

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.14.013

应用 GSP 筛查新生儿 G6PDd 的性能验证及 cut-off 值设定<sup>\*</sup>魏庆玲<sup>1</sup>, 梁睿<sup>2</sup>, 李冬秀<sup>2</sup>, 陈伟荣<sup>2</sup>, 吴学威<sup>2</sup>, 黄湘<sup>1,3,△</sup>

1. 南方医科大学第二临床医学院, 广东广州 510000; 2. 中山市博爱医院产前诊断中心, 广东中山 528400;

3. 南方医科大学附属佛山妇幼保健院产前诊断中心, 广东佛山 528000

**摘要:**目的 对全自动荧光免疫分析仪(GSP)检测干血片葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)的性能进行验证,并初步建立该方法筛查葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症(G6PDd)的 cut-off 值。**方法** 前期确定验证方案,对试剂盒自带标准品 B、D、E 3 个浓度的标本, L、H 两个浓度的质控品及试剂盒自带标准品 B、C、D、E、F 5 个浓度标本进行 GSP 系统的精密度、正确度和线性范围的验证。采用 GSP 和目前临床常规使用的 Victor2D 1420 型荧光免疫分析仪(半自动荧光免疫分析仪)同步检测 2 742 例新生儿干血片 G6PD 水平,比较两种仪器结果,并使用百分位数分布及受试者工作特征(ROC)曲线初步建立中山市博爱医院产前诊断中心 GSP 筛查 G6PDd 时 G6PD 水平的 cut-off 值。**结果** 应用 GSP 检测 G6PD 时,批内变异系数分别为 2.09%、1.54%和 1.90%,总变异系数分别为 3.08%、1.72%和 2.12%,分别小于厂家声明的 3.40%和 3.90%;质控浓度 L 的 25 份标本的测量总均值与靶值的相对偏差为 3.84%,质控浓度 H 的 25 份标本的测量总均值与靶值的相对偏差为 3.44%;5 个浓度标本的检测值和理论值的线性回归方程为  $Y=1.008\ 2X+0.012\ 5$ ,决定系数( $R^2$ )为 0.999 1,  $R^2>0.995$ ,线性相关性良好。标本总体  $P_5$  的 G6PD 水平为 20.10 U/dL。两种仪器的一致性良好。**结论** GSP 应用于中山市新生儿 G6PD 检测中,精密度、准确度、线性范围均达到了厂家声明的检测性能,可常规用于新生儿 G6PDd 筛查。该中心初步采用的 GSP 新生儿 G6PDd 筛查的 cut-off 值为 20.10 U/dL。

**关键词:**葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症; 全自动荧光免疫分析仪; 性能验证; cut-off 值

中图法分类号:R446.6

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)14-1926-04

Verification of the performance of Genetic Screening Processor and setting the cut-off values in screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in newborns<sup>\*</sup>

WEI Qingling<sup>1</sup>, LIANG Rui<sup>2</sup>, LI Dongxiu<sup>2</sup>, CHEN Weirong<sup>2</sup>, WU Xuwei<sup>2</sup>, HUANG Xiang<sup>1,3,△</sup>

1. The Second School of Clinical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou,

Guangdong 510000, China; 2. Prenatal Diagnosis Center, Boai Hospital Affiliated to Southern

Medical University, Zhongshan, Guangdong 528400, China; 3. Prenatal Diagnostic Center, Foshan Maternal and Child Health Hospital Affiliated to Southern Medical University, Foshan, Guangdong 528000, China

**Abstract: Objective** To verify the performance of Genetic Screening Processor (GSP) for determination of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) in dried blood spots. The cut-off value of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (G6PDd) screening by this method was established. **Methods** The validation scheme was determined in the early stage, and the precision, accuracy and linear range of GSP system were verified for samples with B, D and E concentrations, quality control products with L and H concentrations and linear samples with B, C, D, E, F 5 concentrations of kits. GSP analyzer and Victor2D 1420 fluorescence immunoassay (semi-automatic analyzer) were used to detect G6PD level in blood of 2 742 neonates. The results of the two instruments were compared. Furthermore, percentile method and Receiver Operating Characteristic (ROC) curve was used to establish the optimal cut-off value of G6PD level in dried blood spots of G6PDd screened by GSP analyzer in Prenatal Diagnosis Center, Boai Hospital Affiliated to Southern Medical University. **Results** When GSP was used to detect G6PD, the coefficient of variation in batch were 2.09%, 1.54% and 1.90%, and the total coefficient of variation were 3.08%, 1.72% and 2.12% respectively, which were lower than 3.40% and 3.90% claimed by manufacturers. The relative deviation between the total mean of measurement and the target value of 25 samples of quality control concentration L was 3.84%, and that of 25 samples

<sup>\*</sup> 基金项目:广东省中山市科技计划重大项目(2016B1009)。

作者简介:魏庆玲,女,在读硕士研究生,主要从事临床检验诊断学、产前诊断、遗传学研究。△ 通信作者, E-mail: 340382761@qq.

of quality control concentration H was 3.44%. The linear regression equation of tested values and theoretical values of 5 linear specimens was  $Y=1.008\ 2X+0.012\ 5$ , the  $R^2$  was 0.999 1,  $R^2>0.995$ , indicating good linear correlation. The G6PD level at the 5.0 percentile was 20.10 U/dL. The two instruments had good consistency. **Conclusion** GSP is used in the detection of G6PD in neonatal screening of in Zhongshan city, its precision, accuracy, linear range have reached the detection performance declared by the manufacturer, and it could be routinely used in the screening of neonatal G6PDd. The cut-off of GSP neonatal G6PDd screening initially adopted by our center is 20.10 U/dL.

**Key words:** glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency; Genetic Screening Processor; performance verification; cut-off value

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症(G6PDd)是由于基因缺陷而引起红细胞膜表面葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)降低,使得维持红细胞膜稳定性的还原型谷胱甘肽生成减少而不能抵抗氧化损伤而造成的疾病。新生儿 G6PDd 主要临床表现为急性溶血、遗传性非球形细胞性溶血性贫血、高胆红素血症,因新生儿血脑屏障尚未完全建立,易引起核黄疸导致人体脑部损伤等<sup>[1-3]</sup>。全自动荧光免疫分析仪(GSP)操作便捷,检测结果的准确性较高<sup>[4]</sup>,中山市博爱医院(以下简称本院)2017 年引进 GSP,本文旨在探讨 GSP 筛查系统用于新生儿 G6PDd 筛查的价值,现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 以 2018 年 3—8 月中山市分娩的 2 742 例新生儿为研究对象,为全市 23 个(市)镇区 25 家医院分娩的新生儿,均送外周血(足跟血或脐血)标本至中山市博爱医院产前诊断中心(以下简称本中心)进行 G6PDd 筛查,排除早产儿及低出生体质量儿。

**1.2 仪器与试剂** 主要仪器有芬兰 PerkinElmer (PE)公司生产的 GSP(型号 2021-0010),芬兰 PE 公司生产的半自动荧光免疫分析仪(型号 Victor2D1420,半自动荧光免疫分析法)及 Panthera-Puncher™9 打孔仪,广州丰华生物工程有限公司生产的微量振荡器(型号 FWZ-1)等。试剂盒使用芬兰 PE 公司生产的 GSP Neonatal G6PD 试剂盒(全自动荧光免疫分析法)、Neonatal G6PD 试剂盒(半自动荧光免疫分析法)。

**1.3 标本采集** 严格按照原卫生部《新生儿疾病筛查技术规范(2010 版)》制作滤纸干血片;在新生儿出生 48~72 h 充分哺乳后采集足跟血,制成滤纸干血片,干血片室温平放晾干后,4℃保存,最迟不宜超过 5 d 送至本中心进行筛查。

**1.4 方法** 试验步骤严格按照 GSP Neonatal G6PD 试剂盒说明书操作,分析 GSP 的精密度、正确度、线性范围等,并与厂家声明的参数进行比较。

**1.4.1 精密度验证** 采用试剂盒自带标准品 B、D、E 3 个浓度标本作为测试标本,每个浓度标本每天测量 1 个批次,共进行 5 d,每批次对各浓度标本重复测量 3 次,每个浓度各 15 个测量值,计算批内变异系数( $CV_{批内}$ )、批间变异系数( $CV_{批间}$ )和总变异系数

( $CV_{总}$ )。

**1.4.2 正确度验证** 采用试剂盒自带质控品 L(指定靶值 16.4 U/dL)和 H(指定靶值 56.1 U/dL)两个浓度标本作为测试标本,每份标本每天测量 1 个批次,每批次测量 5 次,共进行 5 d,每个浓度各 25 个测量值,统计测量总均值与靶值的相对偏差是否小于 10%(1/3TEa)。

**1.4.3 线性范围验证** 采用试剂盒自带标准品 B、C、D、E、F 作为测量标本,浓度梯度分别为 9.0、18.3、35.5、77.1、120 U/dL。每个标本测量 3 次,在同一批测量中完成,考察测量均值与理论值的线性关系。

**1.4.4 质控** 每批测试均进行室内质控标本测量,当质控品结果超出规定的失控限时剔除,重新进行试验。

**1.4.5 cut-off 值的设定** 严格依据 GSP Neonatal G6PD 试剂盒和 Neonatal G6PD 试剂盒说明书同步检测 2 742 例新生儿滤纸干血片的血 G6PD 水平。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS20.0 统计软件进行数据处理及统计分析。检测值与理论值的关系采用线性回归方程分析。采用 Dixon 方法检查并剔除离群值,采用百分位数分布及受试者工作特征(ROC)曲线建立 cut-off 值;两种仪器检测结果一致性检验采用 Kappa 检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 GSP 性能验证

**2.1.1 精密度验证结果** GSP 检测试剂盒自带标准品 B、D、E 中 G6PD  $CV_{批内}$  分别为 2.09%、1.54%、1.90%,均小于厂家声明的  $CV_{批内}$ (3.40%); $CV_{批间}$  分别为 2.45%、1.03%、1.26%; $CV_{总}$  分别为 3.08%、1.72%、2.12%,小于厂家声明的最低  $CV_{总}$ (3.90%)。

**2.1.2 正确度验证结果** 质控浓度为 L 的 25 份标本的测量总均值与靶值的相对偏差为 3.84%,质控浓度为 H 的 25 份标本的测量总均值与靶值的相对偏差为 3.44%,均小于 10%,试剂盒检测 G6PD 正确度符合要求。

**2.1.3 线性范围验证结果** B、C、D、E、F 5 个浓度的试剂盒自带标准品标本的检测值和理论值的线性回归方程为  $Y=1.008\ 2X+0.012\ 5$ ,决定系数( $R^2$ )为 0.999 1,线性相关性良好见图 1。

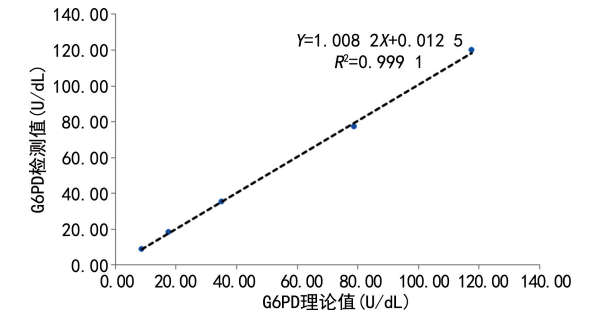


图 1 GSP 检测 G6PD 检测值和理论值线性关系

2.2 GSP 检测结果

2.2.1 GSP 检测结果的百分位数分布 2 742 例新生儿的血 G6PD 水平  $P_1$ 、 $P_5$  分别为 4.27、20.10 U/dL。以  $P_1$  为 cut-off 值时,2 742 例新生儿中 27 例筛查阳性(筛查阳性率为 0.985%),其中女 2 例,男 25 例;以  $P_5$  为 cut-off 值时,2 742 例新生儿中 135 例筛查阳性(筛查阳性率为 4.923%),其中女 48 例,男 87 例。

2.2.2 ROC 曲线分析 G6PD 诊断 G6PDd 的曲线下面积(AUC)为 0.963。ROC 曲线以约登指数(灵敏度+特异度-1)最大值为最佳诊断值,即 cut-off 值为 22.40 U/dL 时灵敏度及特异度最高。以 22.40 U/dL 为 cut-off 值时,2 742 例新生儿中 175 例筛查阳性(筛查阳性率为 6.382%),其中女 74 例,男 101 例。见图 2、表 1。

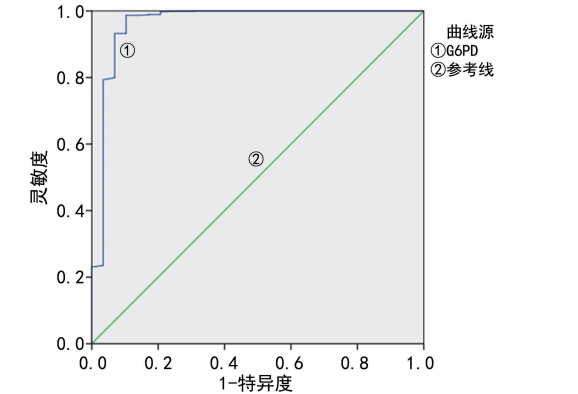


图 2 采用 G6PD 筛查 G6PDd 的 ROC 曲线

| 表 1 不同 G6PD 水平诊断 G6PDd 的灵敏度和特异度 |       |       |       |
|---------------------------------|-------|-------|-------|
| G6PD(U/dL)                      | 灵敏度   | 特异度   | 约登指数  |
| 19.50                           | 0.993 | 0.793 | 0.786 |
| 19.85                           | 0.992 | 0.793 | 0.785 |
| 20.30                           | 0.990 | 0.793 | 0.783 |
| 20.60                           | 0.989 | 0.793 | 0.782 |
| 21.00                           | 0.989 | 0.828 | 0.817 |
| 21.55                           | 0.988 | 0.828 | 0.816 |
| 21.90                           | 0.987 | 0.862 | 0.849 |
| 22.40                           | 0.987 | 0.897 | 0.884 |
| 22.90                           | 0.986 | 0.897 | 0.883 |
| 23.35                           | 0.985 | 0.897 | 0.882 |

| 续表 1 不同 G6PD 水平诊断 G6PDd 的灵敏度和特异度 |       |       |       |
|----------------------------------|-------|-------|-------|
| G6PD(U/dL)                       | 灵敏度   | 特异度   | 约登指数  |
| 23.85                            | 0.983 | 0.897 | 0.880 |
| 24.15                            | 0.982 | 0.897 | 0.879 |
| 24.40                            | 0.981 | 0.897 | 0.878 |

2.2.3 两种仪器检测结果比较 GSP 和半自动荧光免疫分析仪对 2 742 例新生儿滤纸干血片同步进行检测,结果显示半自动荧光免疫分析仪筛查阳性 90 例,阴性 2 652 例,GSP 筛查阳性 135 例,阴性 2 607 例,两种仪器检测结果具有一致性(Kappa=0.783, $P<0.001$ )。以半自动荧光免疫分析仪为标准,GSP 的灵敏度、特异度、阳性符合率分别为 65.92%、99.96%、98.29%。见表 2。

| 表 2 两种仪器检测结果比较(n) |     |       |       |
|-------------------|-----|-------|-------|
| 半自动荧光免疫分析仪        | GSP |       | 合计    |
|                   | 阳性  | 阴性    |       |
| 阳性                | 89  | 1     | 90    |
| 阴性                | 46  | 2 606 | 2 652 |
| 合计                | 135 | 2 607 | 2 742 |

3 讨 论

G6PD 的检测方法包括荧光斑点定性试验、速率法、荧光分析法、G6PD/6PGD 比值法等<sup>[5-9]</sup>。GSP 操作更便捷,能够减少实验技术人员的手工操作时间,特别适合开展大规模的新生儿疾病筛查。本院按照临床定量实验性能验证方案对 GSP 检测 G6PD 的精密密度、正确度和线性范围进行了评估,并初步确定 cut-off 值<sup>[10-11]</sup>。

实验检测结果准确和稳定是遗传代谢病诊断的最基本前提。正确度的验证结果表明 GSP 配套的 G6PD 检测试剂盒自带的高、低两个浓度的质控品和靶值的相对偏差小于 10%(1/3TEa),说明 GSP 检测 G6PD 的正确度通过验证。从精密度的验证结果看,应用 GSP 对试剂盒自带两个浓度质控品检测的 CV<sub>批内</sub> 分别为 2.09%、1.54%和 1.90%,CV<sub>总</sub> 分别为 3.08%、1.72%和 2.12%,均小于厂家声明的 3.40%和 3.90%,说明 GSP 新生儿筛查系统检测 G6PD 的精密密度符合要求;线性范围的验证结果显示测定项目理论值与测定均值的  $R^2$  为 0.999 1,GSP 检测 G6PD 的检测值和理论值具有非常高的线性相关性,线性范围内符合要求,总之 GSP 的精密密度、正确度、线性范围与厂商声明的分析性能基本一致,能够满足临床检测要求。通过对 2018 年 3—8 月 2 742 例新生儿 GSP 检测结果分析,对比百分位数分布和 ROC 曲线分析设立的 cut-off 值,ROC 曲线筛查的阳性率更高,相应的假阳性率也会升高,因此其更适合于标本量大的数据,故新生儿 G6PD cut-off 值以 G6PD 水平  $P_5$  为标



准<sup>[12-13]</sup>。2 742 例新生儿干血片标本在 GSP 上测得的 G6PD 水平  $P_5$  为 20.10 U/dL。以  $P_5$  (20.10 U/dL) 为 cut-off 值, 初筛阳性率为 4.923%, 其中 48 例女性, 87 例男性。2008 年陈亚军等<sup>[14]</sup>报道韶关市 71 892 例新生儿 G6PDd 初筛阳性率为 5.19% (3 729/71 892); 2013 年郭小玲等<sup>[15]</sup>报道中山市 25 021 例新生儿 G6PDd 筛查阳性率为 3.63% (908/25 021), 其中男性阳性率为 5.40%, 女性阳性率为 1.40%; 2016 年张延玮等<sup>[16]</sup>报道汕头市 104 079 例新生儿 G6PDd 初筛阳性率为 1.60%; 2017 年刘冬霞等<sup>[17]</sup>报道清远市 57 815 例新生儿 G6PDd 初筛阳性率为 6.17% (3 568/57 815); 2018 年唐芳等<sup>[18]</sup>报道广州市 16 319 例新生儿中, G6PDd 筛查阳性率为 4.21% (687/16 319), 其中男 6.40%, 女 1.70%; 2019 年杨应松等<sup>[19]</sup>报道江门市 73 813 例新生儿总体筛查阳性率为 4.14% (3 027/73 813), 男女筛查阳性率分别为 6.88% (2 632/38 240)、1.13% (395/34 943), 总体筛查阳性率接近本研究中采用  $P_5$  为 cut-off 值时的筛查阳性率。另外, 以半自动荧光免疫分析仪筛查结果为标准, cut-off 值为 21.00 U/dL 时, 计算得出 GSP 检测结果的特异度、阳性符合率均较高, 若以 ROC 曲线计算出的 22.40 U/dL 为 cut-off 值, 将召回更多的患儿, 提高假阳性率。本研究通过百分位数分布计算得出的新生儿 G6PD 筛查 cut-off 值仅作为项目开展初期实验室的初始 cut-off 值。

综上所述, GSP 用于中山市新生儿筛查 G6PD 检测性能和厂家声明的一致, 检测系统具有良好的精密度、准确度、线性范围, 对比 GSP 与半自动荧光免疫分析仪一致性较好, 说明将 GSP 筛查系统应用于新生儿 G6PD 的检测是可行的。通过本研究还确定了 GSP 检测新生儿 G6PD 的 cut-off 值, 明确了参考值对 G6PDd 的诊断、治疗和预后判断有重要指导意义。本中心将定期回顾性分析总结, 增大标本量后可重新设定 cut-off 值, 并根据不同的胎龄和体质量进一步校正筛查 cut-off 值, 以提高筛查工作质量和筛查效率。

### 参考文献

- [1] 王朝, 刘思涵, 薄丽津, 等. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症的临床特征与实验室特征分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2018, 26(5): 1437-1441.
- [2] DU Y, WANG W, LIU J, et al. National program for external quality assessment of chinese newborn screening laboratories[J]. Int J Neonatal Screen, 2020, 6(2): 38.
- [3] PALLAPOTHU B, SANKAR J. Acalypha indica-induced hemolysis and methemoglobinemia in a child with G6PD deficiency[J]. Indian Pediatr, 2021, 58(1): 92-93.
- [4] 赵兰花, 韦洪伟. 全自动荧光免疫分析仪 GSP<sup>TM</sup> 检测新生儿血斑 G6PD 性能验证[J]. 中国优生与遗传杂志, 2019, 27(10): 1209-1210.

- [5] 韩连书, 田国力, 王维鹏. 新生儿遗传代谢病筛查指标切值建立方法专家共识[J]. 中国实用儿科杂志, 2019, 34(11): 881-884.
- [6] WANG F L, BOO N Y, AINOON O, et al. Comparison of detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency using fluorescent spot test, enzyme assay and molecular method for prediction of severe neonatal hyperbilirubinaemia[J]. Singapore Med J, 2009, 50(1): 62-67.
- [7] 徐小兰, 黄志华, 余跃华, 等. 应用荧光分析法筛查新生儿葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症[J]. 中国优生与遗传杂志, 2017, 25(4): 118-119.
- [8] 田国力, 王燕敏, 周卓, 等. 全自动新生儿疾病筛查系统的性能评价[J]. 检验医学, 2017, 32(7): 633-636.
- [9] 郭萌, 张琦, 文伟, 等. 全自动荧光免疫分析仪用于深圳新生儿筛查苯丙氨酸检测的性能验证[J]. 中国优生与遗传杂志, 2018, 26(12): 73-75.
- [10] JIANG X, TANG F, FENG Y, et al. The adjustment of 17-hydroxyprogesterone cut-off values for congenital adrenal hyperplasia neonatal screening by GSP according to gestational age and age at sampling[J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2019, 32(11): 1253-1258.
- [11] DE CASTRO S M, FILIPPON L, SOUZA A C, et al. Evaluation of the genetic screening processor for the performance of newborn screening tests[J]. J Inb Err Metab Scr, 2016, 4: 216888199.
- [12] FU C, LUO S, LI Q, et al. Newborn screening of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Guangxi, China: determination of optimal cut-off value to identify heterozygous female neonates[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 833.
- [13] KAPADIA A B, SHARMA P, JAIN K, et al. Evaluation of a flow cytometric test for G6PD-deficient erythrocytes[J]. Trop Med Int Health, 2021, 26(4): 462-468.
- [14] 陈亚军, 黄智勇. 韶关市 2004—2008 年新生儿疾病筛查结果分析[J]. 中国初级卫生保健, 2008, 22(12): 33-34.
- [15] 郭小玲, 张翠梅, 欧俊斌, 等. 中山地区新生儿葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症筛查结果分析[J]. 广东医学, 2013, 34(5): 733-735.
- [16] 张延玮, 谢洁娜, 郭书邑. 广东省汕头市新生儿遗传代谢疾病筛查结果分析[J]. 临床输血与检验, 2016, 18(6): 571-573.
- [17] 刘冬霞, 许伟华, 龙辉, 等. 清远地区新生儿葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症的筛查分析[J]. 广州医科大学学报, 2017, 45(6): 38-41.
- [18] 唐芳, 黄永兰, 蒋翔, 等. 广州市葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症的新生儿筛查及确诊评估[J]. 中华儿科杂志, 2018, 56(5): 359-363.
- [19] 杨应松, 杨梅, 钟志来, 等. 江门市新生儿 G6PD 筛查结果回顾性分析[J]. 中国当代医药, 2019, 26(16): 138-141.

(收稿日期: 2021-10-18 修回日期: 2022-03-18)