

· 论著 ·

干血斑保存温度对新生儿遗传代谢病筛查结果的影响*

石安惠* 贺丹 龙琴 田旭琳

宜宾市妇幼保健院检验科(四川 宜宾 644000)

【摘要】目的 探讨血斑卡在不同储存温度条件下对筛查标志物检测结果的影响,为提高新生儿遗传代谢病筛查前样本质量提供参考依据。**方法** 纳入宜宾市妇幼保健院新生儿100例,每例采集干血斑3份,分别放置于2~8°C冷藏、20~24°C常温及37°C孵箱三种不同温度,储存48小时后进行新生儿遗传代谢病筛查,对不同储存条件下的结果进行分析。**结果** TSH、Phe、17 α -OHP及G-6-PD四项指标的在不同保存条件下的检测结果均存在差异($P<0.05$)。以低温存储的样本作为参考,发现37°C储存样本检测结果的精密度、及与参考值的相关性相对于常温存储均有所下降。从筛查结果的角度,37°C样本检测中产生了大量的假阳性结果,尤其是在G-6-PD缺乏症的检测中,假阳性率达到了90%。**结论** 样本保存不当可能影响检测精密度、增加检测假阳性率。干血斑样本应尽量在低温运输及存储,尤其应当避免暴露于37°C及以上的环境,避免因保存不当产生假阳性结果。

【关键词】 新生儿筛查;干血斑;储存;质量控制**【中图分类号】** R722.11**【文献标识码】** A**【基金项目】** 省级科技计划转移支付项目、宜宾市科技局基金资助项目(2021ZYSF010)**DOI:**10.3969/j.issn.1009-3257.2024.1.049

Effect of Dried Blood Spot Storage Temperature on the Results of Newborn Screening for Inherited Metabolic Diseases*

SHI An-hui*, HE Dan, LONG Qin, TIAN Xu-lin.

Department of Clinical Laboratory, Yibin Maternal and Child Health Care Hospital, Yibin 644000, Sichuan Province, China

Abstract: Objective The purpose of this study was to analyze the impact of different storage temperatures on the test results of newborn screening for inherited metabolic disorders. The study aims to provide reference for improving the sample quality of newborn screening for inherited metabolic disorders. **Methods** A total of 100 newborns were included in the study at the Yibin Maternal and Child Health Hospital. Three dried blood spot cards were collected from each newborn and stored at different temperatures: 2-8°C refrigeration, 20-24°C room temperature, and 37°C incubator. After 48 hours of storage, newborn screening for inherited metabolic disorders was conducted, and the results under different storage conditions were analyzed. **Results** Differences were observed in the test results of TSH, Phe, 17 α -OHP, and G-6-PD under different storage conditions($p<0.05$). Compared to samples stored at room temperature, samples stored at 37°C showed decreased precision and correlation with reference values. From the perspective of screening results, a significant number of false positive results were observed in the samples stored at 37°C, especially in the detection of G-6-PD deficiency, with a false positive rate of 90%. **Conclusion** Improper sample storage may affect the precision of testing and increase the false positive rate. Dried blood spot samples should be transported and stored at low temperatures, particularly avoiding exposure to temperatures of 37°C and above, to prevent false positive results due to improper storage.

Keywords: Newborn Screening; Dried Blood Spot; Storage; Quality Control

遗传代谢病(Inherited Metabolic Diseases, IMDs)是由于基因突变使维持机体正常代谢的某些酶、载体以及受体等蛋白合成出现缺陷,导致机体生化物质代谢发生紊乱,产生一系列临床异常的一大类疾病^[1]。IMDs病种繁多、临床表现多样,群体发病率高,病死率高,延误治疗将导致发育障碍、智力低下、死亡等不可逆损害^[2],故早期筛查与诊断意义重大^[3]。新生儿遗传代谢病筛查能早期发现出生缺陷患儿,并及时予以有效治疗。同时,检测结果的准确性,直接影响到患儿的及时召回和确诊;及时召回遗传代谢病患儿,及时干预,及时治疗,对降低出生缺陷,提高出生人口素质具有较大的社会意义^[4-5]。本研究针对新生儿血斑卡在不同储存温度条件下对新生儿遗传代谢病筛查结果的影响进行分析,以选择正确的储存方法,确保新生儿遗传代谢病检测前样本质量。

1 资料与方法

1.1 标本来源 选取2023年1~6月在本院出生的进行新生儿遗传代谢病筛查的100例新生儿为研究对象。纳入标准:符合《新生儿疾病筛查技术规范》标准^[5],出生72h经充分哺乳(6次以上)或7d以内,以及各种原因(早产儿、低体重儿、处于治疗疾病期的新生儿等)最迟不超过20d的新生儿。本研究经过宜宾市妇幼保健院伦理委员会批准(宜宾市妇幼保健院医教科[2022]第59号通知),所

有研究对象法定监护人均知情同意。

1.2 仪器与试剂 仪器为芬兰Wallac Oy公司生产的GSP全自动荧光免疫分析仪;试剂为芬兰Wallac Oy公司生产的专用的血清促甲状腺激素(TSH)测定、苯丙氨酸(Phe)测定、17 α 羟孕酮(17 α -OHP)测定、葡萄糖6磷酸脱氢酶(G-6-PD)测定试剂盒。

1.3 研究方法

1.3.1 样品采集与递送 采集符合研究标准的新生儿足跟血,滴于新生儿疾病筛查专用滤纸干血片上,每个新生儿采集三份干血斑,要求每份三个血斑、且每个血斑的直径 ≥ 8 mm,双面渗透良好,在室温中自然阴干。三份样本分别封存于塑料密封袋,送新筛实验室。接收干血斑样本后,立即把每个新生儿的三份干血斑分别置于室温(20-24°C)、2-8°C冰箱、37°C恒温孵育箱放置48小时,取出干血片样本,在GSP全自动时间分辨荧光免疫分析仪上进行检测。

1.3.2 检测方法 应用全自动打孔仪器对滤纸干血片样本、校准品、质控品进行打孔(孔径3mm),放入96孔微孔板中,读取微孔板条形码并将样品及质控品信息输入GSP工作站软件,将板架装载到自动进样器进行自动检测。记录实验结果,以备分析温度对检测结果的影响。

1.4 统计学方法 首先,使用D'Agostino和Pearson综合正态性检验对数据进行正态性检验,如果数据不符合正态分布,采用非参

【第一作者】石安惠,女,主任技师,主要研究方向:临床医学检验临床免疫检验,新生儿疾病筛查。E-mail: 597222382@qq.com

【通讯作者】石安惠

数方法。使用Friedman检验来判断三组之间的指标是否存在差异。差异的指标使用配对样本的Wilcoxon符号秩检验进行事后检验，并使用Bonferroni校正对p值进行校正。所有统计分析均采用双侧检验，当P<0.05时认为存在显著差异。在相关性计算中，使用Spearman秩相关性系数进行相关性检验，以相关性系数ρ表示数据间的单调相关性，ρ>0时为正相关，ρ<0时为负相关。

2 结果

2.1 干血斑储存温度对新生儿遗传代谢检测项目结果影响 通过多重比较，查看20-24℃(常温)、2-8℃冰箱和37℃孵箱等三种储存条件下，四种代谢物检测的结果是否存在差异，统计资料的分布及Friedman 检验结果见表1。

检验结果说明，TSH、Phe、17α-OHP和G-6-PD等4项指标的检测结果大小均受保存温度影响。观察数据分布可知，在37℃储存48小时后TSH和G-6-PD两项指标检测结果的中位数显著下降。为了进一步判断各储存条件下检测值分布的差异，并确定对结果影响较大的保存条件，我们进行了两两配对事后检验，并对p值进行了校正。

从检验结果表2可知，常温和低温保存的TSH及Phe的结果没有差异。但是，在37℃保存时与其他保存条件下的检测值有较大差异。17α-OHP指标在常温和37℃保存后的检测结果没有差异，但是低温保存的样本与其他两种保存条件下的样本检测值存在显著差异。最后，G-6-PD指标似乎对保存温度较为敏感，三种保存条件之间都存在差异。由于没有对样本进行重复检测，无法排除差异来自于检测误差或其他实验相关因素的可能性。

2.2 不同温度存储的干血斑样本检测精密度分析 根据《新生儿疾病筛查滤纸血片采集和递送及保存专家共识》的建议，有条件的情况下干血斑滤纸片应当在低温条件运输与存放^[6]。低温保存的样品更为稳定、检测结果最接近真实值，故以2-8℃冰箱保存样本的检测结果作为参考值，分析在20-24℃常温及37℃孵育两种保存条件下，检测结果与参考值的相对误差(Relative Error,

RE)，计算公式如下：

$$RE = \frac{X - X_{2-8℃保存}}{X_{2-8℃保存}} \times 100\%$$

以20%作为相对误差的可接受限，可判断在20-24℃保存的样本G-6-PD检测结果的精密度较高，97%的样本检测值在可接受限以内。但是在37℃孵箱保存后，G-6-PD检测结果受到的影响也最大，所有样本的检测结果都极大偏离了参考值，相对误差的中位数达到-79%。其他检测值也并不理想，都有超过40%的样本落在可接受限外，检测结果与低温存储的样本在数值上有差异。因此可以判断，在常温及37℃存储可能对检测的精密度产生不良影响。

2.3 不同温度存储的干血斑样本检测结果相关性分析 另一方面，我们也查看了常温及37℃储存样本的检测结果与低温储存的样本结果之间的存在的线性关系。不论保存条件如何，检测结果之间都存在一定的单调正相关性。与常温保存相比，在37℃孵箱保存的样本检测结果与参考值的相关性系数下降。Phe相关性相对较弱(常温：ρ=0.53，37℃：ρ=0.68)；TSH在两种条件下都保持了较高的单调正相关性(常温：ρ=0.93，37℃：ρ=0.90)，但常温保存的样本检测结果与低温保存的结果更接近，而37℃保存的样本中TSH含量下降，且含量越高差异越明显(图2 B)；17-αOHP的检测结果的线性相关性受温度影响不明显(常温：ρ=0.79，37℃：ρ=0.75)，并且两种不同条件的拟合线距离很近；G-6-PD受温度影响最大(常温：ρ=0.85，37℃：ρ=0.51)，37℃条件下，不仅检测值变化、相关性也明显下降，但低温与常温保存后的检测值相关性较高。

2.4 储存温度对新生儿筛查检测结果判读的影响 除了检测值本身的差异，本研究中进一步关注了不同温度储存后，是否对结果判读造成影响(初筛判读切值、初筛阳性数量见表3)。整体来说，低温储存的样本初筛阳性率最低，常温储存次之，37℃孵箱储存的最高。尤其是G-6-PD缺乏症的检测结果在37℃储存后，产生了大量假阳性结果(假阳性率90%)。

表1 三种不同储存条件下新生儿遗传代谢病筛查结果[Median (Q1, Q3)]

	TSH	Phe	17α-OHP	G-6-PD
20-24℃常温保存	2.50 (1.10 - 4.03)	0.85 (0.67 - 1.00)	3.90 (3.20 - 5.50)	61.25 (53.82 - 66.22)
2-8℃冰箱储存	2.50 (1.20 - 3.67)	0.83 (0.70 - 1.02)	3.70 (2.98 - 4.70)	63.75 (57.08 - 68.35)
37℃孵箱储存	1.40 (0.60 - 2.25)	0.74 (0.62 - 0.90)	4.20 (3.40 - 5.20)	12.85 (9.67 - 19.50)
χ ²	115.27	29.35	13.97	163.32
P值	9.31e-26	4.24e-07	9.24e-04	3.44e-36

注：经过检验，数据分布非正态，故使用中位数(第一四分位数 - 第三四分位数)描述；采用Friedman 检验判断三组检测结果分布是否相同，当P<0.05时，认为不同条件下保存样本的检测结果存在显著差异。使用中位数和上下四分位描述资料，Median为中位数，Q1为下四分位，Q3为上四分位。

表2 配对样本的Wilcoxon符号秩检验p值

储存条件	TSH	Phe	17α-OHP	G-6-PD
2-8℃冰箱 VS 20-24℃常温	1.00e+00	1.00e+00	2.67e-04	1.01e-06
37℃孵箱 VS 20-24℃常温	5.81e-16	2.55e-03	1.00e+00	1.17e-17
2-8℃冰箱 VS 37℃孵箱	8.18e-16	8.54e-07	9.07e-04	1.17e-17

注：多重检验的p值已经过Bonferroni校正。

表3 不同保存条件下初筛阳性的数量

保存条件	苯丙酮尿症(PKU) Phe>=1.8 mg/dL	先天性甲状腺功能减低症(CH) TSH>=8.0 uIU/mL	先天性肾上腺皮质增生症(CAH) 17-αOHP>=11 nmol/L	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G-6-PD) 缺乏症 G-6-PD<=26.4 u/dL	阳性总数
2-8℃冰箱	1	0	1	0	2
20-24℃常温	0	1	2	0	3
37℃孵箱	1	0	2	90	93

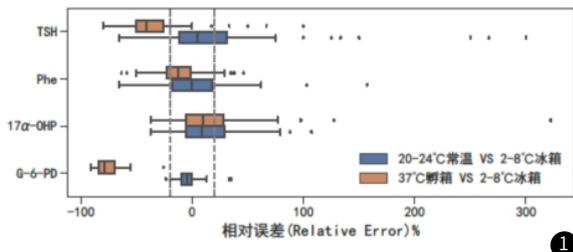
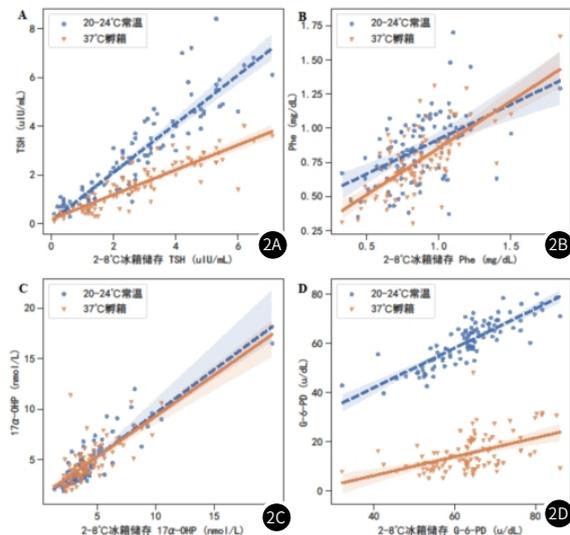


图1 不同条件下保存的样本各项检测值与20-24℃储存样本的相对误差。橙色：37℃孵箱储存，蓝色：2-8℃冰箱储存；灰色虚线：相对误差可接受限， $x=-20\%$ 和 $x=20\%$ 。**图2** 不同条件下保存的样本各项检测值与20-24℃储存样本检测值的相关性。图2A：TSH；图2B：Phe；图2C：17- α -OPH；图2D：G-6-PD。蓝色：20-24℃常温储存，橙色：37℃孵箱储存。



3 讨论

本研究发现保存温度对苯丙酮尿症(PKU)，先天性甲状腺功能减低症(CH)，先天性肾上腺皮质增生症(CAH)及葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PD)缺乏症的新生儿筛查结果存在影响。一方面，暴露在常温或高温下会加速样本中的待测物质的分解，使检测结果精密度下降；另一方面，待测物质含量的变化可能会影响检测结果的判读，造成假阳性结果，导致复检率的增加。

在TSH、Phe、17 α -OPH及G-6-PD等四个检测项目中，G-6-PD检测结果受温度影响最明显，随着滤纸片干血斑标本存储温度的升高，G-6-PD活性显著降低，出现假阳性结果，与之前的报道相符^[7]。这可能是由于G-6-PD酶活性受温度和保存时间影响较大。另一方面，朱文娟等人^[8]曾研究了不同制备条件对于干血斑中氨基酸浓度的影响，结果显示Phe的浓度受制备条件影响较小，在4℃、25℃及37℃三个不同制备下，Phe的检测结果没有显著差异。由于这项研究中是制备后直接进行取样检测的，不能说明在这些条件下保存对氨基酸浓度的影响。本研究中发现，在低温及常温保存48小时后检测结果没有显著差异，但是37℃孵箱保存后Phe含量显著降低，说明在37℃保存会对Phe含量产生影响；同时，常温保存48小时以内对Phe的含量的影响较小，但常温保存更长时间对样本中Phe含量的影响尚不清楚。另外，本研究中干血斑制备时采用了自然晾干的方法，未来也可以考虑引入吹干装置^[9]，提升干燥效率。

从实验方法来说，本研究中涉及的检测均采用免疫荧光分析法，方法具有灵敏度高、特异性强、适用面广、所需设备简单、线性范围较宽等优点，但在检测低丰度的物质时也可能受到背景干扰导致检测精度的下降。研究结果显示，丰度相对较高的蛋白质G-6-PD检测精度较高，而干血斑中丰度较低的激素17 α -OHP、TSH和氨基酸Phe等三种物质检测精密度相对较低。对于这些低丰度的物质，未来可以引进串联质谱进行分析^[10-11]，增加可检测的化合物数量，提高检测的特异性和灵敏度。另外，除蛋白、氨基酸、激素等代谢物的检测外，基因检测也将逐步纳入新筛体系，目前已有研究建立了滤纸干血斑用脊髓性肌萎缩症基因筛查方法^[12]，干血斑保存条件对基因检测结果的影响也将成为一个值得探究的课题。

实验设计方面，本批样本中没有纳入阳性样本，仅考察了保存温度对检测值及假阳性率的影响，在未来的实验中，可重点研究温度对于阳性样本检测结果及判读的影响。另外，本批样本存放的时间都是48小时，有研究显示，在常温存放三天的干血斑样本在G-6-PD酶活性检测中出现假阳性结果^[7]，本研究中虽然并未

产生假阳性，但已观测到常温存放的样本和低温存放的样本G-6-PD的检测结果存在显著差异。未来也可以进一步探究保存时间对样本的影响。

总之，干血斑保存温度是新生儿遗传代谢病筛查质量控制中的重要环节，在干血斑的运输和存储中，应当尽量保持低温条件。常温下放置时间不超过48小时对样本检测的精密度有影响但是对于检测结果的影响很小，如没有条件进行低温保存应当尽快进行检测减少对检测结果的影响。但应当避免将样本放置于37℃的环境下。良好的保存条件有助于降低假阳性率，提高新生儿筛查效率。建议所有新筛实验室都要注意样本保存温度，以更好地开展相关检测、为出生缺陷防控作出贡献。

参考文献

- [1] 李昱剑, 阙璇. 儿童遗传代谢病的研究进展[J]. 中国当代儿科杂志, 2022, 24(3): 326-331.
- [2] 杨艳玲. 遗传代谢病的诊断与治疗[J]. 国外医学. 内分泌学分册, 2005(4): 238-240.
- [3] 顾学范, 韩连书, 余永国. 中国新生儿遗传代谢病筛查现状及展望[J]. 罕少病研究, 2022, 1(1): 13-19.
- [4] 叶军. 新生儿遗传代谢病筛查发展及诊治规范[J]. 中国计划生育和妇产科, 2016, 8(1): 6-13.
- [5] 张月, 赵君, 高华方, 等. 新生儿遗传代谢病筛查结果影响因素及存在问题研究进展[J]. 中国儿童保健杂志, 2020, 28(3): 281-283, 291.
- [6] 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.
- [7] 章印红, 朱宝生, 王瑞红, 等. 存储温度和时间对滤纸片干血斑标本葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性的影响[J]. 中华妇幼临床医学杂志, 2008, 4(6): 563-566.
- [8] 朱文娟, 魏友华, 王蕊, 等. 新生儿遗传代谢病筛查干血斑制备及储存影响因素研究[J/OL]. 医学理论与实践, 2021, 34(24): 4351-4354.
- [9] 谢玉佳, 孙智勇, 王少静, 等. 自制吹干装置在滤纸干血片样本制备中的应用[J]. 检验医学, 2021, 36(08): 857-863.
- [10] 刘伟. 串联质谱—新生儿疾病筛查技术的发展趋势[J/OL]. 中国妇幼卫生杂志, 2011, 2(1): 42-44.
- [11] 韩炳娟, 韩炳超, 邹卉. 串联质谱技术在新生儿遗传代谢性疾病筛查中的应用[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(29): 4907-4909.
- [12] 吴莉萍, 高玲亮, 杨江涛, 等. 滤纸干血斑用于脊髓性肌萎缩症基因筛查方法的建立[J]. 罕少疾病杂志, 2022, 29(9): 1-4.

(收稿日期: 2023-10-25)
(校对编辑: 韩敏求)