

临床检验通讯

2020 年第 3 期

2020 年 12 月 23 日

主办：检验科

主编：陈葳 副主编：王亚文

一、液相色谱-串联质谱技术在临床诊断中的应用

1906 年 J.J.Thomason 发明了质谱 (mass spectrometry, MS) 技术, 经过百年的发展, 质谱技术已成为分析化学、制药、生物和医学等领域的重要分析手段。最早应用于临床样本检测的质谱系统是对蛋白质、核酸等生物大分子进行检测的 MALDI-TOF MS 系统, 主要用于对样本中的细菌、真菌等微生物进行鉴定。近年来国内越来越多的医疗机构开始将用于检测有机小分子物质的液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 系统引入临床实验室, 开始对代谢物、维生素、激素等物质进行定量检测。LC-MS/MS 系统在各种分析化学、环境学、药学及生物学实验室是一种专属性强、快速、灵敏度高的现代化高级分析技术, 主要应用于复杂背景下目标化合物的准确定量测定。2015 年美国奥巴马率先提出了精准医疗的理念, 液相色谱-串联质谱联用技术由于其高灵敏度、高特异性、低检测限、样本用量少、高通量、检测速度快、样本前处理简单等优势, 开始广泛应用于临床分析的众多领域, 并成为很多分析物检测的金标准。LC-MS/MS 在欧

临床检测的项目已达 400 余项, 涉及产前检查、新生儿筛查、滥用药物监测、代谢物检查 (氨基酸、脂肪酸、胆汁酸、有机酸)、类固醇激素检测 (内分泌)、维生素族检测、儿茶酚胺类物质检测、继发性高血压筛查等领域。同时, 在蛋白组学研究方面, LC-MS/MS 也正在慢慢实现从科研转化到临床应用。随着 2015 年我国科技部和国家卫生计生委对于“精准医疗”概念的提出和批示, 质谱基于其技术本身的优势, 渐渐的被全国各大三甲医院引入日常检验项目中。

我院检验科于 2019 年引入 AB SCIEX Triple Quad™ 4500MD 串联质谱仪, 本文就该设备的检测原理以及目前已开展的项目做一简单介绍。



图 1 检验科装备的 AB SCIEX Triple Quad™ 4500MD 串联质谱仪

(一) 质谱原理与液相色谱-三重四极杆串联质谱技术

质谱主要是将被测物质分子电离成各种质荷比 m/z 不同的带电粒子，然后应用电磁学原理，使这些带电粒子按照质荷比大小的空间或时间上产生分离排列成的图谱，通过测定粒子峰的强度，以此获得确定化合物的分子量、分子式。串联质谱是由 2 个质谱仪经 1 个碰撞室串联而成，来实现对待测物的定性，通过样品加入定量同位素内标实现定量检测。质谱仪主要由进样部分、离子源、质量分析器、检测器和数据分析系统等部分组成。

利用液相色谱具有优越的分离功能，将生物样品中不同化合物组分在色谱分离柱上进行分离，被分离的化合物组分按照先后顺序依次送入后端质谱检测仪产生相应的检测信号，便组成了液相色谱-串联质谱检测系统。其中，以四级杆质量分析器串联而成的三重四级杆串联质谱仪，因其高灵敏度、高选择性、高重现性的特点，在临床应用中最为广泛。



图 2 三重四级杆串联质谱的内部结构模式图

(二) 液相色谱-串联质谱工作方式及流程

生物样品经液相色谱分离完成后，不同化合物会按照一定的顺序依次进入质谱离子源，然后在离子源中发生电离和雾化气化，形成气态离子。由于不同的化合物可以形成不同质荷比 m/z 的气态离

子，而这些带电离子进入四极杆质量分析器后会在电场或磁场作用力下形成不同的运动轨迹。通过仪器参数设定，可以只让特定质荷比 m/z 的目标离子以稳定的运动轨迹顺利穿过四极杆并最终到达检测器产生信号，而非目标离子在运动的过程中会发生偏转从侧壁飞出，进而实现对样品中的目标化合物进行定性和定量分析。

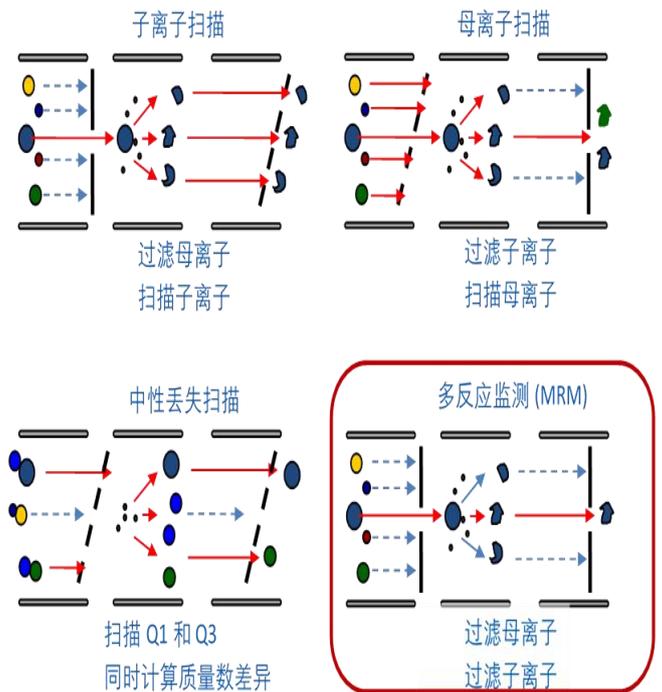


图 3 串联质谱 (MS/MS) 的工作模式图

(三) 检验科液相色谱-串联质谱检测平台上已开展的检验项目

1 维生素检测

维生素家族成员众多，按其溶解性质不同可分为脂溶性维生素和水溶性维生素两大类。脂溶性维生素包括维生素A、维生素D（活性维生素D主要为维生素D2和维生素D3）、维生素E、维生素K共4种；水溶性维生素包括维生素B1、维生素B2、维生素B3、维生素B5、维生素B6、维生素B7、5-甲基四氢叶酸及甲基丙二酸等。

维生素在人体的生长、发育、代谢等过程中发挥着重要作用。是人体代谢中必不可少的有机化合物，多数维生素人体自身不能合成或仅能少量合成，因此有维生素缺乏的风险。由于维生素家族成员众多，涉及机体代谢的多条途径，因此不同的维生素缺乏，对机体的健康的影响也不相同。

维生素缺乏引起的临床表现不特异且不易察觉，因此在出现典型的维生素缺乏症所引起的临床表现之前，维生素摄入不足或吸收障碍已经造成机体一系列不同程度的细胞代谢障碍及功能受损或疾病。明确机体维生素的水平是进行临床治疗干预及营养评价的重要组成部分。

维生素摄入或补充量超过了人体每日所需标准，长期大量补充维生素，也会对机体的健康产生一定的危害。虽然水溶性维生素能够通过尿液排出体外，但大量服用仍可损伤人体器官。脂溶性维生素如维生素A、维生素D等摄入过量，并不能通过尿液直接排出体外，容易在体内蓄积中毒。

由于维生素缺乏的临床表现现在时间上及特异性上都不易察觉，因此维生素缺乏依然是现在医学的盲点，如何科学补充维生素更是临床长久以来悬而未决的难题。

目前临床上对特定维生素的检测多数采用免疫学的原理，利用抗原抗体特异性结合的原理检测样本中待测维生素的含量，由于共同抗原决定簇的存在，因此抗原与抗体在识别是存在一定的交叉反应。由于维生素家族成员复杂，即便同一种维生素也存在多种结构相似的形式，如维生素D2与D3，因此利用免疫学方法检测维生素时存在一定的交叉干扰现象，给临床检测的结果判断带来一定的困扰。此外由于维生素发挥生物学活性具有一定的协

同性即多种维生素共同参与调解体内的代谢过程，但由于目前临床常用的检测手段都是只能检测一种特定的维生素在样品中的含量，无法同时检测样本中多种维生素的含量，因此对于临床综合判断带来一定的不便。

利用LC-MS/MS同时定性定量检测水溶性或脂溶性维生素的多种维生素，该方法快速准确、可靠，能准确检测人体内维生素的真实水平，为早期发现维生素缺乏提供高灵敏度的手段；为更安全、有效、合理地科学补充维生素提供明确检测依据。

1.1 维生素D定量测定

维生素D（简称VD）是一种脂溶性维生素，是环戊烷多氢菲类化合物，一组结构上与固醇有关，功能上可防止佝偻病的维生素，最主要的是维生素D3与D2。前者由人皮下的7-脱氢胆固醇经紫外线照射而成，后者由植物或酵母中含有的麦角固醇经紫外线照射而成。维生素D的主要功用是促进小肠粘膜细胞对钙和磷的吸收。肠中钙离子吸收需要一种钙结合蛋白，1, 25-二羟基维生素D3可诱导此蛋白合成，促进Ca²⁺吸收，又可促进钙盐的更新及新骨生成，也促进磷吸收与肾小管细胞对钙、磷的重吸收，故可提高血钙、血磷浓度，有利于新骨生成和钙化。

此外维生素D还有促进皮肤细胞生长、分化及调节免疫功能作用。一般成年人经常接触日光不致发生VD缺乏，婴幼儿、孕妇、乳母及不常到户外活动的老人要增加维生素D供给量到每日10μg（相当于400国际单位）。

缺乏维生素D儿童可患佝偻病，成人患骨质疏松症。VD缺乏还可能与某些癌症、心血管疾病、自身免疫性疾病和感染性疾病的发病风险具有显

著的相关性。中国由于受饮食结构和衣着习惯的影响，VD缺乏率较欧美国家更为严重，一项由50-70岁之间的中国人参加的研究表明94%的人维生素D缺乏或不足，这些人中有42%合并代谢综合征。其他一些研究表明，维生素D缺乏和不足在中国的孕妇以及6-16岁的儿童中也很常见。

利用LC-MS/MS检测是定量测定VD的金标准方法，其不仅特异性强、灵敏度高、不易受内外源性物质干扰，而且还能分别检测人体中D2和D3的含量，可指导临床合理补充维生素D：即补充25羟基D2或D2制剂后，可通过血清中25羟基D2含量评判补充效果，如25羟基D2补充效果不佳，可转为补充25-羟基D3或D3制剂，并评判制剂补充效果。

1.2 维生素A定量测定

维生素A (Vitamin A) 又称视黄醇 (retinol) 或抗干眼病因子。多存在于动物的肝脏中，植物来源的 β -胡萝卜素 (β -carotene) 及其他胡萝卜素可在人体内合成维生素A， β -胡萝卜素的转换效率最高。维生素A在人体具有广泛而重要的生理功能，概括起来主要包括视觉、细胞增殖分化调节、细胞间信息交流和免疫应答这几个方面，其缺乏会导致的生理功能异常和病理变化。

维生素A经典的或最早被认识的功能是在视觉细胞内参与维持暗视感光物质循环。视网膜上的杆状细胞含有的视紫红质，是由11-顺式视黄醛与视蛋白结合而成，其对暗光敏感。视紫红质感光后，11-顺式视黄醛转变为全反式视黄醛并与视蛋白分离，产生视觉电信号。解离后的全反式视黄醛在杆状细胞内被还原为全反式视黄醇，被转运到视网膜色素上皮细胞，与来自血浆的全反式视黄醇一起，开始复杂的异构化过程，参与重新合成视紫红质所

需的11-顺式视黄醛的供应，维持暗光适应。因此要维持良好的暗光视觉，就需要源源不断地向杆状细胞供给充足的11-顺式视黄醛。维生素A缺乏时，11-顺式视黄醛供给减少，暗适应时间延长。

VA除维持正常视力的生理作用外，还是调节糖蛋白合成的一种辅酶，对上皮细胞的细胞膜起稳定作用，维持上皮细胞的形态完整和功能健全。VA缺乏会造成上皮组织干燥。此外，目前的研究认为其还在维持和促进免疫功能、促进生长发育和维持生殖功能、促进血红蛋白生成，增加食物中铁的摄取等方面具有重要的生理作用。

另外还有研究表明，VA与骨质代谢存在密切的关系。维生素A缺乏可使破骨细胞数目减少，成骨细胞的功能失控，导致骨膜骨质过度增生，骨腔变小。维生素A过量对骨矿物化和结构完整性的不良影响，更成为近来关注的问题。过量维生素A可刺激骨的重吸收，并抑制骨的再形成。这种影响可能与慢性维生素A中毒时的高钙血症有着共同的机制。

LC-MS/MS检测VA，由于特异性强、灵敏度高、不易受内外源性物质干扰，检测性能远超传统的生化法或免疫法检测，是定量检测VA的最佳方法。

1.3 维生素E定量测定

维生素E (Vitamin E) 是一种脂溶性维生素，是存在于人体中最重要的抗氧化剂之一。它是一组包括生育酚和生育三烯酚的化合物的统称。生育酚主要有四种衍生物，按甲基的数量和位置分为 α 、 β 、 γ 和 δ 四种。其中 α -生育酚 (α -tocopherol) 活性最强，是人体血清或血浆检测的目标化合物。维生素E具有促进性激素分泌、缓解更年期综合征、修复烧

伤冻伤、美容、使男子精子活力和数量增加、防治男性不育症、使女子雌性激素浓度增高、提高生育能力、预防流产、抑制眼睛晶状体内的过氧化脂反应、预防近视眼发生和加剧的作用。

目前 VE 的定量测定主要依赖气相色谱或 LC-MS/MS，其中 LC-MS/MS 的临床应用较为普遍。

1.4 维生素检测的标本送检流程

检验科目前主要开展了水溶性维生素（B1、B2、B3、B5、B6、B9、MMA）和脂溶性维生素（A、D2、D3、E）的检测。每项维生素的收费均为 77 元。抽血均用促凝管或普通干燥管抽血 3mL 送检验科检验。检验报告发放时间为标本送检的次日上午 12:00 前。

2 儿茶酚胺神经类物质检测

2.1 儿茶酚胺

儿茶酚胺（Catecholamine, CA）是一种含有儿茶酚和胺基的神经类物质。儿茶酚胺包括去甲肾上腺素（NE）、肾上腺素（E）和多巴胺（DA）。儿茶酚胺在体内调节基本生理功能，传递生理信号，是正常生理过程中重要的信号介质，同时在病理过程中也出现其含量的相应变化。儿茶酚胺的含量与肾上腺髓质瘤密切相关，这些肾上腺髓质瘤会结合大量儿茶酚胺导致循环失常；儿茶酚胺含量过高会引发高血压和心脑血管事件，含量过低则通常导致低血压。准确检测体内儿茶酚胺的含量，在临床上可以用于辅助诊断高血压、甲亢、嗜铬细胞瘤和神经母细胞瘤等内分泌相关疾病。

2.2 嗜铬细胞瘤及副神经节瘤

嗜铬细胞瘤及副神经节瘤是少见的神经内分泌嗜铬细胞产生的肿瘤，主要释放儿茶酚胺，肾上腺

组织来源约占 80%~85%，15%~20% 来源于脊柱旁交感神经链上的神经节。嗜铬细胞瘤在高血压病人中患病率为 0.05%~0.2%，发病高峰为 20~50 岁。嗜铬细胞瘤位于肾上腺者占 80%~90%，且多为一侧性；肾上腺外的瘤主要位于腹膜外、腹主动脉旁。多良性，恶性者占 10%。与大部分肿瘤一样，散发型嗜铬细胞瘤的病因仍不清楚。家族型嗜铬细胞瘤则与遗传有关。嗜铬细胞瘤的临床症状及体征个体差异甚大，与儿茶酚胺分泌过量有关，多有高血压、头痛、心悸、高代谢状态、高血糖等，重型患者甚至可导致突发恶性高血压、心衰或脑出血等。

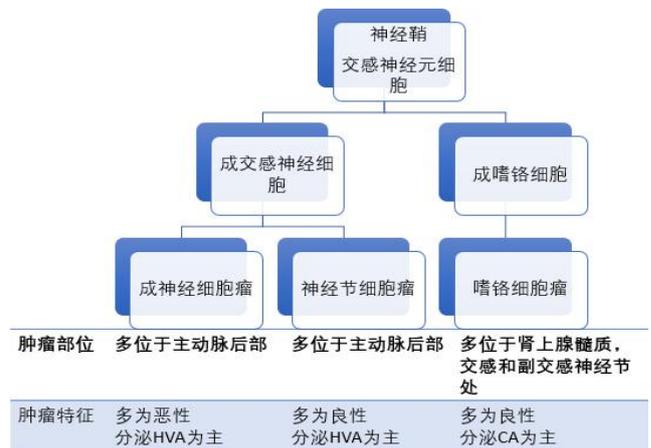


图 4 嗜铬细胞瘤和交感神经节细胞瘤

2.3 嗜铬细胞瘤及副神经节瘤实验室诊断

嗜铬细胞瘤患者尿中儿茶酚胺（CA）、香草扁桃酸（VMA）、3-甲氧基肾上腺素（MN）和甲氧基去甲肾上腺素（NMN）及其总和（TMN）均可升高。血浆儿茶酚胺值在本病持续或阵发性发作时可明显高于正常，但仅反映取血样即时的血儿茶酚胺水平，发作期 24 小时尿中儿茶酚胺水平可反应患者基础儿茶酚胺水平，测定更有临床意义。

国内现多采用酶联免疫法（EIA）、HPLC 法或层析柱法测量 CA 或其代谢产物 VMA。美国内分泌协会 2014 年最新发布《嗜铬细胞瘤与副神经节

《肿瘤临床实践指南》明确指出：由于嗜铬细胞瘤对 CA 呈阵发性释放以及其半衰期短等原因，因此 CA 不适合作为生物标志物；EIA 检测 CA 类物质由于灵敏度和特异性不理想，因此不作为推荐的检测方法。指南中指出 15 家独立研究所的研究表明，灵敏度和特异性最高的标志物是尿液中游离的儿茶酚胺代谢物质，包括变肾上腺素（MN）、去甲变肾上腺素（NMN），其灵敏度高达 97%，超出了其它标志物约 47%~74%，一些报道检测尿 CA 和 VMA 诊断嗜铬细胞瘤出现了假阴性结果，但是通过测定 MN/NMN 的方法提高了诊断的准确性。推荐的检测方法为：LC-MS/MS 法。

2.4 儿茶酚胺神经类物质检测的标本送检流程

我院检验科目前利用现有的 LC-MS/MS 检测平台能够测定的儿茶酚胺类物质主要有：儿茶酚胺类化合物（CAs），包括去甲肾上腺素（NE）、肾上腺素（E）和多巴胺（DA）；儿茶酚胺代谢产物，包括甲氧基肾上腺素（MN）、甲氧基去甲肾上腺素（NMN）、3-甲氧酪胺（3-MT）、高香草酸（HMA）和香草扁桃酸（VMA）。每项收费均为 38 元。标本为 24h 尿液，留尿无需使用特殊容器，具体留尿方法同 24 小时尿蛋白定量检测。标本送检时用尿常规管乘装 10-15mL 24h 尿液，并于尿管上注明 24h 总尿量（mL）即可送检。检验报告发放时间为标本送检后三个工作日内。

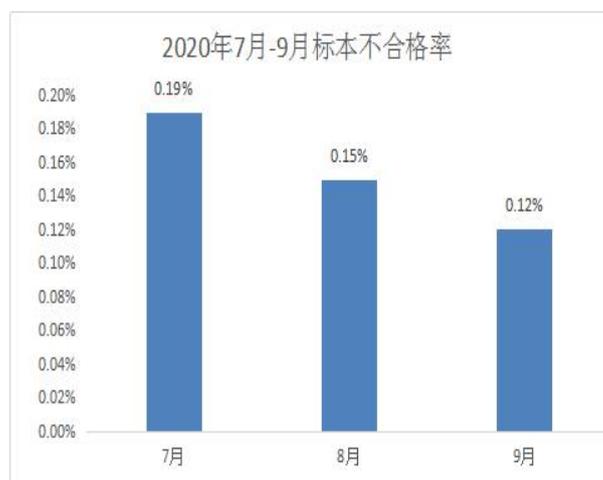
二、2020 年第 3 季度不合格标本统计分析报告

1. 检验科 2020 年第三季度总接收标本总数为 788213 份标本，不合格标本数为 1210 份标本，占总标本比率为 0.15%，其中 7 月接收标本数为

244757 份标本，不合格标本数为 467 份标，占标本的比率为 0.19%；8 月接收标本数为 238748 份标本，不合格标本数为 370 份标，占标本的比率为 0.15%；9 月接收标本数为 304708 份标本，不合格标本数为 373 份标，占标本的比率为 0.12%。

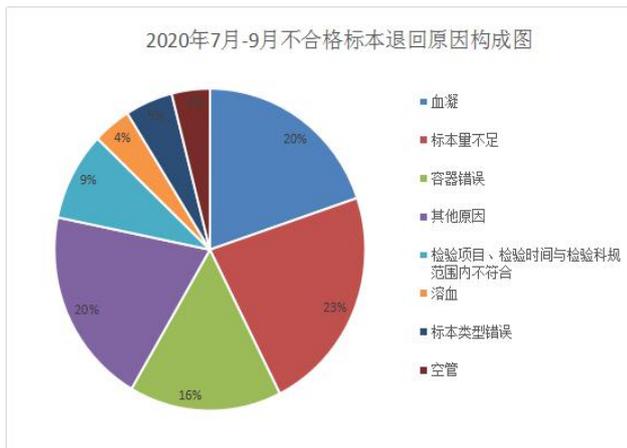


2020 年 7 月-9 月不合格标本率分别为 0.19%，0.15%，0.12%，有明显的下降。

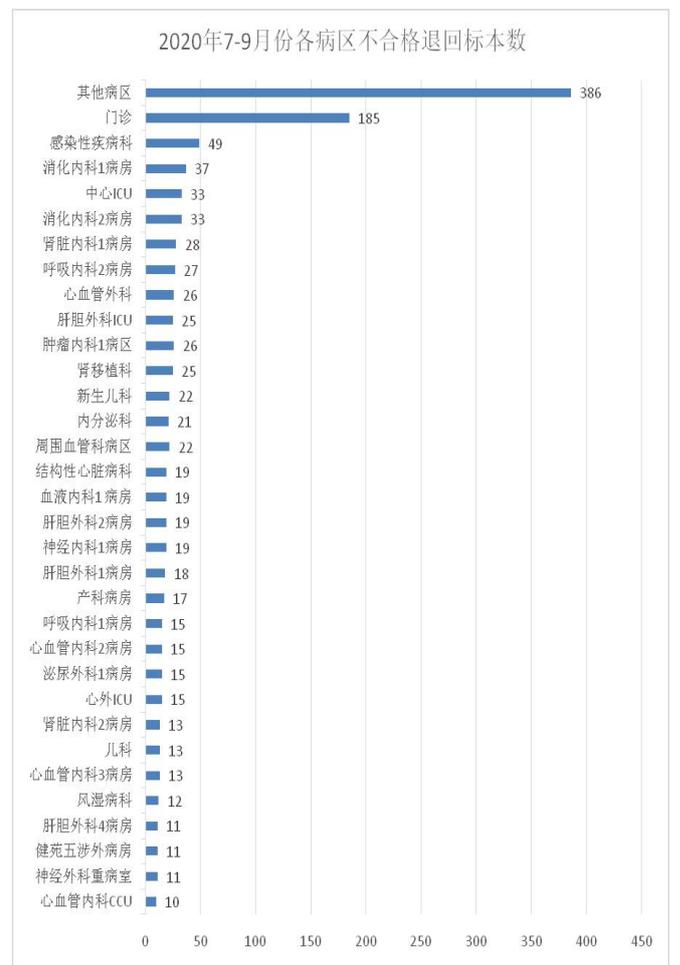


2. 不合格标本原因分析：

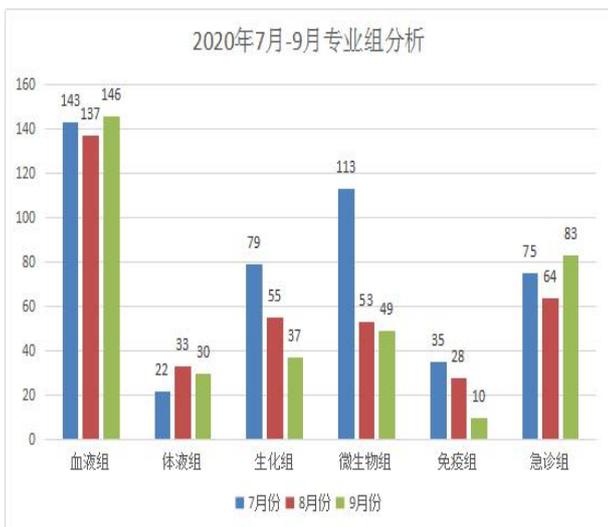
在所有不合格标本中，血凝标本 237 份占 20%、标本量不足于检验需要量的标本 278 份占 23%、容器错误的标本 190 份占 16%、检验项目、检测时间与检验科规定范围内不相符的标本 107 份占 9%、溶血标本 53 份占 4%、标本类型错误的标本 55 份占 5%、空管标本 54 份占 4%和其他不同原因的标本 236 份占 20%。



4.退回不合格标本前五位科室为其他小病区，门诊，感染性疾病科，消化内科1病区 and 中心ICU病房。



3.根据2020年7-9月份分析图，各专业组不合格标本退回数量都有所改变，体液组，生化组，微生物组，免疫组退回的不合格标本数量都有明显的下降。



三、2020年第3季度细菌耐药监测

(一) 细菌分布

2020年第3季度我院共送检14825份标本，

分离出病原菌 3156 株，非重复性病原菌 1856 株，分离率 12.51%，其中肠杆菌科细 703 株，占 37.87%，非发酵菌 306 株，占 16.48%，葡萄球菌 282 株，占 15.19%，肠球菌 225 株，占 12.12%，链球菌 57 株，占 3.07%，念珠菌 189 株，占 10.18%，其他 94 株，占 5.06%，其中分离数量位于前十位的细菌为大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、屎肠球菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、白色假丝酵母、表皮葡萄球菌、粪肠球菌、阴沟肠杆菌。细菌分布与上季度相比，大肠埃希菌依然位于首位，其余细菌分布变化不大，具体分布见下表。

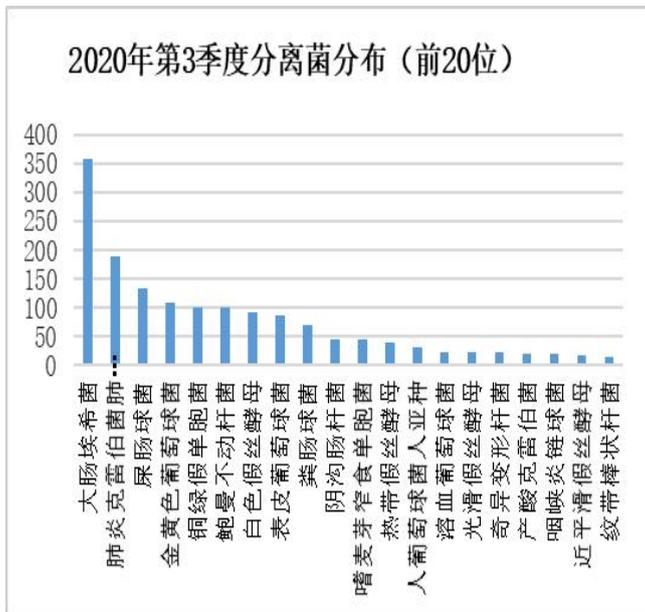


图 1 2020 年第 3 季度分离菌分布 (前 20)

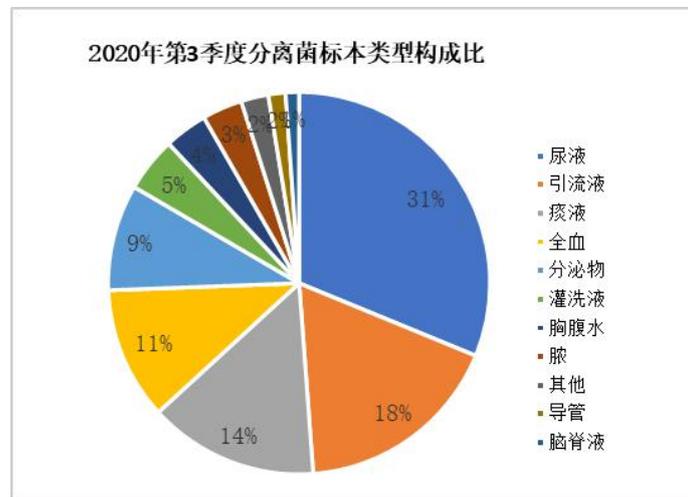


图 2 2020 年第 3 季度分离菌标本类型构成比

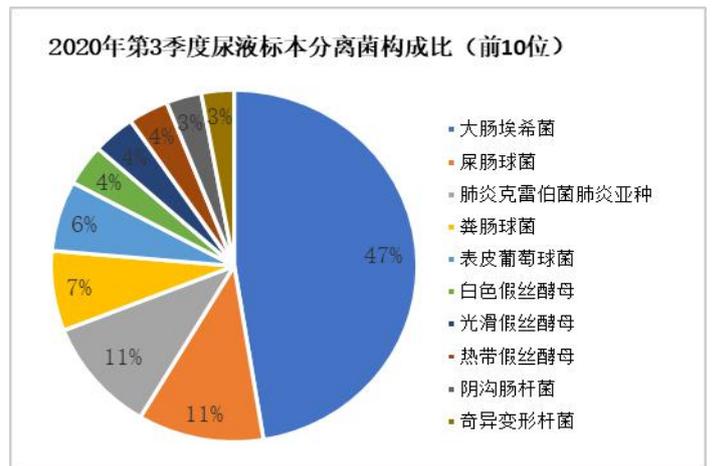


图 3 2020 年第 3 季度尿液标本分离菌构成比

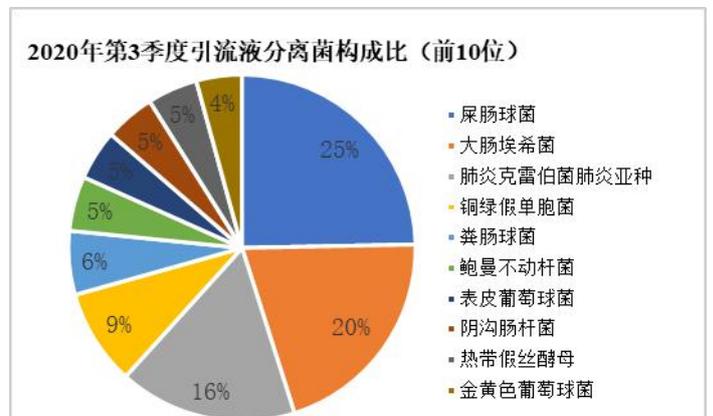


图 4 2020 年第 3 季度引流液分离菌构成比

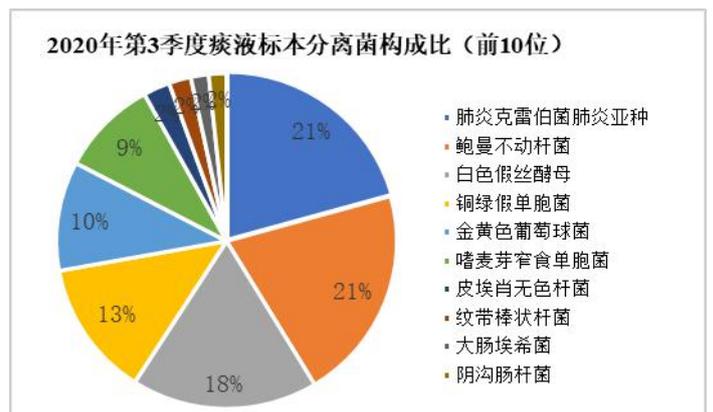


图 5 2020 年第 3 季度痰液标本分离菌构成比

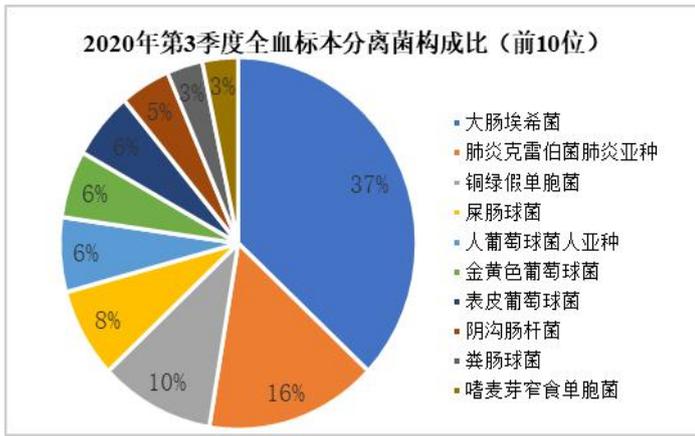


图 6 2020 年第 3 季度全血标本分离菌构成比



图 9 2020 年第 3 季度胸腹水标本分离菌构成比

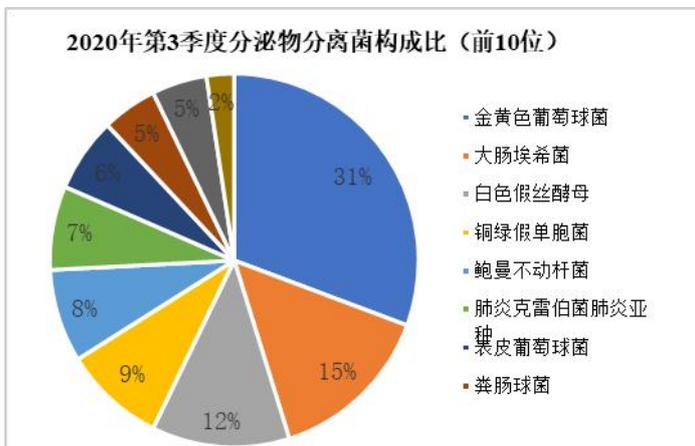


图 7 2020 年第 3 季度分泌物标本分离菌构成比

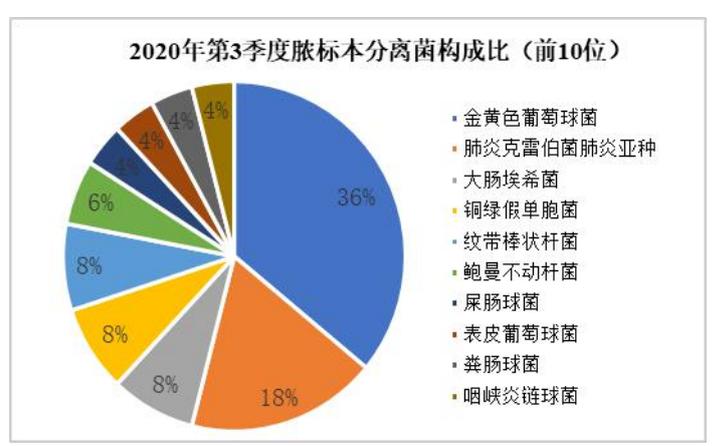


图 10 2020 年第 3 季度脓标本分离菌构成比

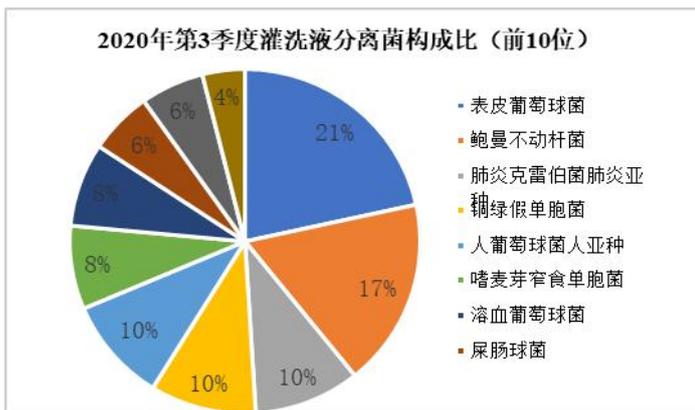


图 8 2020 年第 3 季度灌洗液标本分离菌构成比

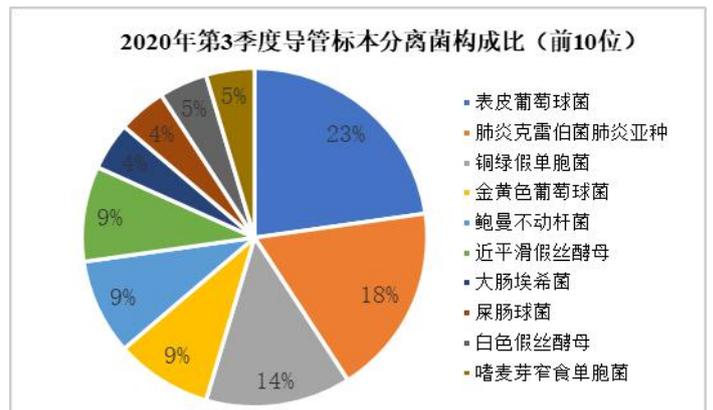


图 11 2020 年第 3 季度导管标本分离菌构成比



图 12 2020 年第 3 季度脑脊液标本分离菌构成比

(二) 耐药性分析

1. 2020 年第 3 季度主要分离菌的耐药性分析

肠杆菌科细菌中主要以大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌为主，敏感性较好的抗生素是碳青霉烯类、哌拉西林/他唑巴坦、头孢替坦和阿米卡星；非发酵菌中主要以鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌为主，鲍曼不动杆菌对米诺环素耐药率最低 (5%)，其次是替加环素 (11.1%)，对其他常用抗生素耐药率大多在 40-80%；铜绿假单胞菌对氨曲南耐药率最高 (18.8%)，对其他抗生素耐药率均小于 16%；葡萄球菌中以金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌为主，金黄色葡萄球菌未发现耐万古霉素及利奈唑胺分离株，表皮葡萄球菌未发现耐万古霉素的分离株，对利奈唑胺耐药率 1.2%；肠球菌中以屎肠球菌和粪肠球菌为主，屎肠球菌耐药率远远高于粪肠球菌，耐利奈唑胺粪肠球菌检出率 (5.7%)，比上季度有所上升；各分离菌耐药率见下图。

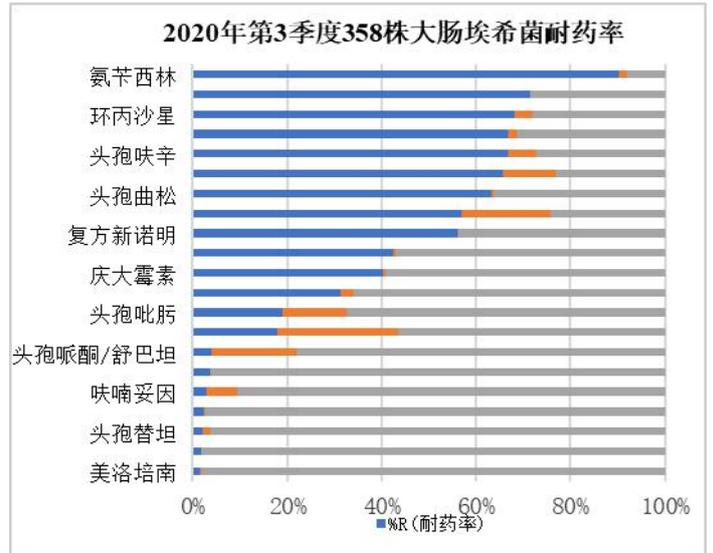


图 13 2020 年第 3 季度大肠埃希菌耐药率

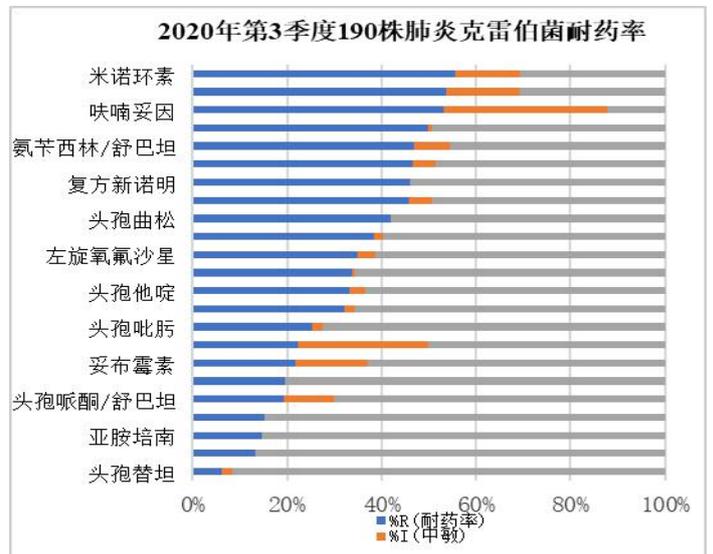


图 14 2020 年第 3 季度肺炎克雷伯菌耐药率

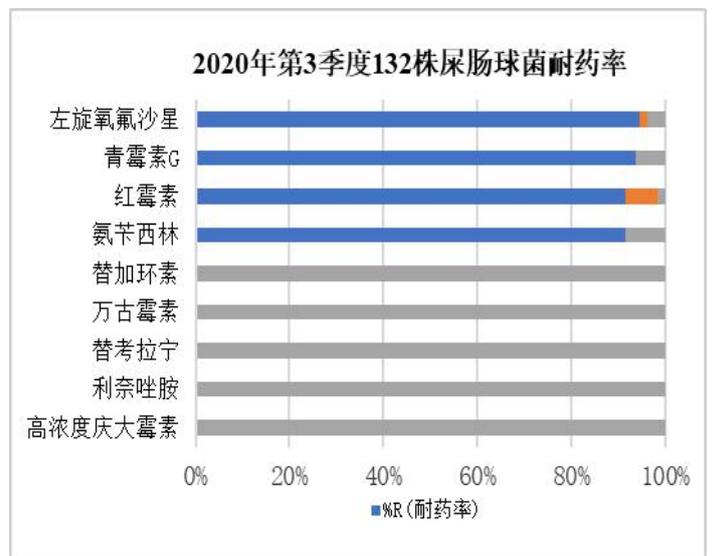


图 15 2020 年第 3 季度屎肠球菌耐药率

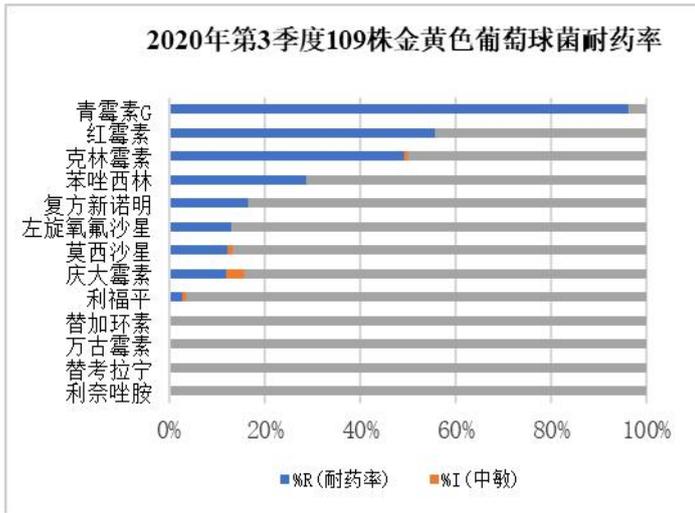


图 16 2020 年第 3 季度金黄色葡萄球菌耐药

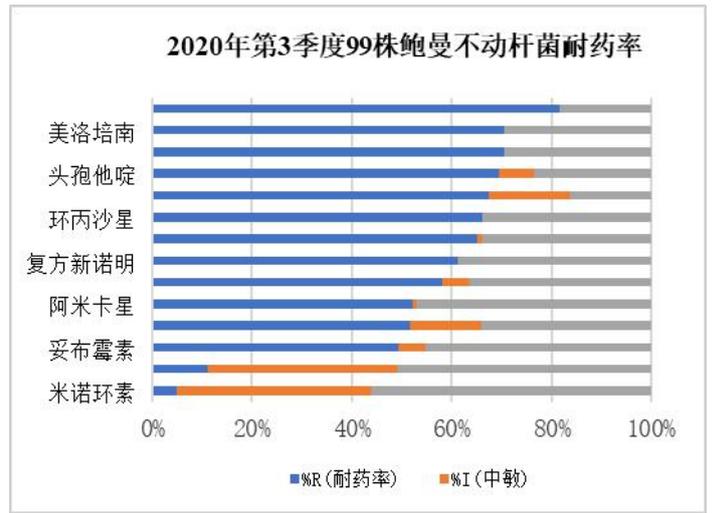


图 19 2020 年第 3 季度鲍曼不动杆菌耐药率

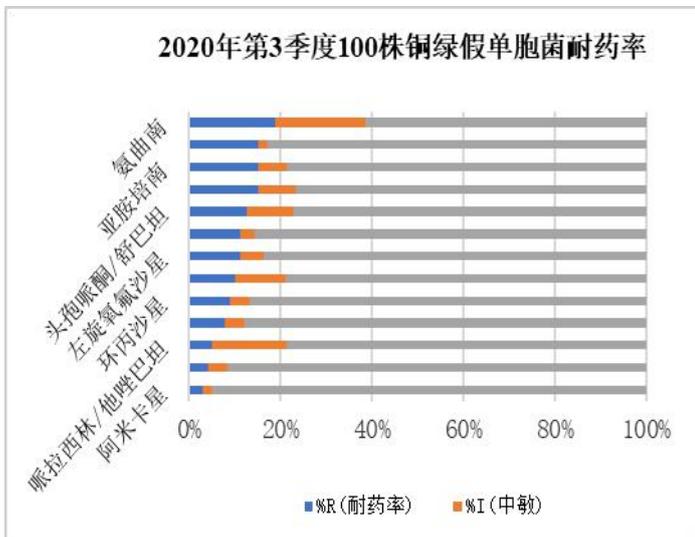


图 17 2020 年第 3 季度铜绿假单胞菌耐药率

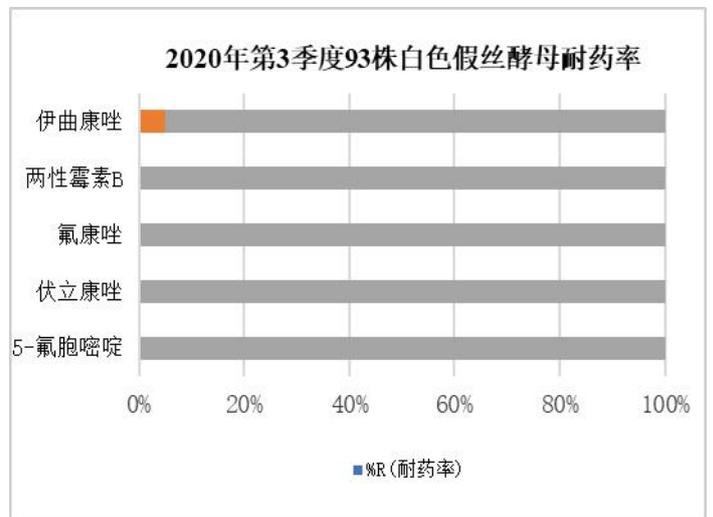


图 20 2020 年第 3 季度白色假丝酵母菌耐药率

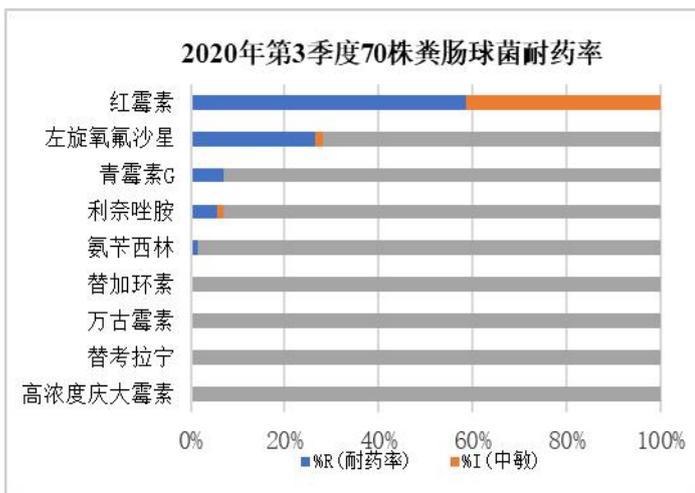


图 18 2020 年第 3 季度粪肠球菌耐药率

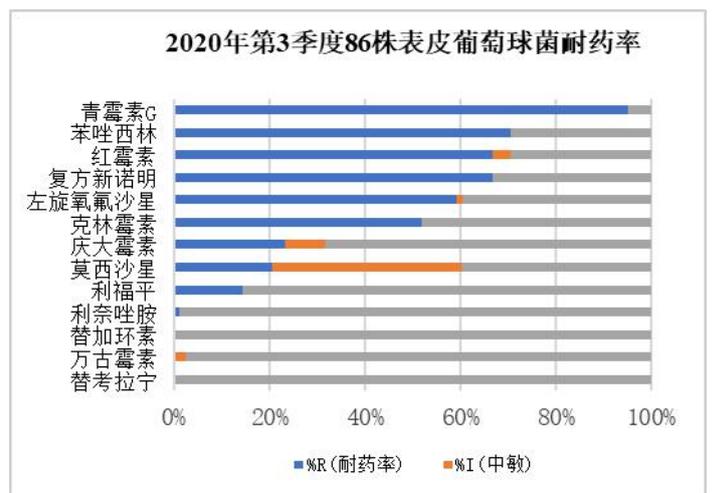


图 21 2020 年第 3 季度表皮葡萄球菌耐药率

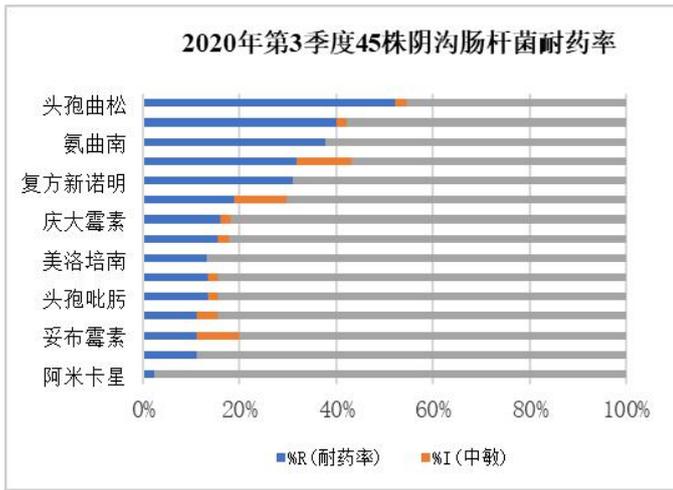


图 22 2020 年第 3 季度阴沟肠杆菌耐药率

2、多重耐药分析

根据监测数据：大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌 ESBLs 的检出率分别为 63.3%和 42%，大肠 ESBLs 和肺克 ESBLs 检出率均比上季度有明显上升；CRE 检出率分别 1.7%和 15.3%，CRE 大肠比上季度上升 1.4%，CRE 肺克比上季度下降 0.8%，第 2 季度检出 CRE56 株，以肺炎克雷伯菌为主，肝胆外科、肝胆 ICU、中心 ICU、肾移植检出 CRE 例数分别为 7 株、7 株、7 株、5 株；耐碳青霉烯类 CR-AB 和 CR-PA 检出率分别为 70.4%和 15.2%，CR-AB 和 CR-PA 检出率均比上季度有明显下降，CR-AB 主要集中在肝胆 ICU、中心 ICU、肝胆外科、呼吸 RCU，CR-PA 主要集中在肝胆外科、中心 ICU、肝胆 ICU；金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌 MRS 检出率分别 28.6%和 70.4%，金葡 MRS 检出率比上季度有所下降，表葡 MRS 检出率比上季度有所上升。多重耐药菌检出率见下表。

| 时间 耐药类型 | 2020 年第 3 季度检出率% (本季度) | 2020 年第 2 季度检出率% (上季度) | 2019 年第 3 季度检出率% (去年同季度) |
|--------------|------------------------|------------------------|--------------------------|
| CRE (大肠杆菌) | 1.7 | 0.3 | 2 |
| CRE (肺炎克雷伯菌) | 15.3 | 16.1 | 14.2 |
| CR-PA | 15.2 | 31.1 | 34.1 |
| CR-AB | 70.4 | 80 | 66.7 |
| MRSA | 28.6 | 35.1 | 40.8 |
| VRE | 0 (尿肠) 0 (粪肠) | 1.5 (尿肠) 0 (粪肠) | 0.7 (尿肠) 0 (粪肠) |

责任编辑：曾晓艳

不合格标本分析：雷静晶

细菌耐药监测统计分析：李雯

细菌耐药监测审核：雷金娥