

串联质谱技术测定C5酰基肉碱水平在新生儿短链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症筛查中的应用

宋燕红¹, 张琪², 容翠环¹, 林贞^{3*} (1. 江门市新会区第二人民医院妇女儿童保健科, 广东江门 529100; 2. 江门市新会区妇幼保健院儿科, 广东江门 529100; 3. 江门市新会区妇幼保健院儿童保健科, 广东江门 529100)

摘要: **目的** 了解串联质谱技术测定C5酰基肉碱水平在新生儿短链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症(SCADD)筛查中的作用。**方法** 选取2015年1月至2020年6月江门地区出生且自愿接受串联质谱技术筛查的新生儿81 452例,以C5酰基肉碱截止值 $\geq 0.44 \mu\text{mol/L}$ 作为SCADD的鉴定标准。随机抽取1 130例新生儿干血样筛查标本进行突变分析以确定新生儿短/支链酰基辅酶A脱氢酶(ACADSB)基因c.1165 A>G突变的患病率。**结果** 81 452例新生儿中共检测出97例C5酰基肉碱截止值 $\geq 0.44 \mu\text{mol/L}$,其中SCADD 92例,异戊酸血症(IVA) 5例。1 130例汉族新生儿筛查样本中,876例(77.5%)为野生型,248例(22.0%)为杂合子,6例(0.5%)为常见c.1165 A>G突变纯合子。ROC曲线结果显示,C5酰基肉碱浓度截止值为 $0.44 \mu\text{mol/L}$ 时的敏感度和特异度分别为60.0%和100.0%。**结论** 串联质谱技术测定C5酰基肉碱水平能够准确筛查SCADD,且有助于区分SCADD和IVA。

关键词: 短链/支链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症; 2-甲基丁酰-辅酶A脱氢酶缺乏症; 新生儿筛查; 异戊酸血症
中图分类号: R 722.11 **文献标志码:** A **文章编号:** 2096-3610(2021)06-0729-03

Screening of C5 acylcarnitine level determined by tandem mass spectrometry in neonatal short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency

SONG Yan-hong¹, ZHANG Qi², RONG Cui-huan¹, LIN Zhen^{3*} (1. Department of Women and Child Healthcare, the Second People's Hospital of Xinhui, Jiangmen 529100, China; 2. Department of Pediatrics, Maternity and Child Health Hospital of Xinhui, Jiangmen 529100, China; 3. Department of Child Healthcare, Maternity and Child Health Hospital of Xinhui, Jiangmen 529100, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of C5 acylcarnitine level determined by tandem mass spectrometry in neonatal short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (SCADD). **Methods** A total of 81,452 newborns screened by tandem mass spectrometry from January 2015 to June 2020 in Jiangmen were selected as subjects, with the C5 acylcarnitine cutoff value $\geq 0.44 \mu\text{mol/L}$ as the criteria for the determination of SCADD. Mutation analysis was performed to determine the prevalence of short/branched chain acyl-CoA dehydrogenase (ACADSB) gene c.1165 A>G mutation in the dry blood samples of 1,130 newborns. **Results** Among 81,452 newborns, 97 had the C5 acylcarnitine cutoff value $\geq 0.44 \mu\text{mol/L}$, of which there were 92 cases with SCADD and 5 cases with isovaleric acidemia (IVA). Among the screening samples in 1 130 Chinese newborns, 876 cases (77.5%) were wide type, 248 cases (22.0%) were heterozygous, and 6 cases (0.5%) were homozygous with common c.1165 A>G mutation. The ROC curve showed that the sensitivity and specificity were 60% and 100% when the C5 acylcarnitine cutoff value was $0.44 \mu\text{mol/L}$. **Conclusion** C5 acylcarnitine level determined by tandem mass spectrometry can accurately screen out SCADD and help to distinguish SCADD from IVA.

Key words: short chain/branched chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency; 2-methylbutyrate acyl-CoA dehydrogenase deficiency; neonatal screening; isovaleric acidemia

短链/支链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症(SCADD)是一种脂肪酸氧化代谢障碍疾病,主要表现为神经发育障碍^[1-2]。在新生儿筛查中,由于异戊酰肉碱的荷电

质量和2-甲基丁酰肉碱相同,通过串联质谱筛查SCADD时,异戊酸血症(IVA)中的C5酰基肉碱、C5/C3和C5/C2比例也会提高,导致假阳性率增加^[3]。研究发现,在中国人群中发现的SCADD病例与短/支链酰基辅酶A脱氢酶(ACADSB)基因c.1165a>G突变有关^[4]。鉴于此,本研究采用串联质谱技术检测江门地区新生儿SCADD患病率和c.1165A>G突变的携带

收稿日期: 2021-03-19; 修订日期: 2021-07-10

作者简介: 宋燕红(1985-),女,本科,主治医师

通信作者: 林贞(1978-),女,本科,副主任医师

率,判断阳性 SCADD 新生儿携带的 c.1165A>G 突变是否相同,评估 C5 酰基肉碱截止值以区分 SCADD 和 IVA。

1 资料和方法

1.1 研究对象

选取 2015 年 1 月至 2020 年 6 月江门地区出生且自愿接受串联质谱技术筛查的新生儿 81 452 例。

1.2 方法

SCADD 的确定诊断方法为检测皮肤纤维细胞中脂肪酸的代谢状况。本研究新生儿筛查使用非衍生串联质谱技术,以 C5 酰基肉碱截止值 $\geq 0.44\text{ }\mu\text{mol/L}$ 作为 SCADD 婴儿的筛查标准。通过在尿液酰基甘氨酸分析中检测到 2-甲基丁酰甘氨酸或在定量尿液有机酸分析中检测到 2-甲基丁酸升高确定 SCADD 诊断^[9]。随机抽取 1 130 例(未标记 C5 酰基肉碱浓度 $\geq 0.44\text{ }\mu\text{mol/L}$)新生儿中的干血样筛查标本进行突变分析,以确定新生儿 c.1165 A>G 突变的患病率和携带频率。

1.3 ACADSB c.1165 A>G 突变分析

采用 DNA 纯化液和 DNA 洗脱液(美国 Qiagen 公司)从干血样筛查标本中提取基因组 DNA,然后转移到 25 μL 试管中进行 PCR 反应。PCR 产物位于 ACADSB c.1165A>G 位点侧面,大小为 260 bp。将 10 μL PCR 产物与限制性内切酶 BtsC I 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 2 h,随后在 3% 琼脂糖凝胶中电泳。野生型片段裂解为 59 bp 和 201 bp 两个片段,而 ACADSB c.1165 A>G 突变无 BtsC I 识别位点,PCR 产物仍为 260 bp。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件处理数据。通过绘制受试者操作曲线(ROC)评估串联质谱检测时以 C5 酰基肉碱浓度为 $0.44\text{ }\mu\text{mol/L}$ 作为截止值时的特异性和敏感性。利用 Hardy-Weinberg 方程预测江门地区新生儿中 ACADSB c.1165 A>G 的纯合性和杂合性。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

81 452 例新生儿中共检测出 97 例 C5 酰基肉碱

截止值 $\geq 0.44\text{ }\mu\text{mol/L}$,其中 IVA 5 例,SCADD 92 例。92 例 SCADD 确诊病例中,出生后(47 $\pm$ 7)h 进行初筛,收集的血液样本中 C5 酰基肉碱浓度为(0.69 $\pm$ 0.03) $\mu\text{mol/L}$ (0.44~2.05 $\mu\text{mol/L}$)。出生后(527 $\pm$ 66)h 复查,C5 酰基肉碱浓度为(1.24 $\pm$ 0.06) $\mu\text{mol/L}$ (0.52~3.56 $\mu\text{mol/L}$)。两次筛查中,分别有 13 名和 73 名 C5/C3 和 C5/C2 比值升高。5 例 IVA 患者出生后(32 $\pm$ 9) h 进行初筛,C5 酰基肉碱浓度为(3.18 $\pm$ 0.37) $\mu\text{mol/L}$ (2.41~4.15 $\mu\text{mol/L}$)。92 例 SCADD 确诊病例中,74 例(80.4%)进行了 ACADSB c.1165 A>G 突变分析,其中,69 个为纯合子(93.2%),3 个为杂合子(4.1%),另外 2 个为野生型(2.7%)。

2.2 新生儿筛查分析

1 130 例汉族新生儿筛查样本中,876 例(77.5%)为野生型,248 例(22.0%)为杂合子,6 例(0.5%)为常见 c.1165 A>G 突变纯合子,见表 1。基于 Hardy-Weinberg 方程预测的纯合性和杂合性分别为 0.5% 和 22.0%。ROC 曲线结果显示,C5 酰基肉碱浓度截止值为 $0.44\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时的敏感性和特异性分别为 60.0% 和 100.0%。截止值降至 $0.20\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时可以检测到所有新生儿纯合子 c.1165A>G 突变,但出现 74 个假阳性,及 5 个真阳性未被发现。截止值从 0.44 增至 $0.60\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时,筛查阳性数目从 9 个减少到 7 个,敏感性从 60.0% 降低至 46.7%。以 C5 酰基肉碱浓度截止值 $>0.60\text{ }\mu\text{mol/L}$,及 C5/C2 和 C5/C3 比值 <1.0 时每年筛查阳性的数量会进一步减少到 5 个。见表 2。

3 讨论

本研究旨在估计江门地区汉族婴儿 SCADD 的患病率,确认人群中 SCADD 与 c.1165 A>G 突变的关系。很显然,如果诊断是基于 c.1165A>G 突变的纯合性检测,SCADD 的发病率很高,约为每 1 000 例新生儿中有 13 例。本研究的一个重要优势是以一个大的人口为基础的新生儿筛查样估计 c.1165 a>G 突变的患病率以及不同 C5 浓度截止值对检测该突变的有效性,从而保证结果的准确性。但是,一个重要的限制是该分析仅限于鉴定 c.1165 A>G 突变,并且分析仅限于匿名新生儿筛查样本,不包括与 SCADD 或 c.1165 A>G 突变相关的临床结果信息。

表 1 江门地区 1 130 份汉族新生儿筛查样本中的 ACADSB c.1165 A>G 突变分析

c.1165 A>G 突变	<i>n</i>	C5 酰基肉碱/($\mu\text{mol/L}$)	估计率/1 000 新生儿
纯合子	6	0.68 $\pm$ 0.12 (95%CI:0.42~0.93)	5.3% (95%CI:7.7~22.2)
杂合子	248	0.13 $\pm$ 0.00 (95%CI:0.12~0.13)	217.7% (95%CI:194.3~243.1)
野生型	876	0.10 $\pm$ 0.00 (95%CI:0.10~0.11)	769.1% (95%CI:743.3~793.1)

表2 不同C5酰基肉碱截止值筛查江门地区汉族婴儿c.1165A>G突变纯合性的结果分析

C5截止值/(μmol/L)	特异性/%	敏感性/%	每年阳性筛查数	预计每年假阳性筛查数	预计每年假阴性筛查数
≥0.20	93.4	100.0	89	74	0
≥0.44	100.0	60.0	9	0	6
≥0.60	100.0	46.7	7	0	8
≥0.60且C5/C2和C5/C3比值提高<1.0	100.0	33.3	5	0	10

由于异戊酰肉碱与2-甲基丁酰肉碱难以区分,因此C5浓度、C5/C3和C5/C2比值升高也可能是IVA的标志^[6-7]。虽然SCADD的临床结果尚不清楚,但众所周知IVA在婴儿早期会引起代谢性酸中毒,通常需要长期饮食管理^[8-9]。因此,区分这两种疾病很重要。本研究样本中,诊断为SCADD或IVA婴儿的初始C5浓度值存在相当大的重叠。其中,IVA的C5酰基肉碱浓度范围为0.68~19.0 μmol/L,表明C5酰基肉碱截止值需要设定在0.68 μmol/L以下,以防止错过IVA的潜在阳性筛选。本研究中当C5酰基肉碱截止值为0.44 μmol/L时有6名c.1165A>G纯合突变的婴儿未被检测到,表明汉族SCADD婴儿的C5值范围更大。为检测出所有纯合突变的婴儿,需将C5截止值降至0.20 μmol/L。在该临界值下,特异性会下降到93.4%。

此外,本研究结果提示串联质谱技术测定C5酰基肉碱水平有助于区分SCADD和IVA。初始筛查为SCADD的92名患者中仅13名的C5/C2和C5/C3比值分别高于既定的0.05 μmol/L和0.50 μmol/L,而初始筛查为IVA的患者全都满足,因此初始筛查中C5/C2和C5/C3比值无升高表明更可能为SCADD。若筛查C5≥0.60 μmol/L且C5/C2和C5/C3比值提高<1.0 μmol/L,则认定为SCADD阴性,该策略将C5酰基肉碱的升高数量减少了80%。但是为了防止使用这些更严格的标准无法识别IVA,可以期望每年平均有5个纯合c.1165 A>G突变的婴儿仍能筛查阳性,因此需要进一步诊断检测以排除IVA^[10-11]。

参考文献:

[1] 沈玉燕,黎剑,肖刚.怀化地区79 205例新生儿短链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症筛查结果分析[J].中国优生与遗传杂志,2018,26(7):79-80.
[2] 陆妹,杨艳玲.多种酰基辅酶A脱氢酶缺乏症的诊疗进展

[J].中国实用儿科杂志,2019,34(1):19-22.
[3] SARKER S K, ISLAM M T, HASIB S H, et al. A novel mis-sense mutation of Isovaleryl-CoA dehydrogenase gene associated with chronic intermittent Isovaleric acidemia in a Bangladeshi patient[J]. Meta Gene, 2019, 20:100557.
[4] LIN Y, GAO H, LIN C, 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.
[5] 陈小娜,肖珮.串联质谱在高危新生儿遗传代谢病筛查中应用分析及基因突变情况分析[J].现代诊断与治疗,2020,31(20):3257-3259.
[6] IBARRA-GONZÁLEZ I, FERNÁNDEZ-LAINEZ C, GUILLÉN-LÓPEZ S, et al. Molecular analysis using targeted next generation DNA sequencing and clinical spectrum of Mexican patients with isovaleric acidemia[J]. Clin Chim Acta, 2020, 501:216-221.
[7] ADHIKARI A N, CURRIER R J, TANG H, et al. Genomic analysis of historical cases with positive newborn screens for Short-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase deficiency shows that a validated second-tier biochemical test can replace future sequencing[J]. Int J Neonatal Screen, 2020, 6(2):41.
[8] 石海杰,王洁,赵振东.海南省277例孤独症谱系障碍患儿的遗传代谢病分析[J].中华医学遗传学杂志,2019,36(9):870-873.
[9] 周伟,李惠中,王传霞,等. NICU新生儿异戊酸血症串联质谱技术筛查异常情况的临床研究[J].中国优生与遗传杂志,2018,26(6):82-84.
[10] SUZUKI Y, ITO S, OTANI Y, et al. Unexpected elevation in valproic acid concentration and agranulocytosis in a patient with short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency[J]. Brain Dev, 2021, 1(4):98-104.
[11] LIN Y, ZHANG W, CHEN D, et al. Newborn screening and genetic characteristics of patients with short-and very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiencies[J]. Clin Chim Acta, 2020, 510:285-290.