

• 检验仪器与试剂评价 •

两种检测系统测定糖化血红蛋白的比对分析

李池慧, 黄续炜, 吴翡翠, 施金俏
(浙江金华市人民医院检验科 321000)

摘要:目的 对两种检测系统测定糖化血红蛋白所得结果进行相关性分析及偏倚评估。方法 分别使用 TOSOH G8 糖化血红蛋白分析仪采用离子交换高效液相色谱法(HPLC)和雅培 AEROSET 全自动生化分析仪以酶化学法检测 40 例血液样本的糖化血红蛋白,对两检测系统的结果进行比对分析,检查离群点,计算线性相关系数、直线回归方程和预期偏倚评估。结果 离子交换高效液相色谱法(TOSOH G8 糖化血红蛋白分析仪)的测定均值为 7.31%,酶化学法(雅培 AEROSET 生化仪)的测定均值为 7.07%,线性回归方程为 $Y=1.0474X-0.5872$, $r^2=0.9544$,糖化血红蛋白可接受偏倚大于预期偏倚可信区间上限。结论 酶化学法与离子交换高效液相色谱法结果相当,酶化学法结果可接受,可满足临床要求。

关键词: 血红蛋白 A, 糖基化; 色谱法, 高压液相; 实验室技术和方法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.01.037

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)01-0090-03

Analyses and comparison of two assay systems for glycosylated hemoglobin measurement

Li Chihui, Huang Xuwei, Wu Feifei, Shi Jinqiao

(Department of Clinical Laboratory, Jinhua People's Hospital, Jinhua, Zhejiang 321000, China)

Abstract: Objective To evaluate two kinds of assay systems for glycosylated hemoglobin measurement. **Methods** Ion-exchange high performance liquid chromatography(HPLC) by TOSOH G8 glycosylated hemoglobin analyzers and enzyme chemistry method by Abbott AEROSET automatic biochemical analyzer were applied to test glycosylated hemoglobin in 40 cases of blood sample. The results went through comparative analysis, the outlier checking, the linear correlation coefficient calculating, getting expected bias estimation of linear regression equation. **Results** The determination averages was 7.31% by HPLC(TOSOH G8 glycosylated hemoglobin analyzers) and 7.07% by enzyme chemistry method(Abbott AEROSET biochemical Analyzer). The linear regression equation was $Y=1.0474X-0.5872$, $R^2=0.9544$, and glycosylated hemoglobin acceptable bias was greater than the upper limit of expected bias confidence interval. **Conclusion** Glycosylated hemoglobin results by enzyme chemical method is equivalent to ion-exchange high performance liquid chromatography which means enzyme chemistry method is acceptable to meet the clinical requirement.

Key words: hemoglobin A, glycosylated; chromatography, high pressure liquid; laboratory techniques and procedures

糖化血红蛋白 A1c(hemoglobin A1c, HbA1c)检测主要用于回顾性地评价 120 d(血红细胞的平均寿命)左右的平均血糖水平,它反映了相当长时间内的葡萄糖代谢情况^[1],被推荐为血糖控制的一个必要检测指标。目前临床实验室用于检测 HbA1c 的方法有很多,但离子交换高效液相色谱法(日本东曹 TOSOH G8)和酶化学法之间的方法学比对分析,文献报道极少,为比较这两个检测系统测定 HbA1c 的差异,探讨其可比性,现参照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)标准的 EP9-A2 文件^[2],对其进行比对分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院门诊和住院患者的糖化血红蛋白标本 40 例(男 23 例,女 17 例)。40 例标本均为 EDTA-K₂ 抗凝全血,双份。

1.2 仪器与试剂 离子交换高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC),日本东曹 TOSOH G8 糖化血红蛋白分析仪及配套试剂配套标准品;酶化学法,雅培 AEROSET 全自动生化分析仪,试剂和标准品来自宁波美康。质控品由 Bio RAD 提供,批号为 33822。

1.3 方法

1.3.1 精密度实验 根据 NCCLS EP5-A 文件要求,进行精密度评价实验。采用 Bio RAD 公司的 HbA1c 正常质控物和异常质控物。批内不精密度实验:将 2 份质控品连续测定 20 次;

批间不精密度实验,将 2 份质控品每天测定 1 次,连续测定 20 d。

1.3.2 方法学评价 以 TOSOH G8 糖化血红蛋白分析仪上使用的离子交换高效液相色谱法为比较方法,将抗凝全血标本放置于试管架上直接自动进样测定,另一份标本以雅培 AEROSET 全自动生化分析仪的酶化学法为实验方法,将标本 2 000 r/min 离心 2 min,取血细胞层 10 μ L 溶于 200 μ L 前处理液中,使红细胞溶解释放出血红蛋白,将溶解液放进试管架里进样测定,反应类型为一点终点法,波长为 340 nm。依据 EP9-A2 文件要求,每天取 8 份标本,分别用两种方法按顺序 1~8 测定样本,再按 8~1 顺序重复测定,进行相关分析和偏倚评估。

1.4 数据处理

1.4.1 离群点检验

1.4.1.1 方法内检验 将离子交换高效液相色谱法(TOSOH G8 糖化血红蛋白测定仪)与酶化学法(雅培 AEROSET 生化仪)两种方法测定的结果进行离群点检验,如两种方法内部各标本的 2 次测定结果的差值绝对值小于 4 倍差值绝对值的均值,则可认为方法内部无离群点,如其差值超出 4 倍均值对应计算相对的差值绝对值的均值,如 2 种方法内部各标本的 2 次测定结果的差值绝对值小于 4 倍相对差值绝对值的均值,则亦可认为 2 种方法内部无离群点,反之则认为该点为离群点。如

只有 1 个(例如 $n=40, 2.5\% \times 40=1$)离群点,可将这个点删除,继续下述分析,如离群点超 2 个以上,则需分析原因,然后再进行离群点检验。若未能找到明确原因,必须停止实验,检测仪器状态。

1.4.1.2 方法间检验 对两种方法之间测定的同一项目的所有点进行离群点检验。如各标本的差值绝对值小于 4 倍差值绝对值的均值,则认为方法之间无离群点。如超出 4 倍均值,需计算相对的差值绝对值的均值。如其结果差值绝对值小于 4 倍相对差值绝对值的均值则可认为无离群点。如只有 1 个离群点,分析原因并删除,继续下述分析,如果离群点超过 2 个以上,需停止比对实验,分析可能存在的干扰、误差并检测仪器状态。

1.4.2 绘制散点图和偏倚图 以比较方法离子交换高效液相色谱法测定值为 X ,实验方法酶化学法测定值为 Y ,绘制 4 种散点图。可直观观察到异常值、线性程度、偏倚等。

1.4.3 计算线性回归方程 $Y=a+bX$ 及 r^2 。

1.4.4 临床可接受性判断 将 b 和 a 以及 $X_c(\text{HbA1c}$ 的医学决定水平)值代入 $SE=|(b-1)X_c+a|$ 后看 SE 是否小于或等于 $1/3\text{CLIA}'88$ 规定的允许误差(TEa)。

1.5 统计学处理 用 Excel 2003 作相关回归和偏倚分析。

2 结 果

2.1 精密度评价 经计算求得,两质控物在 AEROSSET 上的批内不精密度分别为 1.4%、2.1%,批间不精密度分别为 1.7%、2.2%;在 TOSOH G8 上的批内不精密度分别为 1.3%、0.7%,批间不精密度分别为 1.4%、0.8%,均低于 $1/3\text{CLIA}'88$ 规定的允许误差范围(6.67%),说明实验方法和比较方法的精密度符合要求,比对实验数据可靠。

2.2 散点图与偏倚图 将 40 例标本所得的数据绘制成散点图和偏倚图。散点图以实验方法酶化学法的测定值为 Y 轴,比较方法 HPLC 法的测定值为 X 轴,见图 1。偏倚图以每样本 2 种方法双份测定的均值差为 Y 轴。以 HPLC 法每样本双份测定的均值为 X 轴。以直线 $X=0$ 作为水平中线,见图 2。

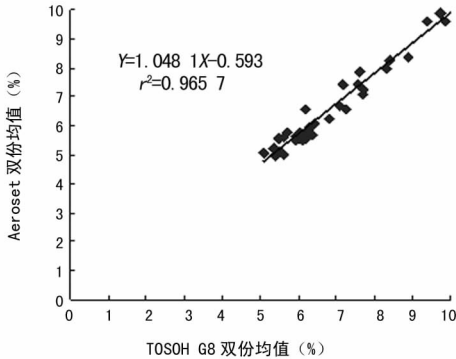


图 1 AEROSSET 与 TOSOH G8 测定 HbA1c 的均值散点图

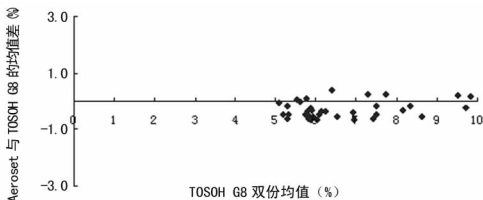


图 2 AEROSSET 与 TOSOH G8 测定 HbA1c 的差值偏倚图

2.3 离群点检验 经查 TOSOH G8 糖化血红蛋白分析仪与雅培 AEROSSET 生化仪两检测系统方法内及方法间均无离群点。

2.4 线性回归计算 $Y=1.0474X-0.5872, r^2=0.9544, r^2>0.95$,说明两种方法具有良好的相关性,见图 3。

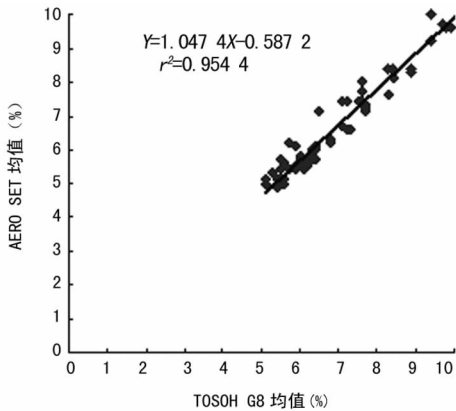


图 3 AEROSSET 与 TOSOH G8 两种方法测定 HbA1c 的线性回归图

2.5 偏倚评估 将 HbA1c 的医学决定水平值^[3]代入公式 $SE=|(b-1)X_c+a|$,结果见表 1。从表 1 可看出 HbA1c 的可接受偏倚大于预期偏倚可信区间上限, $SE \leq 1/3\text{CLIA}'88$ 规定的允许误差(TEa),说明实验方法与比较方法结果相当,实验方法可被临床接收。

表 1 HbA1c 的预期偏倚结果

医学决定水平(%)	预期偏倚(%)	预期偏倚可信区间(%)	可接受偏倚 1/3CLIA'88TEa(%)
$X_{c1}=3.5$	0.421 30	$0.421\ 3\pm0.158\ 52$	6.67
$X_{c2}=7.0$	0.255 40	$0.255\ 4\pm0.326\ 94$	6.67

3 讨 论

HbA1c 是评价糖尿病长期血糖控制的金标准^[4],可反映最近 1~2 个月的血糖控制情况,同时也是 WHO 推荐的糖尿病诊断标准^[5]。2002 年美国糖尿病学会(ADA)明确规定糖尿病患者应定期检测 HbA1c,并将其作为糖尿病血糖控制的金标准^[6]。目前临床实验室用于检测 HbA1c 的方法有很多,主要有离子交换层析法、电泳法、亲和层析法、离子捕获法和免疫法等,其中离子交换层析法主要有 HPLC 法和手工微柱法^[7],美国临床化学协会(AACC)糖化血红蛋白标准化分会和国际临床化学协会(IFCC)HbA1c 标准化工作组建议,以 HPLC 法作为检测 HbA1c 的金标准^[8],使其他方法能参照此方法实现标准化。酶化学法^[9]测定糖化血红蛋白在普通自动生化仪上应用广泛,测定前需手工进行前处理,离子交换高效液相色谱法是利用能交换离子的材料为固定相来分离离子型化合物的方法,是糖化血红蛋白自动分析仪的常用方法,该法快速、简便、精密、准确,深受使用者的好评。

本实验将离子交换高效液相色谱法与酶化学法按 EP9-A2 文件进行比对分析,结果显示两者相关性良好 $r^2=0.9544, r^2>0.95$,且均有较好的精密度,酶化学法与离子交换高效液相色谱法结果相当,酶化学法结果可接受,可满足临床要求。临床实验室可根据科室实际情况,合理选择分析方法。

另外,卫生部在 2010 年 7 月 2 日下发通知要求常规临床检验项目要在各临床实验室内实现结果互认,还要求对于开展检查结果互认的医疗机构或项目要有科学合理的认定依据。通过对两种检测系统间糖化血红蛋白检测结(下转第 113 页)

续表 3 主要医院感染革兰阴性杆菌耐药性分析

抗菌药物	鲍曼不动杆菌(132)		铜绿假单胞菌(113)		肺炎克雷伯菌(87)		大肠埃希菌(79)		变形菌属细菌 (138)	
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
亚胺培南	42.2	57.8	24.7	75.3	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
左氧氟沙星	47.9	52.1	36.8	63.2	28.7	71.3	57.5	42.5	29.7	70.3
美洛培南	37.7	62.3	15.3	84.7	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
哌拉西林	79.4	20.6	56.4	43.6	49.7	50.3	48.8	51.2	42.4	57.6
头孢他啶	57.2	42.8	53.3	46.7	40.4	59.6	57.8	42.2	39.9	60.1
妥布霉素	75.6	24.4	45.8	54.2	63.5	36.5	72.2	27.8	61.4	38.6
哌拉西林/他唑巴坦	63.2	36.8	27.2	72.8	23.3	76.7	15.7	84.3	38.5	61.5
头孢哌酮/舒巴坦	18.5	81.5	17.8	82.2	3.6	96.4	1.7	98.3	4.3	95.7
复方新诺明	76.7	23.3	89.9	10.1	63.6	36.4	78.1	21.3	90.5	9.5

R:耐药率;S:敏感率;—:此项无数据。

3 讨 论

3.1 本次监测中阳性球菌的检出率较高,尤其是所分离出的凝固酶阳性葡萄球菌占阳性球菌的比例最高,应考虑到定植菌与感染菌的问题,应提示临床医护人员微生物标本采集的规范化操作,特别是创面分泌物采集,应注意用无菌生理盐水清洗,尽量减少皮肤定植菌的污染,误导治疗。

3.2 革兰阳性菌中耐甲氧西林葡萄球菌为医院耐药主要问题,发生率 23.6%,低于山东省的38.1%,但耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(MRCNS)发生率大于或等于 70%,菌株多来源于无菌体液及各种伤口分泌物,因此留取标本是关键(排除标本污染、定植菌),应引起临床医生的高度重视,这些细菌表现为广泛的耐药性,对 β-内酰胺类、大环内酯类、氟喹诺酮类、氨基糖苷类均表现为高度耐药,但对糖肽类(万古霉素)、利奈唑胺表现为高度敏感性,至今还未发现耐药菌株;一些不常用药物如氯霉素、呋喃妥因则对这些菌有较好的活性,这些药物可供一些轻中度感染患者使用。化脓性链球菌对青霉素有很高的特异性,对其他一些药物敏感率也较高。

3.3 革兰阴性杆菌的感染以变形杆菌属细菌为主,鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌占据非发酵菌的前 2 位,且耐药现象突出,与肖永红等^[1]报道不同,这可能因为近年来碳青霉烯类抗菌药物大量使用,非发酵菌对其耐药以及部分患者的侵袭性

操作引起的非发酵菌的定植等。鲍曼不动杆菌对亚胺培南的耐药率达到了 42.2%,美洛培南 37.7%;铜绿假单胞菌则呈现较低的耐药率,对亚胺培南为24.7%,美洛培南只有 15.3%。此外对头孢类、氟喹诺酮类均呈现较高的耐药率,但对阿米卡星和头孢哌酮/舒巴坦有较高的敏感率,对头孢哌酮/舒巴坦的敏感率分别为 81.5%和 82.2%。对头孢类、氟喹诺酮类耐药是以大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌为代表的肠杆菌科细菌的主要特征,大肠埃希菌对氟喹诺酮类耐药率达到了 60%以上,对第三、四代头孢菌素的耐药率进一步上升,耐药率大于 40%,这可能与本院头孢类使用量大导致产超广谱 β-内酰胺酶多发生变异有很大关系,临床医生应加以注意,控制这类细菌医院感染流行,对这类细菌严重感染可采用碳青霉烯类、含 β-内酰胺酶抑制剂的复方制剂进行治疗。另外,头霉素类对产超广谱 β-内酰胺类肠杆菌科细菌其耐药率较低,具有一定的治疗价值。

参考文献

[1] 肖永红,王进,朱燕,等. Mohnarin 2008 年度全国细菌耐药监测[J]. 中华医院感染学杂志,2010,20(16):2377-2383.

(收稿日期:2013-07-01)

(上接第 91 页)

果的比对分析,判断两种分析方法检测出的结果有无显著性差异,可为糖化血红蛋白在不同实验室内实现结果互认提供参考依据,有条件的情况下还可做多种检测系统检测同一项目的比对研究,使不同的分析方法测出的结果更可靠,更有利于临床实验室间的结果互认。

参考文献

[1] Francesco DATI, Metzmann E, 潘柏申,等. 蛋白质实验室检测项目临床应用指南[M]. 上海:上海科学技术出版社,2008:398.

[2] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method comparison and biss estimation using patient. samples; approved guideline[S]. EP9-A2, NCCLS, 2002.

[3] 余玲丽,赵莹,吴建平. 糖化血红蛋白两种检测方法的比对[J]. 实验与检验医学,2009,27(5):487-488,548.

[4] American Diabetes Association. Standards of medical care for patients with diabetes mellitus[J]. Diabetes Care, 2003, 26(1): 33-

50.

[5] Word Health Organization. Use of glycated hemoglobin(HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus; abbreviated report of a WHO consultation[J]. Geneva, 2011(1):22-25.

[6] Hadjadj S, Duengler F, Barriere M. Determination of HbA1c concentrations in patients with cute myocardial infarction; comparison of the DCA2000 device with the HPLC method [J]. Diabetes Metab, 2005, 31(3): 290-294.

[7] 阮绍均. 高压液相层析法与酶法检测糖化血红蛋白的比较[J]. 实验与检验医学, 2009, 27(5): 465-466.

[8] 肖弘,王敏,李小盛. 离子交换高效液相层析法与酶化学法测定糖化血红蛋白的比对分析[J]. 检验医学, 2010, 25(11): 888-890.

[9] Liu L, Hood S, Wang Y, et al. Direct enzymatic assay for% HbA1C in human whole blood samples[J]. Clin Biochem, 2008, 41(7/8): 576-583.

(收稿日期:2013-10-07)