

• 检验技术与方法 •

亲和层析法测定 HbA1c 的分析性能验证*

周甲思¹, 温冬梅², 陈影², 徐全中², 索明环², 阚丽娟², 陈亚琼², 张秀明^{2△}

(1. 新乡医学院第一附属医院, 河南卫辉 453100; 2. 中山大学附属中山医院检验中心, 广东中山 528403)

摘要:目的 验证验证 Primus Trinity Ultra2 分析仪测定 HbA1c 的精密度、准确度、分析测量范围和抗干扰能力的可接受性。方法 参照美国临床与实验室标准化协会(CLSI)EP 文件及相关文献对 Primus Trinity Ultra2 分析仪测定 HbA1c 的精密度、准确度、分析测量范围和抗干扰能力进行验证。结果 Trinity Ultra2 分析仪检测 HbA1c 精密度的批内不精密度和总不精密度均小于厂商声明的不精密度值; Trinity Ultra2 分析仪测定定值参考物的结果均在各自的验证区间; Trinity Ultra2 分析仪在线性验证中, 通过测定按一定比例稀释后的标本, 得到了理论值与实测值间的回归方程, $r^2 > 0.95$, a 值在 0.97~1.03 的范围内; Trinity Ultra2 分析仪有良好的抗黄疸、溶血、脂血、乳糜等干扰物质的能力。结论 Primus Trinity Ultra2 分析仪亲和层析法的主要分析性能均达到厂商声明的性能和有关质量的要求, 可满足临床需求。

关键词: 糖化血红蛋白; 亲和层析法; 性能验证

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.17.040

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)17-2359-03

Performance verification of HbA1c determination by using affinity chromatography*

Zhou Jiasi¹, Wen Dongmei², Chen Ying², Xu Quanzhong², Suo Minghuan², Kan Lijuan², Chen Yaqiong², Zhang Xiuning^{2△}

(1. The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang, Weihui 453100, China; 2. Laboratory Medical Center, Zhongshan Hospital Affiliated to Sun Yat-sen University, Zhongshan, Guangdong 528403, China)

Abstract: Objective To evaluate the precision, accuracy, linear range and anti-interference performance of HbA1c assay by using Primus Trinity Ultra2 automated analyzer. **Methods** According to Document EP published in 2004 by American Clinical and Laboratory Standards Institution(CLSI) and relative literatures, the precision, accuracy, linear range and anti-interference performance were evaluated. **Results** The within-run and between-run CVs of HbA1c determination were both less than that announced by manufacture. In the tests of samples with certain concentrations, all the results were within the verification range respectively. In the linear verification, regression equation between the theoretical and measured values demonstrated that $r^2 > 0.95$, and a value was within the range of 0.97-1.03. For Primus Trinity Ultra2 the limit of interference effect didn't exceed the allowable error at the medical decision concentrations. **Conclusion** The precision, accuracy, linear range and anti-interference was evaluated of the Primus Trinity Ultra2 automating HbA1c all could meet the manufacture's declaim and the clinical needs.

Key words: glycosylated hemoglobin; affinity chromatography; performance verification

好的血糖控制能大大改善糖尿病并发症的病情和降低糖尿病并发症的发病率, 提高糖患者的生活质量^[1-2]。由于 HbA1c 是糖化血红蛋白中最有特征的成分, 分子结构稳定, 不受每天血糖波动、运动、食物及胰岛素的影响, 其血中浓度高低主要取决于血糖浓度或血糖与血红蛋白(Hb)接触时间, 可作为长期监控血糖的理想指标^[3-4]。HbA1c 的标准化在美国广泛展开, 并且被糖尿病控制和并发症试验(DCCT)、美国糖化血红蛋白标准化计划(NGSP)、美国糖尿病协会(ADA)、欧洲糖尿病研究协会(EASD)、国际临床化学联合会(IFCC)等认可为糖尿病的诊断标准, 诊断截断值为 6.5%。目前测量 HbA1c 的方法主要有离子交换高效液相色谱法、硼酸盐亲和层析法、免疫法、电泳法等。实验室必须对引进或改变的检测系统或方法的主要性能进行验证和分析评价, 证实能够达到临床检测所要求的标准后方可用于临床检测^[5]。本研究主要参考美国临床实验室标准化协会(CLSI)发布的 EP15-A2 和 EP6-A 文件及相关文献^[6-7], 对 Primus Trinity Ultra2 糖化血红蛋白分析仪的准确度、正确度及分析测量范围和抗干扰能力进行验证, 旨在为临床提供更准确的诊断依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源 中山大学附属中山医院患者的 EDTA 抗凝标本。

1.2 试剂与仪器 Primus Trinity Ultra2 糖化血红蛋白分析仪。洗脱液、校准品、质控物和消耗品均为原装配套试剂。

1.3 方法

1.3.1 标本制备 精密度试验: 选取 HbA1c 浓度为 4%~12% 的标本 5 例, 各标本混匀后分装为 5 份, 共 25 份, 于 -70℃ 冰冻待测。正确度实验: 用参加室间质评计划中使用的定值参考物(5 个浓度), 混匀后各分装为 3 份, 共 15 份标本, 于 -70℃ 冰冻待测。分析测量范围: 选择一个低值标本(1 号)和一个高值标本(5 号), 按比例(分别为 3:1, 1:1, 1:3)稀释得到 2 号、3 号、4 号样本, 每个浓度混匀后分装为 3 份, 共 15 份, 于 -70℃ 冰冻待测。以上制备的标本均无黄疸、溶血、脂浊等。干扰试验: 制作基础样本(硼硅酸盐亲和层析法测量 HbA1c 高低浓度值为 10.4% 和 6.2%), 配制干扰物和空白对照(按照干扰试剂盒的标准操作程序配制, 各干扰物和空白对照冻干粉加入 2 mL 蒸馏水复溶, 待充分溶解好才开始使用)。

1.3.2 检测前准备 按说明书对仪器进行维护、保养和校准,每天使用前对仪器进行质量控制,质控在控后进行标本测定。所有待测标本分析前取出并平衡室温后才能上机检测,于室温静置的时间一致。

1.3.3 精密度试验 每批重复测定 3 次,持续 5 d,为减少系统漂移产生的影响,标本检测顺序随机。如果当天因操作困难等原因导致该批数据被拒绝,应剔除该批数据,找到并纠正原因后重新测定一批。计算批内不精密度和总不精密度,并与厂家声明的不精密度进行比较。

1.3.4 正确度试验 每批样本重复测定 2 次,持续 3 天,为平均系统漂移产生的影响,标本检测顺序随机。计算可报告单位的验证区间,并与定值参考物的值比较。

1.3.5 测量范围验证 各浓度标本重复测定 2 次,1 天内完成,为平均系统漂移产生的影响,第一次按升序测定,第二次按降序测定,计算回归方程。

1.3.6 干扰试验 根据 CLSI EP7-A2 文件的要求,将溶解好的游离胆红素、结合胆红素、Hb、及乳糜 1.0 mL 与 9.0 mL 预先准备好的高、低浓度基础样本混合制成样本 A(干扰物即含特定的干扰物的高 HbA1c 浓度和低 HbA1c 浓度的干扰全血)。将溶解好的空白液 1.0 mL 与 9.0 mL 预先准备好的混合全血相混合调制成高 HbA1c 浓度和低 HbA1c 浓度样本 B(空白对照)。将样本 A 与样本 B 按 0:1、1:5、2:5、3:5、4:5、5:1 的比例配制成试验样本游离胆红素(FBiL):65.6、121.2、196.8、262.4、328.0 μmol/L,结合胆红素(CBiL):65.6、121.2、196.8、262.4、328.0 μmol/L, Hb:9.9、19.8、29.8、39.7、49.6 μmol/L,乳糜:3 000、6 000、9 000、12 000、15 000 FTU。对配好的空白对照管重复测定 10 次(样本编号为 1),其余试验样本(编号为 2~5)每个浓度重复测定 3 次,1 d 内完成。为平均系统漂移产生的影响,第 1 次按升序,第 2 次按降序,第 3 次再按升序,以此类推。统计数据,计算重复测定检测结果间的偏差(干扰率)。

1.4 统计学处理

1.4.1 精密度试验 按照以下公式计算批内和批间标准差,

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D \sum_{i=1}^n (x_{di} - \bar{x}_d)^2}{D(n-1)}}, \quad s_b^2 = \frac{\sum_{d=1}^D (\bar{x}_d - \bar{\bar{x}})^2}{D-1}, \quad s_t =$$

$\sqrt{\frac{n-1}{n} \times s_r^2 + s_b^2}$ 。 s_r :批内标准差; s_b^2 :批间方差; s_t :实验室内标准差; Σ 表示求和; D :试验天数($D=5$); x_{di} :第 d 天第 i 次实验结果; n :每天的重复测定次数($n=3$); \bar{x}_d 是第 d 天中所有结果的均值; $\bar{\bar{x}}$ 是所有结果的均值。

1.4.2 正确度试验 计算系统中每个样本测定结果的均值,确定 $1-\alpha$ 、自由度为 $2n-1$ 时 t 分布的 t 值。 n 为测试的样本数,2 为重复测定的次数。 $\alpha=1\%$, $n=5$,自由度: $2n-1=9$, $1-\alpha$ 的 t 值为 2.821。按 $\bar{x} \pm t_{1-\alpha, 2n-1} \times \sqrt{s_r^2 + s_b^2}$ 计算偏倚的验证区间。

1.4.3 线性范围 采用 EP6-A 文件要求对分析测量范围数据进行处理,计算 $Y=aX+b$,验证线性。要求: a 值在 1 ± 0.05 的范围内, $r^2 \geq 0.95$ 。

1.4.4 干扰试验 使用 Excel 软件进行统计学分析,计算重复测定检测结果间的偏差(干扰率)。干扰率(%)=(含干扰物组均值-空白对照组均值)÷空白对照组均值。根据二级实验室不精密度值的要求,以添加不同浓度干扰物之后的 HbA1c 测定均值超过同一浓度下的空白对照管的 $\pm 5\%$ 为产生干扰

作用。

2 结 果

2.1 精密度验证 若 HbA1c 在 $1\% \sim 30\%$ 范围内,厂商声明的批内不精密密度为 $0.82\% \sim 0.46\%$,总不精密密度为 $2.90\% \sim 1.09\%$ 。本试验选用的 HbA1c 范围为 $4\% \sim 11\%$,批内不精密密度为 $0.5\% \sim 0.8\%$,总不精密密度为 $0.6\% \sim 1.0\%$ 均小于厂商声明的结果。见表 1。

2.2 正确度验证 Trinity Ultra2 分析仪测定 HbA1c 的结果都在验证区间内,见表 1。

表 1 HbA1c 检测的正确度验证(%)

定值参考物浓度	实测值(均值)	实测值标准差	不确定度	验证区间
7.7	8.0	0.08	0.02	7.7~8.4
5.5	6.0	0.26	0.04	5.2~6.7
7.1	7.5	0.16	0.02	7.0~7.9
8.4	8.5	0.12	0.63	8.1~8.8
6.2	6.6	0.22	0.01	6.0~7.2

2.3 测量范围验证 采用平均斜率法,浓度理论值设为 X ,各浓度的实测值设为 Y ,用回归方程 $Y=aX+b$ 表示,得出的回归方程为 $Y=0.995 1X+0.168 5$, $r^2=0.999$,见附图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。Trinity Ultra2 分析仪在试验所涉及的浓度范围($4.4\% \sim 17.4\%$)的检测结果显示线性。

2.4 干扰试验 Primus Trinity Ultra2 分析仪各干扰组偏离值均未超过临床可接受的允许误差(5%)的要求,仪器能自动扣除本底,有良好的抗 FBiL、CBiL、Hb、及乳糜干扰的能力。

表 2 不同浓度干扰物对分析仪 HbA1c 测定偏差的影响

干扰物	不同浓度标本的测定偏差(%)	
	低浓度	高浓度
FBiL(μmol/L)		
65.6	1.08	-0.64
121.3	0.54	-1.27
196.8	1.61	-0.96
262.4	1.08	-1.27
328.0	1.08	-1.27
CBiL(μmol/L)		
65.6	0.53	-0.64
121.3	-0.53	-0.96
196.8	0.00	-0.96
262.4	1.07	-1.60
328.0	-1.07	-2.24
Hb(μmol/L)		
9.9	-0.54	1.04
19.8	-1.08	-0.35
29.8	0.00	-0.35
39.7	-0.54	-0.35
49.6	-1.61	-1.74
乳糜(FTU)		

续表 2 不同浓度干扰物对分析仪 HbA1c 测定偏差的影响

干扰物	不同浓度标本的测定偏差(%)	
	低浓度	高浓度
3 000	0.54	-0.34
6 000	0.54	-0.34
9 000	1.08	-0.69
12 000	0.00	-0.34
15 000	1.08	-1.37

3 讨 论

HbA1c 在不同族群、不同地区等监测糖尿病的切点不同,监测系统多种多样,不同方法所得结果又不一致,如何建立公认的、结果可以比对的 HbA1c 分析体系越来越受到重视。美国、欧洲等地已经相继实现了 HbA1c 检测的标准化和结果的可溯源性。中国由于幅员辽阔、民族众多等因素,现今对 HbA1c 的检测还处在多方法、多系统和检测结果不能溯源状态,根据中国糖尿病及并发症的现状来看,在中国范围内实现 HbA1c 检测的标准化势在必行,这对糖尿病患者 HbA1c 结果的一致性和制定统一的临床控制目标具有重要的意义^[8]。阳离子高效液相色谱法测定 HbA1c 的结果受多种变异体的影响^[9-10],而硼酸盐亲和层析法基本不受或少受这些变异体的影响^[11-12],并且具有操作简单、快速、精密度高且抗变异体干扰能力强,对经过翻译后修饰的 Hb 和病理 Hb 相对不敏感等优点^[13]。亲和层析法的代表系统有 Primus Trinity Ultra2、PDQ 等,可识别变异的 Hb。

Martin 等^[14]报道 In2it 分析仪系统的 1 d 内不精密度为 2.43%~3.86%之间,日间不精密度为 3.22%~3.46%,线性评价中 $a=1.020, r^2=0.993, b=0.422$,总体令人满意,并提出某些应用软件应该改进。本研究中,Primus Trinity Ultra2 糖化血红蛋白分析仪的批内不精密度和批间不精密度均小于厂商声明的批内和批间不精密度;正确度试验中参加室内质评中所用的定值参考物的实测值均在验证区间中,符合性能要求。HbA1c 水平为 4.4%~17.4%,检测结果呈线性。由于实验时所涉及的 HbA1c 浓度最高值为 17.4%,故在 HbA1c 浓度高于 17.4%时需要注意,本实验室对 Primus Trinity Ultra2 糖化血红蛋白分析仪的分析测量范围的设定,会在以后工作或实验中得到补充。Primus Trinity Ultra2 糖化血红蛋白分析仪对 FbIL、CbIL、Hb、及乳糜的干扰有很好的抵抗能力。

综上所述 Primus Trinity Ultra2 糖化血红蛋白分析仪的主要性能均达到国际标准化组织颁布的《医学实验室质量和能力的专用要求(ISO15189)》和我国《医疗机构实验室管理办

法》的要求,能为临床医师掌握糖尿病患者的血糖控制情况提供参考。

参考文献

- [1] Nathan DM, Lachin J, Cleary P, et al. Intensive diabetes therapy and carotid intima-media thickness in type 1 diabetes mellitus[J]. N Engl J Med, 2003, 348(23): 2294-2303.
- [2] Stevens RJ, Coleman RL, Adler AI, et al. Risk factors for myocardial infarction case fatality and stroke case fatality in type 2 diabetes: UKPDS 66[J]. Diabetes Care, 2004, 27(1): 201-207.
- [3] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 347.
- [4] 李黎. 糖化血红蛋白临床检测方法进展研究[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(8): 954-956.
- [5] 张秀明, 庄俊华, 郑松柏, 等. 临床化学发光免疫法检测 AFP 的分析性能验证与实验方法[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(11): 1293-1297.
- [6] 张秀明. 临床生化检验诊断学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 510-514.
- [7] Clinical Laboratory Standards Institute. EP15-A2 User Verification of performance for precision and Trueness[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2006.
- [8] 潘长玉. 中国糖尿病控制现状——指南与实践的差距: 亚洲糖尿病治疗现状调查 1998, 2001 及 2003 年中国区结果介绍[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2005, 25(3): 174-178.
- [9] 彭建宏, 刘运科, 肖春燕. 离子交换高效液相色谱法血红蛋白分析筛查地中海贫血的研究[J]. 国际医药卫生导报, 2012, 18(4): 539-543.
- [10] Lee SC, Wang LH, Tsai SM, et al. Effects of the Hb E, Hb H and Hb G-Taichung variants on HbA1c values by the Bio-Rad variant II turbo analyzer[J]. Clin Biochem, 2011, 44(16): 1338-1342.
- [11] Higgins T. HbA(1c)-an analyte of increasing importance[J]. Clin Biochem, 2012, 45(13/14): 1038-1045.
- [12] Rohlfling CL, Connolly SM, England JD, et al. The effect of elevated fetal hemoglobin on hemoglobin A1c results: five common hemoglobin A1c methods compared with the IFCC reference method [J]. Am J Clin Pathol, 2008, 129(5): 811-814.
- [13] Little RR, Vesper H, Rohlfling CL, et al. Validation by a mass spectrometric reference method of use of boronate affinity chromatography to measure glycohemoglobin in the presence of hemoglobin S and C traits[J]. Clin Chem, 2005, 51(1): 264-265.
- [14] Martin M, Leroy N, Sulmont V, et al. Evaluation of the in2it analyzer for HbA1c determination[J]. Diabetes Metab, 2010, 36(2): 158-164.

(收稿日期: 2014-05-01)

2014 版《高敏心肌肌钙蛋白临床应用中国专家共识》完稿

由中华医学会心血管病学分会主任委员霍勇教授、中华医学会检验医学分会主任委员尚红教授牵头, 中国工程院韩雅玲、张运院士, 复旦大学附属中山医院潘柏申教授等国内知名心内科及检验科权威专家共同参与的 2014 版《高敏心肌肌钙蛋白临床应用中国专家共识》最终完稿。

新版共识系统阐释了高敏心肌肌钙蛋白的检测方法、参考范围、检测要求等, 并具体论述了其在急性胸痛诊断和急性冠状动脉综合征危险分层及预后中的应用, 以及对其他心脏疾病的意义。新版共识的提出和讨论开创了心血管病学和检验医学共同合作的典范。共识中提出, 社区已成为心血管病、糖尿病等慢性病防治的主战场, 高敏心肌肌钙蛋白对社区医疗管理的价值亦成为慢性病防控研究的热点之一。新版共识全国巡讲活动将相继在北京、沈阳、广州、福州、上海、南京、成都、西安 8 座城市陆续展开。