

# Auto TRFIA-4型全自动荧光免疫分析仪血片支架固定滤纸血斑检测 $17\alpha$ -羟孕酮的试剂研制及性能评价

谭玉华<sup>1</sup>, 于婷<sup>2</sup>, 余海枷<sup>1</sup>, 陈梅欣<sup>1</sup>, 谢敬玲<sup>1</sup>, 冯健明<sup>1</sup>(1. 广州市丰华生物股份有限公司体外诊断试剂研发中心, 广州 510730; 2. 中国食品药品检定研究院体外诊断试剂检定所, 北京 100050)

**摘要:** 目的 研制一种 Auto TRFIA-4 型全自动荧光免疫分析仪血片支架固定滤纸血斑检测 $17\alpha$ -羟孕酮 ( $17\alpha$ -OHP) 的试剂, 并对其性能进行评价。方法 羊抗兔 IgG 抗体包被微孔板作为微孔反应板, 稀释后的兔抗人 $17\alpha$ -OHP 抗体作为中间抗体, 钨标记 $17\alpha$ -OHP-牛血清白蛋白偶联物作为钨标记物, 采用 Auto TRFIA-4 型全自动荧光免疫分析仪血片支架固定滤纸血斑定量检测 $17\alpha$ -OHP 浓度, 对其分析灵敏度、准确度、线性、精密度、特异度和稳定性等性能指标进行评价, 并评估是否满足拟订的行业标准的要求。选择 227 份出生 72h 后、7 天内、并充分哺乳的新生儿足跟血滤纸干血片样本用于试剂比对试验, 一致性采用 $\chi^2$  检验、Kappa 检验、 $t$  检验、线性相关分析、回归分析、Bland-Altman 法分析和医学决定水平预期偏离分析。结果 羊抗兔 IgG 抗体最适包被浓度为 $3\mu\text{g/ml}$ , 兔抗人 $17\alpha$ -OHP 抗体最适稀释比为 $1:1500$ ,  $17\alpha$ -OHP 钨标记物母液最适稀释比为 $1:2500$ ; 空白限、检出限和定量限分别为 $0.75$ ,  $1.08$  和  $1.99\text{ nmol/L}$ ; 标准品核对试验的相对偏差在 $\pm 15.00\%$  范围内, 回收试验的平均回收率为 $92.36\%$ ; 在 $2.00 \sim 300.00\text{ nmol/L}$  范围内, 线性相关系数为 $0.9971$ ; 批内和批间变异系数均在 $10.00\%$  以内; 检测 $100.00\text{ ng/ml}$  的孕酮、 $17\alpha$ -羟孕烯醇酮、11-脱氧皮质醇的样品, 交叉反应率在 $0.089\% \sim 0.64\%$  范围内。稳定性试验的性能符合要求。与对比试剂检测结果的总符合率为 $100\%$ , 与对比试剂定量测定结果高度相关( $r=0.9994$ ,  $t_r=452.02$ ,  $P < 0.05$ )。结论 自研试剂具有灵敏度高、准确度高、线性范围宽、精密度好、特异度高和稳定性好等优点, 符合拟订的行业标准要求, 与对比试剂检测结果具有高度的相关性和一致性, 满足临床检测需求。

**关键词:** 时间分辨荧光免疫分析法; 血片支架; 滤纸血斑;  $17\alpha$ -羟孕酮

中图分类号: R446 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414 (2025) 05-182-07

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2025.05.035

## Development and Performance Evaluation of A Reagent for Detecting of $17\alpha$ -hydroxyprogesterone in Dried Blood Spots on Filter Paper Fixed on Blood Spots Stent by Auto TRFIA-4 Automatic Fluorescence Immunoanalyzer

TAN Yuhua<sup>1</sup>, YU Ting<sup>2</sup>, YU Haijia<sup>1</sup>, CHEN Meixin<sup>1</sup>, XIE Jingling<sup>1</sup>, FENG Jianming<sup>1</sup> (1. R & D Center of IVD Reagents, Guangzhou Fenghua Biotech Co. Ltd., Guangzhou 510730, China; 2. Institute for in Vitro Diagnostic Control, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

**Abstract: Objective** To develop a reagent for detecting of  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone ( $17\alpha$ -OHP) in dried blood spots on filter paper fixed on vascular stent by Auto TRFIA-4 automatic fluorescence immunoanalyzer and evaluate its performance.

**Methods** The microwell plate was coated with the sheep anti-rabbit IgG antibody as microwell reaction plate, the rabbit anti-human  $17\alpha$ -OHP antibody was diluted as intermediate antibody, and the  $17\alpha$ -OHP-bovine serum albumin conjugate was labeled by europium as europium marker. The concentration of  $17\alpha$ -OHP in dried blood spots on filter paper fixed on blood spots stent was quantitatively detected by Auto TRFIA-4 automatic fluorescence immunoanalyzer. The analysis sensitivity, accuracy, linearity, precision, specificity and stability were evaluated, and whether they met the requirements of the formulated industry standards were evaluated. A total of 227 neonatal heel blood filter paper samples from newborns who were born 72 hours after birth and within 7 days and fully breastfeeding were selected for reagent comparison test. The consistency was analyzed by  $\chi^2$  test, Kappa test,  $t$  test, linear correlation analysis, regression analysis, Bland-Altman method analysis and predictive bias analysis of medical decision level,  $P < 0.05$  indicated statistically significant difference. **Results** The optimal coating concentration of sheep anti-rabbit IgG antibody was  $3\mu\text{g/ml}$ . The optimal dilution ratio of rabbit anti-human  $17\alpha$ -OHP antibody

**作者简介:** 谭玉华 (1980-), 男, 医学硕士, 医疗器械高级工程师, 临床医学检验技师, 二级企业培训师, 三级健康管理师, 研究方向: 医疗器械 (含体外诊断试剂) 的研发、注册与应用, 临床医学检验和标准化研究, E-mail: tanywhy@aliyun.com.  
于婷 (1978-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 体外诊断试剂质量控制与评价、标准化研究以及标准物质研制, E-mail: yuting@nifdc.org.cn, 并列第一作者。

was 1 : 1 500. The optimal dilution ratio of  $17\alpha$ -OHP europium marker mother liquor was 1 : 2 500. The limit of blank, limit of detection, limit of quantification was 0.75, 1.08 and 1.99 nmol/L, respectively. The relative deviations of the standard check test were within  $\pm 15.00\%$ , and the average recovery rate was 92.36%. The linear correlation coefficient was 0.997 1 in the range of 2.00 to 300.00 nmol/L. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were all within 10.00%. The cross-reactivity rates of 100.00 ng/ml progesterone,  $17\alpha$ -hydroxypregnenolone and 11-deoxycortisol were within 0.089% to 0.64%. The performance of stability test met the requirements. The total coincidence rate was 100% compared with the results of contrast reagent. The quantitative results were highly correlated with the contrast reagent ( $r=0.999\ 4$ ,  $t_r=452.02$ ,  $P<0.05$ ). **Conclusion** The self-developed reagent has the advantages of high sensitivity, good accuracy, wide linear range, good precision, high specificity and good stability, which meets the requirements of the formulated industry standards, and has high correlation and consistency with the result of contrast reagent, which meets the needs of clinical detection.

**Keywords:** time-resolving fluorescence immunoassay; blood spots; filter paper dried blood spots;  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone

$17\alpha$ -羟孕酮( $17\alpha$ -hydroxyprogesterone,  $17\alpha$ -OHP)是21-羟化酶缺陷(21-hydroxylase deficiency, 21-OHD)引起的先天性肾上腺皮质增生症(congenital adrenal hyperplasia, CAH)的特异性诊断指标之一<sup>[1]</sup>。迄今国外已有53个国家及地区开展了新生儿CAH的筛查<sup>[2]</sup>,我国多个省份也已将CAH列入新生儿疾病筛查常规项目<sup>[3]</sup>,国内外发表的CAH诊疗指南或新生儿CAH筛查共识均明确建议检测滤纸干血片 $17\alpha$ -OHP作为CAH的筛查指标<sup>[3-4]</sup>。时间分辨荧光免疫分析法(time-resolving fluorescence immunoassay, TRFIA)为新生儿CAH一级筛查常用方法,此方法具有较高的特异度与灵敏度<sup>[3]</sup>。既往半自动TRFIA试剂各步骤多为手工操作,耗时长、效率低,容易出错<sup>[5]</sup>,且常采用打孔钳手工打孔法检测滤纸干血片 $17\alpha$ -OHP<sup>[6-7]</sup>,各环节加样量的准确度对实验结果有至关重要的影响,各实验室间精密度差异较大,且结果可比性差<sup>[7-8]</sup>,亟需规范操作,提高 $17\alpha$ -OHP的检测性能,并促进 $17\alpha$ -OHP检测的标准化<sup>[4]</sup>。2023年国家药品监督管理局组织起草了 $17\alpha$ -OHP测定试剂盒(标记免疫分析法)行业标准(以下简称拟订的行业标准)<sup>[9-10]</sup>。本研究旨在研制一种基于Auto TRFIA-4型全自动荧光免疫分析仪血片支架固定滤纸血斑检测 $17\alpha$ -OHP的试剂,通过分析其性能指标,评估是否满足拟订的行业标准的要求和临床检测需求。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 选择227份出生72h后、7天内,并充分哺乳的新生儿足跟血剩余滤纸干血片样本用于方法学比对试验,样本均符合《新生儿疾病筛查滤纸血片采集和递送及保存专家共识》<sup>[11]</sup>的要求。样本均非本研究试验目的而专门采集的,不涉及受检者隐私信息,对受检者不存在因样本采集、检测对健康带来伤害,不需要受检者支付任何费用,不需要进行其他专门的配合,可视作对受检者几乎无任何损害和潜在风险,所有受检者在就诊时均已完成知情同意,因此本研究不再提交伦理委员会审核及受试

者知情同意书<sup>[12-13]</sup>。

1.2 仪器与试剂 甲醇中 $17\alpha$ -OHP溶液标准物质GBW(E)090947(中国计量科学研究院); $17\alpha$ -OHP纯品(美国Sigma公司);孕酮、 $17\alpha$ -羟孕烯醇酮和11-脱氧皮质醇纯品(深圳市新产业生物医学工程股份有限公司);羊抗兔IgG抗体(美国Rockland公司);兔抗人 $17\alpha$ -OHP抗体和 $17\alpha$ -OHP-牛血清白蛋白偶联物(广州优迪生物科技有限公司);防腐剂Proclin300和截留分子量为30 000的超滤离心管(美国Merck公司);牛血清白蛋白(安徽康源生物技术有限公司);丙烯葡聚糖凝胶Sephacry™ S-200和S & S903型号滤纸(美国GE公司);N1-(P-异硫氰基苄基)-二乙三胺四乙酸铈钠(美国Revvity公司);其他试剂为国产分析纯;血片胶钉和96孔酶标微孔板(深圳市金灿华实业有限公司);新筛专用滤纸打孔钳(北京协和洛克生物技术研究开发中心);DEM-3型洗板机(北京拓普分析仪器有限公司);新生儿 $17\alpha$ -OHP测定试剂盒(TRFIA)(国械注准20153401147)、TALENT-STAR型多功能荧光分析仪、FWZ-I型微量振荡器、增强液、浓缩洗液、实验缓冲液、样本稀释液、Easy DBS 680型全自动打孔机和Auto TRFIA-4型全自动荧光免疫分析仪(广州市丰华生物股份有限公司)。

## 1.3 方法

1.3.1 Auto TRFIA-4型全自动荧光免疫分析仪血片支架固定滤纸血斑检测 $17\alpha$ -OHP的试剂研制。

1.3.1.1 校准品和质控品的制备:参照文献[6]的方法, $17\alpha$ -OHP纯品用红细胞压积为50g/dl的绵羊全血稀释成0, 7.00, 20.00, 45.00, 120.00和290.00nmol/L的校准品( $17\alpha$ -OHP的相对分子质量为330.46,单位换算关系为1.00ng/ml=3.03 nmol/L),以及20.00, 70.00和150.00nmol/L的质控品,并以50  $\mu$ l/滴滴加在S & S903型号滤纸上,自然条件下干燥,制作成滤纸干血片校准品和质控品,真空塑封,2℃~8℃保存。

1.3.1.2 微孔反应板的制备:羊抗兔IgG抗体第二抗体)采用方阵滴定法确定最适包被工作浓度后,用20 mmol/L, pH 9.6碳酸盐缓冲液稀释至最适工作浓度作为包被

液,参照文献[6]的方法制作固相二抗微孔反应板。

1.3.1.3 中间抗体的制备:鼠抗人 $17\alpha$ -OHP抗体采用方阵滴定法确定最适工作浓度后,采用含有2 g/L牛血清白蛋白的20 mmol/L, pH7.4磷酸盐缓冲液,稀释成最适工作浓度作为中间抗体(第一抗体)工作液。

1.3.1.4 铋标记物的制备:将 $17\alpha$ -OHP-牛血清白蛋白偶联物与N1-(P-异硫氰基苄基)-二乙三胺四乙酸铋按质量比3:1混合,参照文献[6]的方法,制作 $17\alpha$ -OHP铋标记物母液。铋标记物母液采用方阵滴定法确定最适工作浓度后,采用实验缓冲液稀释成最适工作浓度作为铋标记物工作液。

1.3.1.5 建立Auto TRFIA-4型全自动荧光免疫分析仪血片支架固定滤纸血斑检测 $17\alpha$ -OHP程序:将浓缩洗液用纯化水按体积比1:25倍稀释成洗涤工作液。采用Easy DBS 680型全自动打孔机从校准品、质控品或样本的滤纸干血片上采集到3mm的血斑,并自动依次固定在血片支架的胶钉上,将固定有血斑的血片支架传递至Auto TRFIA-4型全自动荧光免疫分析仪的血片支架存放位置上。然后Auto TRFIA-4型全自动荧光免疫分析仪执行以下操作,向固相二抗微孔反应板的微孔中加入 $150\mu\text{l}$ 中间抗体工作液,将血片支架胶钉固定的校准品、质控品或样本血斑依次放入中间抗体工作液中缓慢振荡孵育60min,然后取出血片支架胶钉固定的校准品、质控品或样本血斑,加入 $50\mu\text{l}$ 铋标记物工作液,继续依次放入血片支架胶钉固定的校准品、质控品或样本血斑,加入 $50\mu\text{l}$ 铋标记物工作液,继续依次放入血片支架胶钉固定的校准品、质控品或样本血斑,采用洗涤工作液洗涤微孔反应板6次,加入 $200\mu\text{l}$ 增强液,缓慢振荡孵育5min,在判读仪中检测荧光计数值[单位:计数/秒(counts per second, CPs)],并用配套的软件进行结果分析。

1.3.2 对比方法操作:新生儿 $17\alpha$ -OHP测定试剂盒(TRFIA)、新筛专用滤纸打孔钳、DEM-3型洗板机、FWZ-I型微量振荡器和TALENT-STAR型多功能荧光分析仪组成对比方法检测系统。严格按照说明书操作。

### 1.3.3 性能评价

1.3.3.1 剂量-反应曲线:采用剂量对数-结合率(log-B/Bmax)数学模型,三次样条插值(spline)函数拟合剂量-反应曲线,校准品检测荧光计数值在剂量-反应曲线上计算得到的浓度值与校准品理论值的线性相关系数(correlation coefficient,  $r$ )应不低于0.990 0。

1.3.3.2 分析灵敏度:参照YY/T 1789.3-2022<sup>[14]</sup>进行空白限(limit of blank, LoB)、检出限(limit of detection, LoD)和定量限(limit of quantification, LoQ)评价,LoD应不高于 $3.03\text{ nmol/L}$ <sup>[9]</sup>。

1.3.3.3 标准品核对试验:将标准物质GBW(E)090947制作成浓度为 $30.30\text{ nmol/L}$ 和 $60.60\text{ nmol/L}$ 的滤纸干血片样品。每个样品重复测定3次,分别计

算实测值与理论值的相对偏差,如果3次结果相对偏差均在 $\pm 15.00\%$ 范围内,即判为符合要求;如果 $\geq 2$ 次的结果不符合,即判为不符合要求;如果有一次结果不符合的要求,则应重新连续测定20次,分别计算相对偏差,如果 $\geq 19$ 次的结果符合要求,则判定准确度符合要求<sup>[9]</sup>。

1.3.3.4 回收试验:将标准物质GBW(E)090947稀释至浓度为 $303.00\text{ nmol/L}$ 作为样品A。将样品A加入到 $17\alpha$ -OHP低浓度的样品B中,所加入样品A的体积宜不超过混合样品(A+B)总体积的10%,将样品B和混合样品(A+B)分别制成滤纸干血片样品,然后重复测定滤纸干血片混合样品(A+B)和样品(B)3次,各计算均值(mean,  $M$ ),得到的回收率(rate of recovery,  $R$ )应在 $85.00\% \sim 115.00\%$ 范围内<sup>[9]</sup>。

1.3.3.5 线性:将高值样品稀释成2.0, 3.03, 4.50, 5.00, 10.00, 15.00, 25.00, 45.00, 50.00, 75.00, 100.00, 150.00, 200.00, 212.00, 250.00和 $300.00\text{ nmol/L}$ ,制作成滤纸干血片样品,对每一浓度的滤纸干血片样品重复测定3次,计算平均值,将结果平均值(实测浓度)与理论浓度用最小二乘法进行线性拟合, $r$ 应不小于 $0.990\ 0$ <sup>[9]</sup>。

1.3.3.6 精密度:选择浓度在 $24.24 \sim 36.36\text{ nmol/L}$ 和 $48.48 \sim 72.72\text{ nmol/L}$ 的滤纸干血片样品作为精密度评价样品。使用同一批次试剂盒测定精密度评价样品,每个样品各重复检测10次,分别计算10次测量浓度结果的 $M$ 和标准差(standard deviation,  $s$ ),批内变异系数(coefficient of variation,  $CV$ )应不大于 $15.00\%$ <sup>[9]</sup>。用3个批号的试剂盒分别检测精密度评价样品,每个样品各重复检测10次,分别计算30次测量浓度结果的 $M$ 和 $s$ ,批间 $CV$ 应不大于 $20.00\%$ <sup>[9]</sup>。

1.3.3.7 特异度:选择低浓度和高浓度的样品作为特异度评价基础样品。分别制备浓度为 $2\ 000.00\text{ ng/ml}$ 的孕酮、 $17\alpha$ -羟孕烯醇酮和11-脱氧皮质醇作为储存液。将储存液与基础样品按照1:19的比例进行混合作为添加样品(添加后理论浓度为 $100.00\text{ ng/ml}$ ),将储存液所用稀释液与基础样品按照1:19的比例进行混合作为对照样品,添加样品和对照样品均制作成滤纸干血片样品。使用试剂盒分别测定添加样品和对照样品,每个样品重复检测3次,计算结果的 $M$ ,交叉反应率应在 $-2.00\% \sim 2.00\%$ 范围内<sup>[9]</sup>。

1.3.3.8 稳定性:取 $2\text{ }^\circ\text{C} \sim 8\text{ }^\circ\text{C}$ 下储存至13个月内的试剂盒,以及取效期内的试剂盒于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温箱内放置6天,进行分析灵敏度、标准品核对试验、线性和批内精密度评价,评估结果应符合每个指标对应的要求。

1.3.3.9 方法学比对试验:待评价试剂与对比方法平行检测227份新生儿滤纸干血片样本中的 $17\alpha$ -OHP含量。线性回归分析的 $r$ 应不低于 $0.975\ 0$ ;Bland-Altman法分析中95%的数据点应在95%一致性限(limits

of agreement, LoA)内,且95% LoA 的置信区间(CI)应在  $\pm 15\%$ [1/2室间质量评价标准的允许总误差(TEa) ( $\pm 30\%$ )]<sup>[15]</sup>内;医学决定水平预期偏倚分析,预期相对偏倚的95%CI应在  $\pm 15\%$ (1/2TEa)内。

1.4 统计学分析 采用Excel软件、SPSS20软件和MedCalc软件进行统计分析。计量资料以均数  $\pm$  标准差( $M \pm s$ )表示,组间比较采用 $t$ 检验,相关性采用线性回归分析,一致性采用Bland-Altman法分析和医学决定水平预期偏倚分析。计数资料比较采用四方格表的 $\chi^2$ 检验,一致性采用Kappa指数(Kappa coefficient,  $\kappa$ )分析, $\kappa > 0.75$ 为高度一致, $0.75 \geq \kappa > 0.4$ 为一致, $\kappa < 0.4$ 为一致性差。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

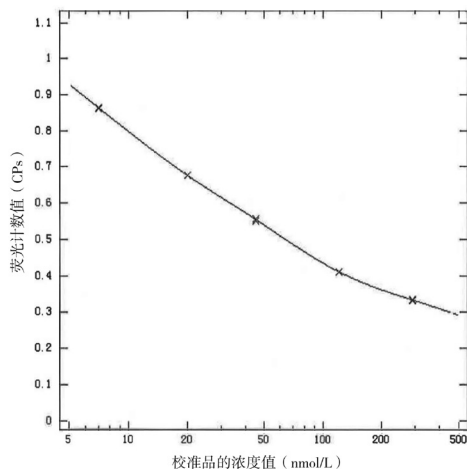
## 2 结果

2.1 最适工作浓度 羊抗兔IgG抗体最适包被浓度为 $3 \mu\text{g/ml}$ ,兔抗人 $17\alpha\text{-OHP}$ 抗体最适稀释比为 $1:1500$ , $17\alpha\text{-OHP}$ 标记物母液最适稀释比为 $1:2500$ 。

2.2 剂量-反应曲线 见图1。校准品A~F的检测荧光计数值在剂量-反应曲线上计算得到的浓度值与校准品理论值的 $r$ 为 $1.0000$ 。

2.3 分析灵敏度 5份空白样本实测结果的 $M$ 为 $0.63\text{nmol/L}$ , $s$ 为 $0.070\text{nmol/L}$ ,采用参数法计算,LoB为 $0.75\text{nmol/L}$ ;5份在 $1\sim 5$ 倍LoB的低浓度样本实测结果的 $s$ 为 $0.20\text{nmol/L}$ ,采用参数法计算,LoD为 $1.08\text{nmol/L}$ ;5份预期在LoQ目标浓度附近的样本中,当理论浓度为 $2.00\text{nmol/L}$ 时,实测结果的 $M$ 为 $1.99\text{nmol/L}$ , $s$ 为 $0.028\text{nmol/L}$ ,偏差为 $-0.010\text{nmol/L}$ ,TE为 $0.066\text{nmol/L}$ ,TE(%)为 $3.30\% < 1/3\text{TEa}(10\%)$ ,LoQ为 $1.99\text{nmol/L}$ 。

2.4 标准品核对试验  $30.30\text{nmol/L}$ 的标准物质3次检测结果相对偏差分别为 $-12.51\%$ , $-11.85\%$ 和 $-10.86\%$ ;  $60.60\text{nmol/L}$ 的标准物质3次检测结果相对偏差分别为 $-12.19\%$ , $-11.70\%$ 和 $-13.84\%$ 。



X轴(浓度)采用log函数转换,比例为 $1:1$ ;Y轴(荧光计数值)采用 $B/B_{\text{max}}$ 转换,比例为 $1:1000$ ;采用spline函数拟合剂量-反应曲线。

图1 剂量-反应曲线

2.5 回收试验 见表1。 $20 \mu\text{l}$ 样品A( $303.00\text{nmol/L}$ )加入至 $200 \mu\text{l}$ 样品B中,重复测定3次的平均回收率为 $92.36\%$ 。

表1 回收试验评价结果

测定次数 (n)	样品(B)实测浓度 (nmol/L)	混合样品(A+B)实测浓度 (nmol/L)	回收率 (%)
1	60.31	80.21	92.15
2	60.51	79.81	90.04
3	59.81	80.51	94.89
M	60.21	80.18	92.36

2.6 线性 在 $2.00\sim 300.00\text{nmol/L}$ 范围内,检测结果与实测结果的线性回归方程为 $Y=1.0795X-3.8281$ , $r=0.9971$ 。

2.7 精密度 低浓度精密度评价样品的批内和批间检测结果分别为 $22.03 \pm 1.02\text{nmol/L}$ 和 $22.93 \pm 1.02\text{nmol/L}$ ,CV分别为 $4.63\%$ 和 $4.45\%$ ;高浓度精密度评价样品的批内和批间检测结果分别为 $61.05 \pm 3.21\text{nmol/L}$ 和 $66.74 \pm 4.04\text{nmol/L}$ ,CV分别为 $5.26\%$ 和 $6.05\%$ 。

2.8 特异度 见表2。分别测定浓度为 $100.00\text{ng/ml}$ 的孕酮、 $17\alpha\text{-羟孕烯醇酮}$ 和 $11\text{-脱氧皮质醇}$ 的样品,交叉反应率在 $0.089\%\sim 0.64\%$ 范围内。

2.9 稳定性 见表3。试剂盒于 $2\text{C}\sim 8\text{C}$ 下储存13个月内,以及取效期内的试剂盒于 $37\text{C}$ 恒温箱内放置6天,分析灵敏度、标准品核对试验、线性和批内精密度的结果均符合要求。

2.10 方法学比对 见表4,图2,图3。对比试剂定性检测结果的总符合率为 $100\%$ ,与定性检测结果高度一致( $\kappa=1.00$ , $P < 0.05$ )。样本在 $1.73\sim 128.61\text{nmol/L}$ 内,两种试剂定量测定结果的差异无统计学意义( $t=0.078$ , $P > 0.05$ );与对比试剂定量测定结果高度相关( $r=0.9994$ , $t_r=452.02$ , $P < 0.05$ );利用回归方程 $Y=1.0003X-0.0112$ ,计算医学决定水平 $30$ , $60$ 和 $90\text{nmol/L}$ 的预期偏倚分别为 $-0.0022$ (95%CI:  $-0.38, 0.37$ ), $0.0068$ (95%CI:  $-1.82, 1.83$ )和 $0.016$ (95%CI:  $-3.26, 3.29$ ) $\text{nmol/L}$ ,预期相对偏倚分别为 $-0.0073\%$ (95%CI:  $-1.26\%, 1.24\%$ ), $0.011\%$ (95%CI:  $-3.03\%, 3.05\%$ )和 $0.018\%$ (95%CI:  $-3.62\%, 3.65\%$ ),均在 $1/2\text{TEa}(\pm 15\%)$ 内;且Bland-Altman法分析,95.60%的数据点在95%LoA( $-9.52\%, 9.53\%$ )内,且95%LoA CI( $-10.61, 10.61$ )在 $1/2\text{TEa}(\pm 15\%)$ 内,两种试剂定量测定结果具有一致性。

2.11 与拟订的行业标准的符合程度 试剂的LoD,标准品核对试验、回收试验、线性、批内精密度、批

间精密性、特异度和稳定性等指标均符合拟订的行业标准要求<sup>[9]</sup>。

表2 特异度评价结果

类别	孕酮			17 $\alpha$ -羟孕烯醇酮			11-脱氧皮质醇		
	对照样品 (nmol/L)	添加样品 (nmol/L)	交叉反应率* (%)	对照样品 (nmol/L)	添加样品 (nmol/L)	交叉反应率* (%)	对照样品 (nmol/L)	添加样品 (nmol/L)	交叉反应率* (%)
低浓度	9.53	9.80	0.089	11.10	12.51	0.470	9.55	11.23	0.550
高浓度	24.19	25.12	0.310	24.23	25.78	0.510	24.88	26.83	0.640

注: \*按17 $\alpha$ -OHP单位转换公式1.00 ng/ml=3.03 nmol/L, 换算成 ng/ml 后得到的结果。

表3 稳定性评价结果

类别	分析灵敏度 (nmol/L)			标准品核对试验 (%)		线性 范围 (nmol/L)	<i>r</i>	批内精密性 [CV (%)]	
	LoB	LoD	LoQ	检测 30.30 nmol/L 标准物质的相对偏差	检测 60.60 nmol/L 标准物质的相对偏差			低浓度	高浓度
效期稳定性	0.72	0.97	2.00	-14.82 ~ -7.89	-9.76 ~ -3.13	2 ~ 300	0.998 8	7.25	7.03
热稳定性	0.72	1.01	2.00	-10.20 ~ -4.59	-9.73 ~ -3.13	2 ~ 300	0.998 3	8.32	7.83

表4 两种试剂定性检测结果

待评价试剂	对比试剂		合计
	阳性	阴性	
阳性	42	0	42
阴性	0	185	185
合计	42	185	227

动化的难题,本研究引入了全自动打孔技术、血片支架技术和全自动TRFIA技术,提高了筛查效率,节约实验室人力资源,还可降低因人工操作产生的误差<sup>[5]</sup>,并有利于提高新生儿CAH筛查的质量。

LoB是建立和验证检出限时的必要指标,LoD和LoQ是评价检测方法下限的指标<sup>[14]</sup>。据报道,17 $\alpha$ -OHP生理浓度较低,虽新生儿出生时,足月婴儿的17 $\alpha$ -OHP水平可达19.09nmol/L;由于疾病和压力,早产儿的17 $\alpha$ -OHP可达30.30 nmol/L<sup>[4]</sup>,但滤纸干血片法检测用的血斑仅3mm,血清量相当于 $1.5 \pm 0.17 \mu\text{l}$ <sup>[11]</sup>,因此17 $\alpha$ -OHP检测需要较高灵敏度的检测试剂。因17 $\alpha$ -OHP属于小分子抗原,缺乏可作夹心法的两个以上的抗体结合位点,既往常采用直接竞争法进行检测,灵敏度较低。本研究采用固相二抗抗原竞争法原理,微孔板上先包被第二抗体,相当于将平面结构变为立体结构,增加了表面积;同时每个第二抗体分子有两个Fab端,可以结合两个第一抗体,这样就增加了抗体结合量,且第一抗体的Fc端朝向第二抗体,Fab端暴露在外侧,使得第一抗体可以更好地参与免疫反应,第一抗体与第二抗体的亲和力大,反应更完全,从而提高了检测灵敏度。本研究结果显示,LoD符合拟订的行业标准要求<sup>[9]</sup>,且LoQ已能满足临床最低检出能力的需求。

对于标记免疫分析试剂,目前准确度评价常采用加标回收和测定有证参考物质两种方式进行评价<sup>[16]</sup>。基于大多实验室进行新生儿CAH筛查的17 $\alpha$ -OHP切值,足月儿为30nmol/L,早产或低体重儿为60nmol/L<sup>[17]</sup>。本研究在以上医学决定水平附近采用标准品核对试验和回收试验进行准确度验证,结果均符合拟订的行业标准要求<sup>[9]</sup>。本研究结果显示,偏差试验的相对偏差在1/2室间质量评价标准的TEa( $\pm 30\%$ )<sup>[15]</sup>内,准确度满足临床检测要求。

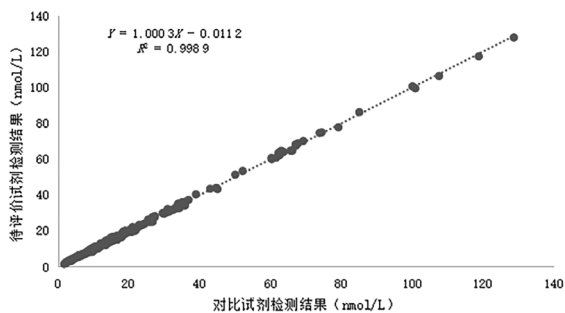


图2 两种试剂定量测定结果的线性回归曲线

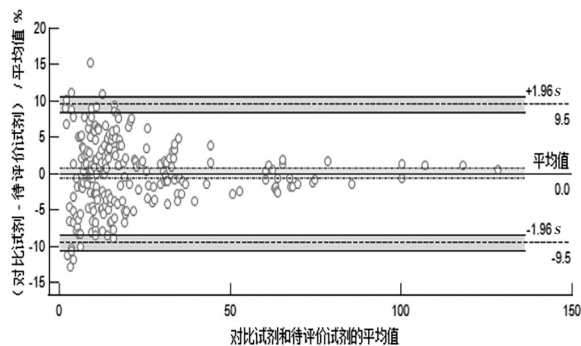


图3 两种试剂定量测定结果的Bland-Altman图

### 3 讨论

新生儿遗传代谢性疾病筛查是通过实验室方法检测滤纸干血片相关指标来实现<sup>[3]</sup>。检测滤纸干血片17 $\alpha$ -OHP是新生儿21-OHD筛查的重要指标<sup>[16]</sup>。为了解决国内既往滤纸干血片样本检测难以实现全流程自

17 $\alpha$ -OHP升高是21-OHD的特异性诊断指标和主要治疗监测指标,临床上常将17 $\alpha$ -OHP>300nmol/L时考虑为典型21-OHD,6~300nmol/L时考虑为非典型21-OHD,<6nmol/L时不支持CAH或为非典型21-OHD<sup>[18]</sup>,因此17 $\alpha$ -OHP检测需要足够宽的线性范围。本研究结果显示,检测17 $\alpha$ -OHP的线性范围满足拟订的行业标准要求<sup>[9]</sup>和临床检测需求。

由于目前17 $\alpha$ -OHP检测受限于竞争法本身方法学的缺陷,操作时差对竞争法检测结果也会有明显影响,特别是滤纸干血片法也需考虑样本的均匀性问题,方法学的精密度一直存在一定欠缺<sup>[4,7-8]</sup>,实验室间CV达30.4%~42.7%<sup>[4]</sup>。本研究通过方法学改良,延长了固相二抗、第一抗体和血片反应时间,有利于第一抗体优先与血片抗原的充分反应,并采用了全自动TRFIA技术,提高了液体试剂的加样速度,降低了时差效应,血片支架技术也促进了血片中17 $\alpha$ -OHP在液体试剂中的充分洗脱和反应,从而提高了检测的可重复性。本研究结果显示,检测17 $\alpha$ -OHP的精密度均在1/3室间质量评价标准的TEa( $\pm 30\%$ )<sup>[19]</sup>内,满足拟订的行业标准要求<sup>[9]</sup>和临床检测需求。

新生儿血浆中的类固醇单硫酸酯易与17 $\alpha$ -OHP的抗体发生交叉反应,造成早产儿和重症新生儿17 $\alpha$ -OHP水平假性升高<sup>[24]</sup>。17 $\alpha$ -OHP是由孕酮或17 $\alpha$ -羟孕烯醇酮转换而来,在21-羟化酶的作用下转换成11-脱氧皮质醇<sup>[4,18]</sup>。基于正常妊娠妇女的孕酮为 $24.53 \pm 1.00\text{ng/ml}$ <sup>[20]</sup>,以及已有研究采用 $1.00\text{ng/ml}$ 孕酮<sup>[6]</sup>、 $100\text{ng/ml}$ 17 $\alpha$ -羟孕烯醇酮<sup>[6]</sup>和 $85\text{ng/ml}$ 11-脱氧皮质醇<sup>[6]</sup>进行特异度评价。因此本研究着重对孕酮、17 $\alpha$ -羟孕烯醇酮和11-脱氧皮质醇的交叉反应进行了验证,结果显示特异度满足拟订的行业标准要求<sup>[9]</sup>和临床特异度需求。

本研究采用了效期稳定性和热稳定性两种试验方法,对分析灵敏度、标准品核对试验、线性和批内精密度等性能指标进行了评价,结果显示均符合要求<sup>[9]</sup>,表明试剂盒的稳定性良好。

在方法学比对试验统计分析时,应考虑每种医学统计学方法的优缺点和适用条件,多种方法的联合应用,可避免单一方法评价中局限性的影响。本研究联合采用了 $\chi^2$ 检验、Kappa检验、*t*检验、线性相关分析、回归分析、Bland-Altman法分析和医学决定水平预期偏倚分析进行一致性评价,结果显示待评价与对比试剂检测结果间具有高度的相关性和一致性,待评价试剂可被接受。

综上所述,本研究研制的Auto TRFIA-4型全自动荧光免疫分析仪血片支架固定滤纸血斑检测17 $\alpha$ -OHP的试剂,具有灵敏度高、准确度好、线性

范围宽、精密度好、特异度高和稳定性好等优点,符合拟订的行业标准要求,与对比试剂检测结果间具有高度的相关性和一致性,满足临床检测需求。

#### 参考文献:

- [1] 曾少豪,单双红,何君瑜,等.血清17羟孕酮升高的临床鉴别诊断思路[J].国际内分泌代谢杂志,2023,43(6):485-488.  
ZENG S H, SHAN S H, HE J Y, et al. Clinical interpretation of elevated serum 17 hydroxyprogesterone levels[J]. International Journal of Endocrinology and Metabolism, 2023, 43(6): 485-488.
- [2] 中华医学会儿科分会罕见病学组.中国医师协会医学遗传医师分会,中国妇幼保健协会出生缺陷防治与分子遗传分会,上海市医学会分子诊断专科分会.21羟化酶缺陷导致的先天性肾上腺皮质增生症的实验室诊断共识[J].中华医学遗传学杂志,2023,40(7):769-780.  
Rare Diseases Group, Pediatric Branch of Chinese Medical Association, Medical Geneticists Branch of Chinese Medical Doctor Association, Birth Defect Prevention and Molecular Genetics Branch of China Maternal and Child Health Care Association. Consensus on the laboratory diagnosis of congenital adrenal hyperplasia due to 21 hydroxylase deficiency [J]. Chinese Journal of Medical Genetics, 2023, 40(7): 769-780.
- [3] 国家卫生健康委临床检验中心新生儿遗传代谢病筛查室间质评委员会.新生儿先天性肾上腺皮质增生症筛查与诊断实验室检测技术专家共识[J].中华检验医学杂志,2019,42(12):1014-1019.  
Committee on Quality Assessment of Newborn Screening, National Center for Clinical Laboratory. Laboratory testing consensus on neonatal congenital adrenal hyperplasia: Screening and diagnosis [J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2019, 42(12): 1014-1019.
- [4] 龙琪琛,张天娇,赵海建,等.重视17 $\alpha$ -羟孕酮的准确测定并加快推进其标准化进程[J].中华检验医学杂志,2020,43(12):1172-1180.  
LONG Q C, ZHANG T J, ZHAO H J, et al. Accuracy and standardization of 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone routine measurements[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2020, 43(12): 1172-1180.
- [5] 谭玉华,潘晓芳,李高成,等.新生儿滤纸干血片自动打孔检测系统检测葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的性能评价[J].医疗装备,2023,36(2):16-20.  
TAN Y H, PAN X F, LI G C, et al. Performance evaluation of automatic perforation detection system for detecting glucose-6-phosphate dehydrogenase in neonatal filter paper dried blood slices[J]. Medical Equipment, 2023, 36(2): 16-20.
- [6] 于婷.新生儿17 $\alpha$ -羟孕酮和总半乳糖测定试剂及妊娠相关蛋白A(PAPP-A)质控品的研制[D].广州:南方医科大学,2014:1-82.  
YU T. Development of diagnostic reagents for neonatal 17 $\alpha$ -OH-progesterone and total galactose and preration for pregnancy-associated piasma protein-A quality control[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2014:1-82

- [7] 周玉侠,牛婷婷,吴玉苏,等.山东省18家新生儿疾病筛查中心实验室TSH和17 $\alpha$ -OHP项目室内质控数据室间比对分析[J].现代检验医学杂志,2019,34(2):140-143,146.  
ZHOU Y X, NIU T T, WU Y S, et al. Inter-laboratory comparison of internal quality control data of neonatal disease screening indicators TSH and 17 alpha-OHP in 18 newborn screening laboratory in Shandong province[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(2): 140-143, 146.
- [8] 龙琪琛,张天娇,闫颖,等.16种17-羟孕酮制备物基于两种评价方案的互通性研究[J].中华检验医学杂志,2020,43(1):44-50.  
LONG Q C, ZHANG T J, YAN Y, et al. Commutability assessment of 16 processed materials for 17-hydroxyprogesterone based on two approaches in China [J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2020, 43(1): 44-50.
- [9] 国家药品监督管理局.药监综械注[2023]47号:国家药监局综合司关于印发2023年医疗器械行业标准制修订计划项目的通知[EB/OL].(2023-05-24).<https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjylqx/20230524161850199.html>.  
National Medical Products Administration. Drug safety heald machinery note [2023] 47: the comprehensive bureau of NMPA about print and distribute 2023 standards for medical devices industry project and revising the notification[EB/OL]. (2023-05-24). <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjylqx/20230524161850199.html>.
- [10] 全国医用临床检验实验室和体外诊断系统标准化技术委员会.国临检诊断标委[2023]34号:关于SAC/TC136《运动神经元存活基因(SMN)检测试剂盒》等十四项行业标准征求意见的通知[EB/OL].(2023-08-03).<https://www.bimt.org.cn/a/385.html>.  
National Standardization Technical Committee for Medical Clinical Laboratory and In Vitro Diagnostic Systems. National Clinical Diagnostic Standards Committee [2023] No. 34:SAC/TC136. SAC/TC136 "Motor neuron survival gene (SMN) detection kit" and other 14 industry standards for comment notice[EB/OL].(2023-08-03). <https://www.bimt.org.cn/a/385.html>.
- [11] 国家卫健委临床检验中心新生儿疾病筛查室间质量评价委员会.新生儿疾病筛查滤纸血片采集和递送及保存专家共识[J].中华检验医学杂志,2019,42(10):836-840.  
External Quality Assessment Committee for Neonatal Disease Screening of Clinical Laboratory Center of National Health and Health Commission. Expert consensus on collection, delivery and preservation of neonatal disease screening filtration paper [J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2019, 42(10): 836-840.
- [12] 田刚,丁俊杰,刘靳波,等.两种检测系统测定血清肌红蛋白、肌酸激酶同工酶-MB及心肌肌钙蛋白I的比较实验研究[J].中外医学研究,2019,17(16):68-70.  
TIAN G, DING J J, LIU J B, et al. Comparison of two test systems for serum myoglobin, creatine kinase-MB and cardiac troponin I detection [J]. Chinese and Foreign Medical Research, 2019, 17(16): 68-70.
- [13] 周伶俐,魏力强.临床实验室应用不同检测系统检测血清心肌肌钙蛋白I结果的一致性分析研究[J].现代检验医学杂志,2022,37(2):137-141,161.  
ZHOU L L, WEI L Q. Consistency analysis of serum cardiac troponin I with different detection systems in clinical laboratory[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2022, 37(2): 137-141, 161.
- [14] 国家药品监督管理局.YY/T1789.3-2022:体外诊断检验系统性能评价方法第3部分检出限与定量限[S].北京:中国标准出版社,2022:1-30.  
National Medical Products Administration. YY/T1789.3-2022: In vitro diagnostic testing system performance evaluation methods Part 3: detection limit and quantitation limit[S]. Beijing: Standards Press of China, 2022:1-30.
- [15] 国家卫生健康委临床检验中心.国家卫生健康委临床检验中心室间质量评价标准[EB/OL]. [2024-04-21]. <https://www.nccl.org.cn/showEqaPlanProDetail?id=730>.  
National Center for Clinical Laboratories. The national center for health committee for clinical laboratory room between quality evaluation standard[EB/OL]. [2024-04-21]. <https://www.nccl.org.cn/showEqaPlanProDetail?id=730>.
- [16] 虞科颖,孙贺伟,金中淦,等.同位素稀释液相色谱串联质谱法测定血清17 $\alpha$ -羟孕酮候选参考测量程序的研究[J].中华检验医学杂志,2022,45(5):449-455.  
YU K Y, SUN H W, JIN Z G, et al. Analytical performance of a candidate reference measurement procedure for serum 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone based on liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2022, 45(5): 449-455.
- [17] 叶军.先天性肾上腺皮质增生症新生儿筛查[J].中国实用儿科杂志,2016,31(6):422-425.  
YE J. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia[J]. Chinese Journal of Practical Pediatrics, 2016, 31(6): 422-425.
- [18] 中华医学会儿科学分会内分泌遗传代谢病学组.先天性肾上腺皮质增生症21-羟化酶缺陷诊治共识[J].中华儿科杂志,2016,54(8):569-576.  
The Subspecialty Group of Endocrinologic, Hereditary and Metabolic Diseases, the Society of Pediatrics, Chinese Medical Association. Consensus statement on diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia due to 21hydroxylase deficiency [J]. Chinese Journal of Pediatrics, 2016, 54(8): 569-576.
- [19] 国家卫生健康委临床检验中心.临床检验定量测定项目室内质量控制允许不精密度[EB/OL].(2023-09-05). <https://www.nccl.org.cn/showEqaPtDetail?id=3053>.  
National Center for Clinical Laboratories. Quantitative determination of clinical inspection project indoor quality control allows not precision [EB/OL].(2023-09-05). <https://www.nccl.org.cn/showEqaPtDetail?id=3053>. 请核对
- [20] 杨荣荣,张萍.外周血液狼疮抗凝物质比值及T细胞免疫球蛋白黏蛋白分子3水平与孕早期复发性流产的相关性研究[J].现代检验医学杂志,2020,35(1):60-64.  
YANG R R, ZHANG P. Study on the relationship between ratio of lupus anticoagulant and levels of T-cell immunoglobulin-mucin molecule 3 in peripheral blood and recurrent abortion in early pregnancy[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(1): 60-64.

收稿日期: 2024-07-01

修回日期: 2024-07-29