

全自动时间分辨荧光免疫分析检测新生儿滤纸血斑 甲状腺素(T₄)改良竞争法的建立与评价

谭玉华¹, 马有成², 王春波¹, 徐思滢¹, 郑丹³, 余海枷¹, 冯健明¹

(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.成都市妇女儿童中心医院新生儿疾病筛查中心, 成都 610000; 3.中山大学附属第一医院医学检验科, 广州 510080)

摘要: **目的** 建立一种全自动时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)检测新生儿滤纸干血片(DBS)甲状腺素(T₄)改良竞争法, 并评价其性能。**方法** T₄竞争法配对单克隆抗体(包被抗体)包被微孔板作为反应板, 销标记T₄单克隆抗体(抗T₄)作为销标记物, 应用全自动TRFIA定量检测板针固定滤纸血斑中T₄浓度, 对其分析灵敏度、准确度、线性、精密度、特异度、色谱效应、基质效应、回收试验、体积效应、红细胞压积效应和稳定性等性能指标进行评价。选择120份同源的血清样品和DBS样品, 用于自建方法与T₄化学发光法的比对试验。收集新生儿足跟血DBS剩余样品312份, 用于T₄和促甲状腺素(TSH)联合检测。**结果** 空白限为0.44 μg/dl血清, 检出限为0.81 μg/dl血清, 定量限为1.61 μg/dl血清, 检测标准参考物质的相对偏差在-5.33%~1.83%间; 在1.61~50.00 μg/dl血清范围内, r 可达0.999 6; 批内、批间、重复性、实验室内和实验室间变异系数(CV)均在6.00%内; 检测9种高浓度的交叉物的反应率在0.021%~1.980%内, 检测20 μg/dl的D-T₄ DBS样品的交叉反应率为43.900%; 9种高浓度的干扰物质对T₄检测结果的干扰率均在±10%以内。边缘打孔的血斑检测结果高于中央、中央至边缘1/2处打孔检测结果($t=4.44$ 、 5.26 , 均 $P<0.05$); 3个不同批次的903滤纸制作的DBS样品实测值与理论值的相对偏差均在允许范围(±15.00%)内; 回收率在91.64%~104.07%间; 与50 μl/滴制备的DBS样品检测结果比较, 其他点样体积制备的DBS样品检测结果的差异具有统计学意义(均 $P<0.05$); 在35%~60%红细胞压积下制得DBS样品较50%红细胞压积制得DBS样品的检测结果的相对偏差均在±15%内; -20℃下标记物可反复冻融4次, 试剂在2~8℃下可保存14个月, 试剂在37±1℃下可保存9天。在2.07~36.11 μg/dl血清内, 自建方法与对比方法检测结果高度相关($r=0.995\ 5$, $t_r=112.73$, $P<0.05$); 检出率差异无统计学意义($\chi^2=0.50$ 、 0.50 , 均 $P>0.05$)。新生儿DBS样品T₄的平均浓度为18.90 μg/dl血清, T₄与TSH的检出率差异具有统计学意义($\chi^2=11.56$ 、 16.52 , 均 $P<0.05$)。**结论** 自建方法具有灵敏度高、准确度好、线性范围宽、精密度好和特异度高等优点, 与对比方法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; 滤纸干血片; 甲状腺素; 竞争法

中图分类号: R581.2; R446.61 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2026)05-031-09

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2026.05.006

Establishment and Evaluation of a Modified Competitive Method for Detecting Thyroxine (T₄) in Neonatal Dried Blood Spots by Fully Automatic Time- Resolved Fluoroimmunoassay

TAN Yuhua¹, MA Youcheng², WANG Chunbo¹, XU Siying¹, ZHENG Dan³, YU Haijia¹, FENG Jianming¹ (1. *In vitro* Diagnostic Reagent Research and Development Center, Guangzhou Fenghua Biotech Co., Ltd., Guangzhou 510730, China; 2. Neonatal Disease Screening Center, Chengdu Women and Children's Central Hospital, Chengdu 610000, China; 3. Department of Medical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: **Objective** To establish and evaluate a fully automatic time-resolved fluoroimmunoassay (TRFIA) based on a modified competitive method for detecting thyroxine (T₄) in neonatal dried blood spots (DBS). **Methods** Microplates coated with T₄ competitive-method paired monoclonal antibody (capture antibody) were used as the solid phase. Europium (Eu)-labeled T₄ monoclonal antibody (anti-T₄) was used as the tracer. The fully automatic TRFIA system was applied to quantitatively detect the T₄ concentration in the blood spots on the filter paper fixed onto plate needles. The analytical performance indicators, including sensitivity, accuracy, linearity, precision, specificity, chromatographic effect, matrix effect, recovery test, volume effect, hematocrit effect, and stability, were evaluated. 120 paired serum and DBS samples were selected for the comparison test between the self-developed method and the T₄ chemiluminescence method. Residual DBS samples from 312 newborns were used for combined T₄ and thyroid-stimulating hormone (TSH) detection. **Results** The limit of blank was 0.44 μg/dl serum, the limit of detection was 0.81 μg/dl

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, 主要从事医疗器械(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。

serum, and the limit of quantification was 1.61 $\mu\text{g/dl}$ serum. The relative deviations for certified reference materials ranged from -5.33% to 1.83%. Excellent linearity was observed within the range of 1.61~50.00 $\mu\text{g/dl}$ serum ($r=0.999\ 6$). The intra-assay, inter-assay, repeatability, laboratory and inter-laboratory coefficients of variation (CV) were all within 6.00%. The cross-reactivity rates for nine high-concentration cross-reaction substances ranged from 0.021% to 1.980%, and the cross-reactivity rate for 20 $\mu\text{g/dl}$ D-T₄ DBS sample was 43.900%. The interference rates of nine high-concentration interfering substances on T₄ measurements were all within $\pm 10\%$. Blood spots punched from the edge yielded higher results than those punched from the center or from the midpoint between the central and edge ($t=4.44, 5.26$, both $P<0.05$). The relative deviations between measured and theoretical values for DBS samples prepared with three different batches of 903 filter paper were all within the acceptable range ($\pm 15.00\%$). Recovery rates ranged from 91.64% to 104.07%. Compared with DBS samples prepared at a volume of 50 $\mu\text{L/drop}$, those prepared at other volumes showed statistically significant differences (all $P<0.05$). The relative deviations for DBS samples prepared at hematocrit levels of 35% to 60% compared with those at 50% were all within $\pm 15\%$. The Eu-marker could withstand up to four freeze-thaw cycles at $-20\ ^\circ\text{C}$, and the reagent could be stored at $2\text{ to }8\ ^\circ\text{C}$ for 14 months and at $37\pm 1\ ^\circ\text{C}$ for 9 days. Within the range of 2.07~36.11 $\mu\text{g/dl}$ serum, the results of the established method showed a strong correlation with those of the comparator method ($r=0.995\ 5$, $t_r=112.73$, $P<0.05$), with no statistically significant difference in detection rates between the two methods ($\chi^2=0.50$ and 0.50 , both $P>0.05$). The average concentration of T₄ in neonatal DBS samples was 18.90 $\mu\text{g/dl}$ serum. The detection rates of T₄ and TSH differed significantly ($\chi^2=11.56$ and 16.52 , all $P<0.05$). **Conclusions** The established method demonstrates high sensitivity, good accuracy, wide linear range, excellent precision and high specificity. It shows strong correlation and consistency with the comparative method, and meets the requirements for routine clinical testing.

Keywords: time-resolved fluoroimmunoassay; dried blood spot; thyroxine; competitive method

先天性甲状腺功能减退症(congenital hypothyroidism, CH)是一种新生儿常见内分泌疾病,严重影响儿童智力和生长发育^[1]。通过新生儿疾病筛查(newborn screening, NBS)早期发现CH并进行治疗,可以预防智力和体格发育的不可逆损伤^[1-9]。大多数国家CH的NBS计划主要基于促甲状腺素(thyroid-stimulating hormone, TSH)检测,但无法筛查到中枢性CH^[1-6]。欧洲儿科内分泌学会的CH指南建议在NBS项目中增加总甲状腺素(thyroxine, T₄)或游离T₄用于中枢性CH筛查^[5]。2023年美国儿科学会也提出了TSH和T₄检测的3种不同方案^[6]指导CH筛查。早在20世纪70年代Dussault开发了放射免疫分析法测量滤纸干血片(dried blood spot, DBS)中的总T₄浓度,首先在加拿大开展CH筛查^[3-4, 8-9]。由于放射免疫分析法具有放射性污染,后来被酶联免疫法、荧光免疫分析法、化学发光法和时间分辨荧光免疫分析(time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)法所取代。随着全自动技术的应用,TRFIA已成为新生儿CH筛查的主流检测方法^[10]。既往检测T₄的竞争法存在特异度差、灵敏度低和半抗原批间不稳定等缺点。本研究旨在建立一种高灵敏度和高特异度的全自动TRFIA检测新生儿滤纸血斑T₄改良竞争法,以为新生儿中枢CH提供一种筛查方法。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集出生72h后且在7天之内,并充分哺乳的新生儿足跟血DBS剩余样品312份用于T₄和TSH联合检测。选择120份同源的血清样品和DBS样品,用于方法学比对试验。样品均非本研究

试验目的而专门采集,不涉及受检者任何信息,对受检者几乎无任何损害和潜在风险^[11],研究获得广州市丰华医学检验实验室伦理委员会的批准(编号:FHCS04-13)。

1.2 仪器与试剂 L-T₄标准参考物质(T-073-1ML)(美国Merck公司); L-T₄干粉(美国MedChemExpress公司); 鼠抗人T₄单克隆抗体(抗T₄)和T₄竞争法配对单克隆抗体(包被抗体)(安徽千诚生物技术有限公司); 903滤纸(样品收集纸CF12)(英国whatman公司); N1-(P-异硫氰基苄基)-二乙三胺四乙酸锕钠(美国Revvity公司); T₄测定试剂盒(直接化学发光法)和ADVIA Centaur CP全自动化学发光免疫分析仪(德国Siemens Healthineers公司); 板针和96孔酶标微孔板(深圳市金灿华实业有限公司); 新生儿TSH测定试剂盒(TRFIA法)、增强液、洗脱释放缓冲液^[12]、浓缩洗液、Easy DBS 680型全自动打孔机和AutoTRFIA-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); 其他试剂为国产试剂。

1.3 方法

1.3.1 全自动TRFIA检测新生儿滤纸血斑T₄改良竞争法建立:

1.3.1.1 校准品和质控品的制备: 采用血清T₄的浓度代表滤纸干血斑中血清T₄的浓度。换算系数: $1\mu\text{g/dl}$ 血清=0.5 $\mu\text{g/dl}$ 全血=12.9nmol/L血清=6.5nmol/L全血。以L-T₄标准参考物质为对照,参照文献[12]的方法制备浓度为0、2.00、4.00、8.00、16.00和50.00 $\mu\text{g/dl}$ 血清的T₄ DBS校准品A~F($S_A\sim S_F$),以及3.00、7.00和12.00 $\mu\text{g/dl}$ 血清的T₄ DBS质控品(C1~C3)。DBS

的 $S_A \sim S_F$ 和C1~C3均按GB/T 21415-2008^[13]计量学溯源至L-T₄标准参考物质。

1.3.1.2 微孔反应板的制备:采用棋盘滴定法确定包被抗体最适包被浓度,将包被抗体用20mmol/L、pH 9.6碳酸盐缓冲液稀释成包被液,采用含有50g/L蔗糖和10g/L牛血清白蛋白的20mmol/L、pH7.4的磷酸盐缓冲液作为封闭液,再参照文献[14]的方法制备微孔反应板。

1.3.1.3 铈标记物的制备:将抗T₄与N1-(P-异硫氰基苄基)-二乙三胺四乙酸铈钠按质量比1:1混合,再参照文献[14]的方法,制作铈标记物母液。采用棋盘滴定法确定铈标记物母液最适工作浓度。铈标记物母液采用洗脱释放缓冲液^[12]稀释成铈标记物工作液。采用正交实验检测高、中、低3份样品(S1~S3)确定洗脱释放缓冲液中水杨酸钠(sodium salicylate, NaSal)和8-苯胺-1-萘磺酸(8-anilino-1-naphthalene-sulfonic acid, ANS)的最佳工作浓度。

1.3.1.4 检验步骤: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、质控品或样品的DBS上的中央至边缘1/2处采集到3.2mm(1/8 inch)的血斑,并自动依次固定在血片支架的板针上,将固定有血斑的血片支架转移至AutoTRFIA-4型全自动荧光免疫分析仪上,自动向微孔反应板的微孔中加入150 μ l铈标记物工作液,将板针固定的校准品、质控品或样品血斑依次放入铈标记物工作液中,微孔反应板上包被的包被抗体与校准品、质控品或样品中的抗原竞争结合铈标记物中的抗T₄,缓慢振荡孵育120min后,移去板针固定的校准品、质控品或样品血斑,采用洗涤工作液洗涤微孔反应板6次,加入150 μ l增强液,缓慢振荡孵育5min,在判读仪中检测荧光计数值(fluorescence value, FV)[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 比对方法操作:T₄测定试剂盒(直接化学发光法)与ADVIA Centaur CP全自动化学发光免疫分析仪配套组成T₄化学发光法;新生儿TSH测定试剂盒(TRFIA法)与AutoTRFIA-4型全自动荧光免疫分析仪配套组成TSH TRFIA法;严格按试剂盒及仪器说明书进行操作。

1.3.3 性能评价:

1.3.3.1 剂量-反应曲线评价:采用双对数(log-log_B)数学模型,三次样条插值(spline)函数拟合剂量-反应曲线,校准品的FV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 分析灵敏度评价:参照YY/T 1789.3-2022^[15]进行空白限(limit of blank, LoB)、检出限(limit of de-

tection, LoD)和定量限(limit of quantification, LoQ)评价,LoD应不高于1 μ g/dl^[16]。

1.3.3.3 准确度评价:依次检测2.00、8.00和32.00 μ g/dl血清的L-T₄标准参考物质稀释品的DBS样品各3次,3次结果的相对偏差均应在 $\pm 15.00\%$ ^[16]范围内。

1.3.3.4 线性评价:将T₄高值样品血清稀释成理论浓度为1.61、4.00、8.00、16.00、32.00和50.00 μ g/dl,制作成DBS样品,每一浓度样品重复测定2次,计算其 $\bar{x}$ 为实测浓度,将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。

1.3.3.5 精密度评价:同一批次试剂盒平行检测低、中、高3个浓度的质控品各10次,计算批内变异系数(coefficient of variation, CV),均应不大于15%^[16]。用3个批号的试剂盒重复测定每个质控品各10次,得到的30次测量结果,计算批间CV,均应不大于20%^[16]。并按YY/T 1789.1-2021^[17]进行重复性、实验室内和实验室间精密度评价,其CV应分别不大于15%、20%和20%。

1.3.3.6 交叉反应评价:检测浓度为1 000 μ g/dl的三碘甲状腺原氨酸(triiodothyronine, T₃)和反三碘甲状腺原氨酸(reverse triiodothyronine, rT₃),10 000 μ g/dl的3, 3', 5'-三碘甲状腺乙酸(benzeneacetic acid, BA)、3, 5-二碘-L-酪氨酸(3,5-L-diiodotyrosine, L-DDT)、3-碘-L-酪氨酸(3-iodo-tyrosine, H-Tyr)、TSH、3,3'-二碘-L-甲状腺氨酸(3,3'-L-Diiodothyronine, T₂)、抗甲状腺球蛋白抗体(anti-thyroglobulin antibodies, TGAb)和抗甲状腺过氧化物酶抗体(anti-thyroid peroxidase antibody, Anti-TPOAb),以及20 μ g/dl的D-T₄ DBS样品,其交叉反应率=100% $\times$ 测定值/干扰物浓度。

1.3.3.7 干扰实验:选择4.00和16.00 μ g/dl血清的样品作为干扰评价基础样品。分别制备浓度为200 000.00ng/ml的5, 5-二甲基海因(5,5-dimethylhydantoin, DMH)、苯基丁氮酮(phenylbutazone, PB)、6-丙基-2-硫脲嘧啶(6-propyl-2-thiouracile, PTU)、甲巯咪唑(methimazole, MMI)、3, 3'-亚甲基双(4-羟基香豆素)(dicumarol, DCM)和乙酰水杨酸(acetyl salicylic acid, ASA),以及6.00mg/ml的胆红素(bilirubin, BIL)、400.00mg/ml的甘油三酯(triacylglycerol, TAG)和4 280.00 IU/dl的类风湿因子(rheumatoid factor, RF)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,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DBS样品。分别测定添加样品和对照样品,每个样品重复检测3次,分别计算其为实测值,其干扰率=100% $\times$ (添加样品实测值-对照样品实测值)/对照样品实测值。

1.3.3.8 DBS法色谱效应:选取30份不同的DBS样

品,参照文献[18]的方法,在DBS样品中央、中央至边缘1/2处及边缘打孔进行检测。

1.3.3.9 DBS法基质效应:参照文献[12]的方法将L-T₄标准参考物质稀释成2.00、4.00、8.00、16.00和32.00 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 血清的样品(S4~S8),选用3个不同批次的903滤纸,以50 μL /滴滴加在903滤纸上,自然条件下干燥,制作成DBS的S4~S8后进行检测,实测值与理论值相对偏差均应在 $\pm 15.00\%$ ^[16]范围内。

1.3.3.10 DBS法回收试验:参照文献[12]的方法将L-T₄标准参考物质稀释成3.11、6.98和12.30 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 血清的样品(S9~S11),以50 μL /滴滴加在903滤纸上,自然条件下干燥,制作成DBS样品后进行检测。并参照文献[19]的方法,计算检测浓度与目标浓度比较的回收率。

1.3.3.11 DBS法体积效应:参照文献[20]的方法进行评价,将T₄为2.00、9.00和32.00 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 血清的样品(S12~S14),分别以10、25、35、50、75和100 μL /滴的点样量滴加在903滤纸上,自然条件下干燥,制作成DBS样品后,分别测量其直径(误差范围 $\pm 0.5\text{mm}$)^[19]后进行检测。

1.3.3.12 DBS法红细胞压积效应:参照文献[20]的方法进行评价,将T₄为2.00、8.00和32.00 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 血液的样品(S15~S17)分离出血浆和细胞,然后按照15%、20%、25%、30%、35%、45%、50%、55%、60%、65%、75%、80%和85%的红细胞压积,分别在血浆中加入相应样品的细胞,以50 μL /滴滴加在903滤纸上,自然条件下干燥,制作成DBS样品后进行检测。

1.3.3.13 稳定性试验:将标记物置于 -20°C 下冻存,反复冻融4次;将试剂盒置于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存14个月,再置于 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 保存9天。分别检测S_A~S_F的FV与首次放置前的FV进行比较,其FV变化率在 $\pm 10\%$ 内,且灵敏度、线性、准确度和精密度应符合要求。

1.3.3.14 方法学比对试验:自建方法与T₄化学发光法(对比方法)分别检测同源的120份DBS样品和血清样品,检测结果的 r 应不低于0.975 0,引用文献[21]的3分类变量切值($< 10\mu\text{g}/\text{dl}$ 、 $10\sim 15\mu\text{g}/\text{dl}$ 、 $> 15\mu\text{g}/\text{dl}$ 血清),进行医学决定水平($10\mu\text{g}/\text{dl}$ 和 $15\mu\text{g}/\text{dl}$ 血清)处的预期估计值偏倚分析,预期估计值的相对偏倚的95%CI应在 $\pm 15\%$ ^[16]内;并采用Bland-Altman分析,应不少于95%的数据点在一致限的95%CI内,且一致限的95%CI应在临床可接受标准($\pm 15\%$)^[16]内;两种方法以 $10\mu\text{g}/\text{dl}$ 血清或 $15\mu\text{g}/\text{dl}$ 血清为切值,分别进行阴阳性检出率比较,检出率差异应无统计学意义。

1.3.3.15 新生儿足跟血DBS样品T₄浓度分布探究:自建方法与TSH TRFIA法平行检测312例新生儿DBS样品。T₄以 $10\mu\text{g}/\text{dl}$ 血清或 $15\mu\text{g}/\text{dl}$ 血清为切值,TSH以9 IU/ml为切值,并根据新生儿胎龄和体重进

行分层,分析新生儿样品T₄的分布情况。

1.4 统计学分析 采用Excel软件和SPSS 27软件进行统计分析。采用柯尔莫戈洛夫-斯米诺夫检验(K-S检验)或夏皮洛-威尔克检验(S-W检验)进行正态性检验,偏态分布采用百分位数(P_x)表示,正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示;计量资料的组间比较采用 t 检验;方法学比对试验结果的相关性采用Pearson相关性分析,一致性采用Bland-Altman分析;计数资料以 $n(\%)$ 表示,组间比较采用 χ^2 检验,一致性采用Kappa指数(kappa coefficient, κ)分析, $\kappa > 0.75$ 为高度一致, $0.75 \geq \kappa > 0.4$ 为一致, $\kappa \leq 0.4$ 为一致性差。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 包被抗体和钨标记抗T₄母液最适工作浓度 当包被抗体包被浓度为5.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$,钨标记抗T₄母液稀释比为1:4 000时,S_B的FV与S_A的FV的比值(S_B/S_A)为83.54%(在75%~90%间),S_F的FV与S_A的FV的比值(S_F/S_A)为13.70%(在10%~25%间), S_B/S_F 为6.10(大于3.00)且最大,确定为最适工作浓度。

2.2 NaSal和ANS最适工作浓度 当NaSal和ANS含量分别为1.25‰和0.75‰时,高、中、低浓度的样品S1~S3的检测浓度分别为 27.61 ± 1.19 、 12.67 ± 0.44 和 $4.14 \pm 0.17 \mu\text{g}/\text{dl}$ 血清,并已达到最高; S_B/S_A 为84.84%, S_F/S_A 为13.74%, S_B/S_F 为6.17且最大,表明NaSal和ANS在此浓度下可充分释放T₄,又不影响免疫反应。

2.3 剂量-反应曲线 S_A~S_F的FV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1.000 0。

2.4 分析灵敏度 5份空白样品实测结果的为0.20 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 血清, s 为0.14 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 血清,采用参数法计算LoB为0.44 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 血清;5份在1~5倍LoB的低浓度样品实测结果的 s 为0.54 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 血清,采用参数法计算LoD为0.81 $\mu\text{g}/\text{dl}$;采用基于总误差(total error, TE)要求的方法建立LoQ,5份预期在LoQ目标浓度附近的样品中,当在理论浓度1.61 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 血清时,实测结果的 $\bar{x}$ 为1.59 $\mu\text{g}/\text{dl}$, s 为0.060 $\mu\text{g}/\text{dl}$,偏差为 $-0.020 \mu\text{g}/\text{dl}$,TE为0.10 $\mu\text{g}/\text{dl}$,TE(%)为6.44% $< 15\%$,LoQ为1.61 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 。

2.5 准确度 检测2.00、8.00和32.00 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 血清的L-T₄标准参考物质的平均相对偏差分别为1.83%、-5.33%和-4.97%。

2.6 线性 在1.61~50.00 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 血清范围内,L-T₄标准参考物质的实测浓度与理论浓度的线性回归方程为 $Y=1.027X-0.094 8$, $r=0.999 6$ 。

2.7 精密度 T₄低浓度血清质控品的批内、批间、重复性、实验室内和实验室间检测结果分别为 3.05 ± 0.29 、 3.09 ± 0.40 、 3.07 ± 0.09 、 3.07 ± 0.10 和 $3.08 \pm 0.17 \mu\text{g}/\text{dl}$,CV分别为3.15%、4.36%、3.00%、3.41%

和5.36%;中浓度质控品的批内、批间、重复性、实验室内和实验室间检测结果分别为 7.04 ± 0.69 、 7.11 ± 0.75 、 7.38 ± 0.21 、 7.38 ± 0.23 和 $7.13 \pm 0.20 \mu\text{g/dl}$, CV分别为3.29%、3.49%、2.89%、3.09%和2.83%;高浓度质控品的批内、批间、重复性、实验室内和实验室间检测结果分别为 11.96 ± 0.92 、 11.89 ± 0.88 、 12.23 ± 0.31 、 12.23 ± 0.32 和 $11.52 \pm 0.54 \mu\text{g/dl}$, CV分别为2.56%、2.47%、2.57%、2.59%和4.70%。

2.8 交叉反应 检测 $1\ 000 \mu\text{g/dl}$ 的 T_3 和 rT_3 , $10\ 000 \mu\text{g/dl}$ 的BA、L-DDT、H-Tyr、TSH、 T_2 、TGA和Anti-TPOAb, 以及 $20 \mu\text{g/dl}$ 的D- T_4 DBS样品, 其交叉反应率分别为1.510%、1.980%、0.610%、0.028%、0.024%、0.022%、0.021%、0.038%、0.040%和43.900%。

2.9 干扰率 终浓度为 $10\ 000.00 \text{ ng/ml}$ 的DMH、PB、PTU、MMI、DCM和ASA, 以及 0.30 mg/ml 的BIL, 20.00 mg/ml 的TAG和 214.00 IU/dl 的RF, 对终浓度为 $3.80 \mu\text{g/dl}$ 血清的 T_4 样品检测结果的干扰率分别为-6.08%、-8.68%、9.06%、-6.08%、-9.03%、-9.69%、-9.43%、-9.83%和-9.15%, 对终浓度为 $15.20 \mu\text{g/dl}$ 血清的 T_4 样品检测结果的干扰率分别为-7.46%、-8.82%、-5.55%、-9.33%、-8.77%、-0.15%、-9.38%、-9.03%和5.81%。

2.10 DBS法色谱效应 30份DBS样品在中央、中央至边缘1/2处及边缘打孔的血斑检测的结果分别为 11.88 ± 2.99 、 13.25 ± 3.34 和 $14.93 \pm 3.94 \mu\text{g/dl}$ 血清, 中央、边缘打孔较中央至边缘1/2处打孔的血斑检测结果, 差异具有统计学意义($t=4.44$ 、 5.26 , 均 $P<0.05$)。

2.11 DBS法基质效应 3个不同批次的903滤纸制作S4-S8的DBS样品, 实测值与理论值的相对偏差分别在-3.25%~0.13%、-10.13%~-2.63%和-1.13%~11.38%内。

2.12 DBS法回收试验 S9~S11的检测浓度分别为2.85、6.83和 $12.80 \mu\text{g/dl}$ 血清, 回收率分别为91.64%、97.85%和104.07%。

2.13 DBS法体积效应 10、25、35、50、75和 $100 \mu\text{L}$ 滴制得DBS样品的直径分别为 6.0 ± 0.5 、 8.5 ± 0.5 、 10.2 ± 0.5 、 12.1 ± 0.5 、 15.6 ± 0.5 和 $18.1 \pm 0.5 \text{ mm}$; 与 $50 \mu\text{L}$ 滴制得的DBS样品检测结果比较, 10、25、35、75和 $100 \mu\text{L}$ 滴制得的DBS样品检测结果的差异具有统计学意义($t=2.97 \sim 10.12$, 均 $P<0.05$, $n=8$), 且相对偏差均超过 $\pm 15\%$ 。

2.14 DBS法红细胞压积效应 按15%~85%红细胞压积制得DBS样品, 其直径分别为 12.6 ± 0.5 、 12.4 ± 0.5 、 12.4 ± 0.5 、 12.3 ± 0.5 、 12.3 ± 0.5 、 12.3 ± 0.5 、 12.1 ± 0.5 、 12.1 ± 0.5 、 12.1 ± 0.5 、 12.0 ± 0.5 、 11.9 ± 0.5 和 $11.9 \pm 0.5 \text{ mm}$; 与50%红细胞压积制得DBS样品的检测结果比较, 55%红细胞压积制得DBS样品的检测结果间差异无统计学意义($t=0.02 \sim 2.75$, 均 $P>0.05$, $n=5$), 其他红细胞压积制得DBS样品检测结果差异有统计学意义($t=2.82 \sim 26.06$, 均 $P<0.05$, $n=5$), 在红细胞压积35%、45%、55%和60%下制得DBS样品的检测结果的相对偏差均在 $\pm 15\%$ 内。

2.15 稳定性试验 见表1。-20℃下标记物冻融4次、2~8℃试剂保存14个月和 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 试剂保存9天, 验证FV变化率、分析灵敏度、线性、准确度和批内精密度均符合要求。

表1 稳定性试验结果 [$n(\%)$, $\mu\text{g/dl}$]

条件	FV变化率	LOB	LOD	LOQ	线性	r	相对偏差	批内CV
-20℃下标记物冻融4次	-0.16 ~ 3.92	0.41	0.80	1.61	1.61 ~ 50.00	0.999 6	0.88 ~ 7.25	1.50 ~ 6.12
2 ~ 8℃试剂保存14个月	1.17 ~ 5.28	0.43	0.80	1.61	1.61 ~ 50.00	0.999 9	0.97 ~ 4.44	1.86 ~ 3.04
$37 \pm 1^\circ\text{C}$ 试剂保存9天	4.55 ~ 8.49	0.45	0.82	1.61	1.61 ~ 50.00	0.999 8	0.50 ~ 6.00	1.63 ~ 2.33

2.16 方法学比对结果 见图1。在 $2.07 \sim 36.11 \mu\text{g/dl}$ 血清内, 自建方法与对比方法检测结果高度相关($Y=1.022\ 4X-0.032\ 2$, $r=0.995\ 5$, $t_r=112.73$, $P<0.05$); $10 \mu\text{g/dl}$ 和 $15 \mu\text{g/dl}$ 血清的预期偏倚估计值的相对偏倚分别为1.92%(95%CI: 0.91%, 2.92%)和2.03%(95%CI: 1.35%, 2.70%); 经Bland-Altman分析, 100%的数据点在一致限(95%CI: -9.39, 13.16)内, 且一致限95%CI在临床允许误差($\pm 15\%$)内, 两种方法具有互换性; 以 $10 \mu\text{g/dl}$ 为切值, 阳性和阴性符合率分别为98.04%(50/51)和98.55%(68/69), κ 为0.97, 检出率差异无统计学意义($\chi^2=0.50$, $P>0.05$); 以 $15 \mu\text{g/dl}$ 为切值, 阳性和阴性符合率分别为100%(73/73)和95.74%(45/47), κ 为0.96, 检出率差异无统计学意义

($\chi^2=0.50$, $P>0.05$), 两种方法检测结果具有一致性。

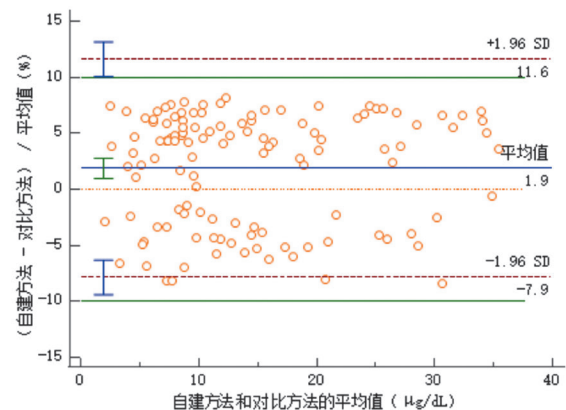


图1 自建方法与对比方法检测结果的 Bland-Altman 图

2.17 新生儿足跟血DBS样品T₄浓度分布 见表2。312份新生儿DBS样品T₄浓度分布呈正偏态分布(K-S=0.053, *P* < 0.05; S-W=0.99, *P* < 0.05), $\bar{x}$ 为18.90 μg/dl血清,中位数为18.61μg/dl血清; *P*₁、*P*₂、*P*_{2.5}、*P*₃、*P*₄、*P*₅、*P*₈和*P*₁₀分别为8.43、11.34、11.49、11.59、12.02、12.48、13.32和14.01μg/dl血清。在T₄ < 10 μg/dl血清且TSH ≥ 9 μIU/ml, T₄ < 10μg/dl血清且TSH < 9 μIU/ml, T₄ > 10μg/dl血清且TSH ≥ 9 μIU/ml的样品分别为0例、4例(1.25%)和21例(6.73%), T₄与TSH的阳

性检出率差异具有统计学意义($\chi^2=11.56$, *P* < 0.05)。T₄ < 15μg/dl血清且TSH ≥ 9 μIU/ml, T₄ < 15μg/dl血清且TSH < 9 μIU/ml, T₄ > 15 μg/dl血清且TSH ≥ 9 μIU/ml的样品分别为6例(1.92%)、47例(15.06%)和15例(4.81%), T₄与TSH的阳性检出率差异具有统计学意义($\chi^2=16.52$, *P* < 0.05)。其中T₄ < 10μg/dl血清且TSH < 9 μIU/ml组的4例新生儿均在正常体重的足月儿组中,均非中枢性CH,而T₄ > 15μg/dl血清且TSH ≥ 9 μIU/ml组的1例新生儿确诊为原发性CH。

表 2 新生儿足跟血 DBS 样品 T ₄ 浓度分布					
T ₄ 浓度 (μg/dl 血清)	TSH 浓度 (μIU/ml)	胎儿体重 (g)		孕龄 (周)	
		<2 500	≥ 2 500	<37	≥ 37
5 ~ 10	< 9	0	4	0	4
	9 ~ 18	0	0	0	0
	> 18	0	0	0	0
10 ~ 15	< 9	1	42	0	43
	9 ~ 18	0	5	0	5
	> 18	0	1	0	1
>15	< 9	10	234	11	233
	9 ~ 18	0	15	0	15
	> 18	0	0	0	0

3 讨论

T₄是一种分子量为776.87 Da的小分子物质,既往T₄检测采用的免疫竞争法,需引入T₄偶联蛋白类似物作为竞争性抗原。T₄偶联蛋白类似物制作工艺较为复杂,纯度不足,批间差异较大,特别引入偶联蛋白可能引起非特异免疫反应,导致不同厂家试剂和不同方法间检测结果可比性差,特异度不高,精密度差^[22]。

随着分子检测技术、人工智能和微生物学发展,抗体制备技术得到较大发展,尤其是单克隆抗体具有高度均一性、纯度高、特异度强且可大量制备等特点,广泛应用于疾病的诊断和防治^[23]。目前小分子物质的检测方法也随之有了明显的改进^[24-25],本研究利用TRFIA技术建立了一种改良竞争法检测T₄,将特异针对抗T₄的鼠单克隆抗体代替了传统的T₄偶联蛋白类似物,与待测T₄竞争结合钨标记物中的抗T₄,洗涤后保留固相上的包被抗体与钨标记抗T₄的免疫复合物。该改良竞争法的原理也可适用于其他小分子物质(如皮质醇、睾酮、孕酮、醛固酮、雌二醇和药物等)的检测。本研究结果表明自建方法具有良好的准确度、精密度和特异度。

既往T₄常采用血清检测,其样品使用量大。NBS是通过实验室方法检测DBS相关指标来实现^[26],DBS具有采集方便、成本低廉和易于储存和转运,但NBS实验室使用标本为3.2mm(1/8 inch)血斑,血清量相当于(1.5 ± 0.17) μl^[27],对血斑中的相关指标检测要求方法学具有超高灵敏度。在人体血液中99.97%的T₄是可逆性地结合在运转蛋白上^[28],这种可逆性结合为T₄定量检测带来了困难,因此,在检测总T₄时,必须采用释放剂将结合形式的T₄分子全部释放出来,这样才能得到准确的总T₄的含量^[29-30]。本研究应用了高灵敏度和高特异度的全自动TRFIA技术,便于大样品筛查,有效提高了工作效率;结合使用血片支架板针固定血斑技术,自动采集血斑,利于血斑上待测物在钨标记物工作液中充分接触、洗脱并充分反应,解决了传统DBS检测方法存在的血斑上浮现象,进而有利于提高检测准确度、灵敏度和精密度。本研究配制钨标记物工作液的洗脱释放缓冲液中含有适宜浓度的水杨酸钠和8-苯胺-1-萘磺酸,两者能协同将结合形式的T₄分子释放出来^[12],提高了总T₄的检测准确度和灵敏度。本研究的检出限(0.81 μg/dl血清)满足行业标准的要求(不高于1 μg/dl)^[16],优于文献[31]报道的

灵敏度($1\mu\text{g/dl}$)。自建方法的线性范围($1.61\sim 50.00\mu\text{g/dl}$)宽,且与对比方法具有高度相关性($r=0.9955$, $t_r=112.73$, $P<0.05$)和互换性,线性范围能覆盖到文献[31]报道的临床样品检测范围($8.4\sim 35.7\mu\text{g/dl}$),满足临床需求。

色谱效应、体积效应和红细胞压积效应是DBS法的特异性参数指标^[20]。本研究发现DBS法 T_4 检测具有明显的色谱效应,边缘打孔的浓度明显偏高,与文献[18-19, 32]报道中检测TSH、17 α -羟孕酮、氨基酸和肉碱的结论一致,但与文献[18, 33]中检测苯丙氨酸和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶得到的结论不一致,这可能与待测物在血清和血浆中的分布情况,及不同血液成分在滤纸基质中的吸收存在差异有关。有研究^[32]报道DBS中央至边缘1/2以内区域是检测的最佳部位。本研究发现检测结果明显受体积效应的影响,这可能与血液在滤纸基质中的扩散速度、扩散面积以及干燥速度等因素有关,因此在采集新生儿足跟血时一定要严格按照技术规范^[34]进行操作,可以使用微型收集移液管、容量吸收微量采样或微针等方法确保全血点样体积的一致性^[20]。在红细胞压积效应研究中发现35%~60%红细胞压积下制得DBS样品与50%红细胞压积制得DBS样品的检测结果比较,相对偏差均在可接受标准($\pm 15\%$)范围内,红细胞压积范围基本覆盖正常新生儿红细胞压积($0.430\sim 0.630$)^[35],但要考虑红细胞严重减少或增多时对DBS法检测结果的影响。另外需要严格筛选滤纸类型和控制每批滤纸的质量,以降低滤纸基质对检测结果的影响^[20]。

本研究检测新生儿足跟血DBS样品中的 T_4 的平均值($18.90\mu\text{g/dl}$)稍高于文献[21]报道的 T_4 平均值($17.6\mu\text{g/dl}$),且TSH的初筛阳性率(6.73%)明显高于文献[36]报道的初筛阳性率(1.02%~1.27%),可能与采集样品的新生儿群体、地域、季节和温度等因素差异有关^[37-38]。本研究采集的样品均集中在2月,温度相对其他季节较低,新生儿出生后受冷刺激应激反应,可导致TSH水平明显升高,因此春冬季宜使用较夏秋季更高的切值^[37-38]。据报道^[6] T_4 和TSH的联合检测有助于提高轻度原发性CH以及中枢性CH患儿的检出率,但本研究中4例低 T_4 ($<10\mu\text{g/dl}$ 血清)新生儿均非中枢性CH,或与暂时性低 T_4 血症有关。 T_4 对机体代谢以及神经系统的发育有着重要作用,暂时性低 T_4 血症一定程度上会增加中枢神经系统发育缺陷的风险,需及时采取有效治疗方式,改善其症状^[39]。另外选择合理的筛查方案或策略^[3-6]以及优化合适的切值^[1, 4-5]对降低假阳性非常关键,避免增加过多的新生儿召回复查。另外仍有待采用多中心大样本研究以验证 T_4 和TSH联合检测的效能。

综上所述,本研究建立的全自动TRFIA检测新生儿滤纸血斑 T_4 改良竞争法,自动化程度高,操作简便,便于大样品筛查,具有灵敏度高、准确度高、线性范围宽、精密度好和特异度高等优点,与对比方法检测结果间具有高度的线性相关性和一致性,满足临床检测需求。

参考文献:

- [1] 先天性甲状腺功能减退症诊治指南工作组,中华医学会儿科学分会,中华医学会儿科学分会.先天性甲状腺功能减退症诊治指南[J].中华内分泌代谢杂志, 2025, 41(4): 267-288.
Working Group on Guidelines for Diagnosis and Treatment of Congenital Hypothyroidism; Chinese Society of Endocrinology, Chinese Medical Association; Chinese Pediatric Society, Chinese Medical Association. Guidelines for diagnosis and treatment of congenital hypothyroidism[J]. Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism, 2025, 41(4): 267-288.
- [2] MARTYNA K, AGNIESZKA K, IWONA B S. Congenital hypothyroidism in preterm newborns-the challenges of diagnostics and treatment: a review[J]. Frontiers in Endocrinology, 2022, 13: 860862.
- [3] BOELEN A, ZWAVELING-SOONAWALA N, HEIJBOER A C, et al. Neonatal screening for primary and central congenital hypothyroidism: is it time to go Dutch?[J]. European Thyroid Journal, 2023, 12(4): e230041.
- [4] BOELEN A, HEIJBOER A C. Newborn screening and the screening laboratory: past, present and future[J]. European Thyroid Journal, 2025, 14(1): e240325.
- [5] MARK R G, CHRISTIAAN F M, ANITA B, et al. Newborn screening for central congenital hypothyroidism: past, present and future[J]. European Thyroid Journal, 2025, 14(1): e240329.
- [6] 刘畅,张立琴,杜玮,等.2023年美国儿科学会先天性甲状腺功能减低症筛查与管理指南解读[J].中国儿童保健杂志, 2024, 32(6): 637-642.
LIU C, ZHANG L Q, DU W, et al. Interpretation of guideline on the screening and management of congenital hypothyroidism issued by American Academy of Pediatrics in 2023[J]. Chinese Journal of Child Health Care, 2024, 32(6): 637-642.
- [7] 孙伟杰,高莹,侯新琳,等.胎儿及新生儿甲状腺功能异常的产前诊断及治疗[J].中华围产医学杂志, 2021, 24(5): 321-325.
SUN W J, GAO Y, HOU X L, et al. Prenatal diagnosis and management of fetal/neonatal thyroid dysfunction[J]. Chinese Journal of Perinatal Medicine, 2021, 24(5): 321-325.
- [8] 刘启满,唐文佩.先天性甲状腺功能减退症的全球筛查史[J].中华围产医学杂志, 2024, 27(7): 603-606.
LIU Q M, TANG W P. Global history of screening for congenital hypothyroidism[J]. Chinese Journal of Perinatal Medicine, 2024, 27(7): 603-606.
- [9] 叶娟,罗小平.新生儿期甲状腺功能异常相关诊疗问题[J].中华围产医学杂志, 2012, 15(2): 65-68.

- YE J, LUO X P. Diagnosis and treatment issues related to thyroid dysfunction in the neonatal period[J]. Chinese Journal of Perinatal Medicine, 2012, 15(2): 65-68.
- [10] 中华预防医学会出生缺陷预防与控制专业委员会新生儿遗传代谢病筛查学组, 国家卫生健康委员会临床检验中心新生儿遗传代谢病筛查室间质评专业委员会. 新生儿遗传代谢病筛查实验室检测技术规范专家共识[J]. 中华新生儿科杂志, 2023, 38(8): 449-454.
- Screening Group of Neonatal Genetic Metabolic Disease, Special Committee of Birth Defects Prevention and Control, Chinese Preventive Medical Association; Newborn Genetic Metabolic Disease Screening Laboratory Quality Evaluation Professional Committee from Clinical Laboratory Center of National Health Commission. Consensus on laboratory testing technical guidelines of neonatal genetic metabolic disease screening [J]. Chinese Journal of Neonatology, 2023, 38(8): 449-454.
- [11] 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.
- [12] 广州市丰华生物股份有限公司. 一种滤纸干血片甲状腺素测定试剂盒及其检测方法: CN202510603128.5 [P]. 2025-08-05.
- Guangzhou Fenghua Biotech Co., Ltd.. A filter paper dry blood tablet thyroid hormone determination kit and its detection method: CN202510603128.5 [P]. 2025-08-05.
- [13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 21415-2008: 体外诊断医疗器械-生物样品中量的测量-校准品和控制物质赋值的计量学溯源性[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China; China National Standardization Administration. GB/T 21415-2008: In vitro diagnostic medical devices-measurement of quantities in biological samples-metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials[S]. Beijing: Standards Press of China, 2008.
- [14] 谭玉华, 曹春玲, 张润锋, 等. 时间分辨荧光免疫法检测胎盘生长因子的方法建立及性能评价[J]. 现代检验医学杂志, 2023, 38(1): 112-116, 146.
- TAN Y H, CAO C L, ZHANG R F, et al. Establishment and performance evaluation of a time-resolved fluorescence immunoassay for the detection of placental growth factor[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2023, 38(1): 112-116, 146.
- [15] 国家药品监督管理局. YY/T 1789.3-2022: 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.
- National Medical Products Administration. YY/T 1789.3-2022: In vitro diagnostic test systems—Performance evaluation method—Part 3: Limit of detection and limit of quantitation[S]. Beijing: Standards Press of China, 2022.
- [16] 国家食品药品监督管理总局. YY/T 1223-2014: 总甲状腺素定量标记免疫分析试剂盒[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- State Food and Drug Administration. YY/T 1223-2014: Total T4 quantitative labelling immunoassay kit[S]. Beijing: Standards Press of China, 2014.
- [17] 国家药品监督管理局. YY/T 1789.1-2021: 体外诊断检验系统性能评价方法第1部分: 精密度[S]. 北京: 中国标准出版社出版, 2021.
- National Medical Products Administration. YY/T 1789.1-2021: In vitro diagnostic test systems—Performance evaluation method—Part 1: Precision[S]. Beijing: Standards Press of China, 2021.
- [18] 方可欣, 吴鼎文, 胡真真, 等. 滤纸干血片打孔部位对新生儿筛查实验检测结果的影响[J]. 现代诊断与治疗, 2017, 28(6): 1068-1069.
- FANG K X, WU D W, HU Z Z, et al. The influence of perforated sites of filter paper dry blood tablets on the test results of neonatal screening experiments[J]. Modern Diagnosis & Treatment, 2017, 28(6): 1068-1069.
- [19] 周启凤, 曹闻琦, 吴虹林, 等. 干滤纸血片制备因素对遗传代谢病串联质谱分析结果的影响[J]. 标记免疫分析与临床, 2025, 32(1): 123-128.
- ZHOU Q F, CAO W Q, WU H L, et al. Investigation of the factors affecting the preparation of dry blood spot on tandem mass spectrometry analysis results for inherited metabolic disorders[J]. Labeled Immunoassays and Clinical Medicine, 2025, 32(1): 123-128.
- [20] 宫竹君, 陈荷芬, 袁拥华, 等. 干血斑法概述及其在器官移植免疫抑制药治疗药物监测中的研究进展[J]. 药物分析杂志, 2023, 43(8): 1277-1283.
- GONG Z J, CHEN H F, YUAN Y H, et al. Overview of dried blood spot method and its application in therapeutic drug monitoring of immunosuppressants in organ transplantation[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2023, 43(8): 1277-1283.
- [21] LAIN S J, RIFAS-SHIMAN S L, PEARCE E N, et al. Neonatal thyroxine, maternal thyroid function, and cognition in mid-childhood in a US cohort[J]. Maternal and Child Health Journal, 2020, 24(4): 503-513.
- [22] 周伟燕, 张江涛, 李铭, 等. 同位素稀释液相色谱串联质谱法测定血清甲状腺素[J]. 中华检验医学杂志, 2015, 38(2): 91-97.
- ZHOU W Y, ZHANG J T, LI M, et al. Serum total thyroxine measured by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2015, 38(2): 91-97.
- [23] 徐杭, 宋浩, 樊高成, 等. 单克隆抗体制备技术的研究现状[J]. 中国农业科技导报, 2024, 26(11): 210-224.
- XU H, SONG H, FAN G C, et al. Research advances of monoclonal antibody production technologies[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2024, 26(11): 210-224.
- [24] WANG Y Y, ZHANG Y, FANG Z G, et al. Development and evaluation of a novel non-competitive MA-GLUMI estradiol chemiluminescence immunoassay[J].

- Clinica Chimica Acta, 2025, 575: 120356.
- [25] DAI P, ZHANG Y, HONG Y P, et al. Production of high affinity monoclonal antibody and development of indirect competitive chemiluminescence enzyme immunoassay for gentamicin residue in animal tissues[J]. Food Chem, 2023, 400: 134067.
- [26] 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.
- [27] 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 filter paper blood tablets for neonatal disease screening[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2019, 42(10): 836-840.
- [28] 邹海飞, 李敏, 邓顺艳, 等. 凝胶过滤层析结合液相色谱-串联质谱法测定血清中游离甲状腺激素[J]. 分析测试学报, 2023, 42(12): 1639-1644, 1651.
- ZOU H F, LI M, DENG S Y, et al. Determination of free thyroid hormones in serum by gel filtration chromatography combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2023, 42(12): 1639-1644, 1651.
- [29] 广州科方生物技术股份有限公司. 一种通用于血清中TT3和TT4的解离剂及其制备方法: 202110036268.0 [P]. 2021-02-12.
- Guangzhou Kofa Biotechnology Co., Ltd. A general dissociating agent for TT3 and TT4 in serum and its preparation method: 202110036268.0[P]. 2021-02-12.
- [30] 南京岚轩生物科技有限公司. 用于检测TT3和TT4含量的解离剂及其制备方法: 202111467228.8 [P]. 2021-12-31.
- Nanjing Lanxuan Biotechnology Co., Ltd. Dissociating agents for detecting the content of TT3 and TT4 and their preparation methods: 202111467228.8[P]. 2021-12-31.
- [31] SHIGENOBU N, 王朝辉, 刘吉生. 用滤纸干燥血清样品同时测定甲状腺素和促甲状腺激素检查新生儿甲低[J]. 地方病通讯, 1981, 9(4): 53-55.
- SHIGENOBU N, WANG C H, LIU J S. Serum samples were dried with filter paper to simultaneously determine thyroid hormone and thyroid stimulating hormone for neonatal hypothyroidism[J]. Endemic Disease Communication, 1981, 9(4): 53-55.
- [32] 李文杰, 李明训, 林闽华, 等. 检测干血片样品中促甲状腺素和苯丙氨酸实验影响因素的研究[J]. 上海医学检验杂志, 2003, 18(1): 49-51.
- LI W J, LI M X, LIN M H, et al. Study on the influencing factors of TSH and phenylalanine detection in dried blood spot samples[J]. Shanghai Journal of Medical Laboratory Sciences, 2003, 18(1): 49-51.
- [33] 陈丕绩, 蒋明, 谢意文, 等. 影响新生儿干血片 G6PD 筛查试验结果的相关因素分析[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(4): 505-506, 509.
- CHEN P J, JIANG M, XIE Y W, et al. Analysis of factors infecting result of neonatal dried blood G6PD screening test[J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2015, 12(4): 505-506, 509.
- [34] 中华人民共和国卫生部. 卫生部关于印发《新生儿疾病筛查技术规范(2010年版)》的通知[EB/OL]. (2010-11-10) [2025-11-01]. <https://www.nhc.gov.cn/wjw/c100175/201012/f9005a3ba04140898b4c333aebad0a46.shtml>.
- Ministry of Health of the People's Republic of China. Notice of the Ministry of Health on Issuing the *Technical Specifications for Screening of Neonatal Diseases (2010 Edition)*[EB/OL]. (2010-11-10) [2025-11-01]. <https://www.nhc.gov.cn/wjw/c100175/201012/f9005a3ba04140898b4c333aebad0a46.shtml>.
- [35] 梁肖云, 区小冰, 关小珊. 新生儿红细胞压积两种检测方法的比较[J]. 现代临床医学生物工程杂志, 2004, 10(5): 419-421.
- LIANG X Y, OU X B, GUAN X S. Comparison of two methods for measuring hematocrit in newborns[J]. Journal of Modern Clinical Medical Bioengineering, 2004, 10(5): 419-421.
- [36] 蒋翔, 黄永兰, 李蓓, 等. 根据采血时间调整新生儿先天性甲状腺功能减退症筛查切值的初步研究[J]. 中华新生儿科杂志, 2019, 34(5): 347-352.
- JIANG X, HUANG Y L, LI B, et al. Pilot study on the adjustment of the cut-off value for congenital hypothyroidism screening according to the age at sampling[J]. Chin J Neonatol, 2019, 34(5): 347-352.
- [37] 杨丽涓, 欧明才, 张钰, 等. 四川省新生儿促甲状腺素的季节变化与切值探讨[J]. 中国实验诊断学, 2019, 23(1): 16-19.
- YANG L J, OU M C, ZHANG Y, et al. Seasonal variation and cut-off value of thyrotropin in neonates in Sichuan[J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2019, 23(1): 16-19.
- [38] 李仲梅, 陈朴, 余永雄, 等. 梧州地区新生儿促甲状腺素季节变化与切值探讨[J]. 医药卫生, 2024, 16(3): 73-77.
- LI Z M, CHEN P, YU Y X, et al. Seasonal variation and cut-off value of neonatal thyrotropin in Wuzhou area[J]. Medicine and Hygiene, 2024, 16(3): 73-77.
- [39] 刘利军. 新生儿暂时性低甲状腺素血症的影响因素及甲状腺素替代治疗的效果评估[J]. 江西医药, 2022, 57(12): 2186-2187, 2190.
- LIU L J. Influencing factors of transient hypothyroxinemia in neonates and evaluation of the effect of thyroxine replacement therapy[J]. Jiangxi Medical Journal, 2022, 57(12): 2186-2187, 2190.