563.
- [9] 黎籽秀, 刘博, 徐凌丽, 等. 高通量测序数据分析和临床诊断流程的解读[J]. 中国循证儿科杂志, 2015, 10(1): 19-24. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5501.2015.01.003.
- [10] Bijarnia-Mahay S, Kapoor S. Testing modalities for inborn errors of metabolism - what a clinician needs to know? [J]. Indian Pediatr, 2019, 56(9): 757-766.
- [11] Levy HL, Albers S. Genetic screening of newborns[J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2000, 1: 139-177. DOI: 10.1146/annurev.genom.1.1.139.
- [12] Ghosh A, Schlecht H, Heptinstall LE, et al. Diagnosing childhood-onset inborn errors of metabolism by next-generation sequencing[J]. Arch Dis Child, 2017, 102(11): 1019-1029. DOI: 10.1136/archdischild-2017-312738.
- [13] 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. DOI: 10.3760 / cma. j. issn.2095-428X.2015.22.011.

(收稿日期: 2019-12-11)

(本文编辑: 张媛)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 《中华医学杂志》启用新版远程稿件管理系统

自 2019 年 1 月 7 日起,《中华医学杂志》已经启用新版远程稿件管理系统,旧版系统已经关闭投稿功能。新系统网址: <http://cmaes.medline.org.cn>。

1. 作者登录方式: 新版远程稿件管理系统和中华医学网、中华医学期刊网及中华系列期刊官方网站共用同一套用户系统。如果您从未在上述网站注册过,那么您需要先行注册账号,以便在新版系统中顺利完成投稿、退修、上传作者校样、缴纳费用等操作,并享受后续增值服务。如果您曾经在上述网站注册过,您可直接用原有账号登录新版远程稿件管理系统,选择成为本刊作者,继续愉快的码字之旅。

2. 审稿专家登录方式: 如果您还记得旧版系统的登录名和密码,那么可直接尝试登录,查看您的相关学术信息是否完整(请务必将您的学术领域补充完整,以便能准确送审)。不记得登录名时,用手机号或 Email 也可以登录。如果您是本刊的审稿专家,但系统上未显示,请您及时反馈给编辑部。如果您登录时提示密码不正确,您可以尝试通过验证手机号或 Email 重置您的密码,请牢记重置后的密码。如果您登录时提示用户名不正确,说明您的原始信息中没

有登记正确有效的手机号或 Email 信息,请您将遇到的问题,以及您的姓名、单位、用户名、手机号、Email 等信息反馈给编辑部。

3. 《中华医学杂志》投稿方式: 本刊作者可通过本刊官网 <http://www.nmjc.net.cn> 中的“在线投稿”,或者新系统网站 <http://cmaes.medline.org.cn> 进行在线投稿。

4. 注意事项: 新系统运行期间,无论是作者还是专家,可能都会感到一些不便,编辑部诚恳地希望得到各位作者与专家的理解和支持,以便帮助我们尽快地完成新旧系统的过渡。另外,希望各位用户(包括专家和作者)尽可能亲自注册并使用您的账号。后续的很多采编流程,包括涉及费用的步骤均将在手机端实现,新版远程稿件管理系统与中华医学期刊网和配套的 APP 使用同一套用户系统,未来以“中华医学期刊 APP”为载体的论文认领、学术积分和社交功能也在策划中,新版系统的账号可能超越一个投稿审稿工具,而成为您的“学术护照”,我们期待那一天的早日到来。

5. 账号问题反馈邮箱: [newmedia@cma.org.cn](mailto:newmedia@cma.org.cn)。