

• 临床研究 •

Capillarys 2 Flex Piercing 糖化血红蛋白检测系统性能验证

陈乔彬¹, 李 维¹, 刘梦莹¹, 张 伟¹, 邓玉奎², 张 静^{1△}

(1. 深圳市南山区妇幼保健院检验科, 广东深圳 51802; 2. 深圳市北京大学深圳医院检验科, 广东深圳 518052)

摘要:目的 评价 Capillarys 2 Flex Piercing 全自动毛细管电泳仪检测糖化血红蛋白(HbA1c)的检测性能。方法 参照美国临床实验室标准化协会(CLSI)及厂家声明对 Capillarys 2 Flex Piercing 全自动毛细管电泳仪测定 HbA1c 的精密度、正确度、可报告范围、抗干扰能力、不同检测系统结果一致性进行验证。结果 Capillarys 2 Flex Piercing 全自动毛细管电泳仪检测正常 HbA1c 水平的批内、批间变异系数(CV)分别为 0.80%、0.92%, 病理 HbA1c 水平的批内、批间 CV 分别为 1.10%、1.32%; 正确度验证的偏差均小于厂家声明的 5%; 可报告范围验证的回归方程为 $Y=1.002X+0.023$ ($r^2=0.023$, $P=0.000$), 在 4.4%~18.3% 范围内的检测结果能达到线性要求; 在 HbA1c 浓度分别在低、中、高水平时, 干扰物总胆红素、脂血、血红蛋白对测定 HbA1c 的偏差绝对值均未超过 5%; 与 Bio-Rad Variant II 糖化血红蛋白分析仪检测结果的一致性分析的回归方程为 $Y=0.9877X-0.1344$ ($r^2=0.9942$, $P=0.000$), 呈良好的线性关系; 基于生物学变异的最佳允许总误差为 2.31%。结论 Capillarys 2 Flex Piercing 全自动毛细管电泳仪检测 HbA1c 的性能达到 CLSI 指南和厂家说明书的要求, 可以满足临床检测需求。

关键词:糖化血红蛋白; 毛细管电泳法; 性能验证

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.13.057

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)13-1932-03

糖化血红蛋白(HbA1c)是世界卫生组织(WHO)及多个国家糖尿病学会推荐的糖尿病首选诊断指标^[1-2],也是糖尿病血糖控制目标指标,以及评价糖尿病血糖管理治疗方案的有效指标。临床实验室普遍采用的 HbA1c 测定方法有多种,按原理可分为两大类:一类是基于糖化与非糖化血红蛋白所带电荷的不同,如离子交换层析法、电泳法;另一类是基于糖化与非糖化血红蛋白结构的不同,如免疫法、亲和层析法及酶法等。不同方法采用的原理不同,所测组分不同,如离子交换色谱法测定 HbA1c,亲和层析法测定总糖化血红蛋白(GHb)等^[3]。Capillarys 2 Flex Piercing 全自动毛细管电泳仪国内主要用于珠蛋白生成障碍性贫血、血红蛋白病和血清蛋白检测,近年获美国国家糖化血红蛋白标准化计划(NGSP)和国际临床化学协会(IFCC)认证。国内鲜有医院用于临床 HbA1c 检测。为了将其更好地用于临床检测,本文从精密度、正确度、可报告范围、抗干扰能力、不同检测系统结果一致性 5 个方面验证该系统分析测定 HbA1c 的性能。

1 材料与方法

1.1 标本来源 所有标本均来自深圳市南山区妇幼保健院的乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝全血标本。

1.2 仪器与试剂 Capillarys 2 Flex Piercing 全自动毛细管电泳仪(法国 Sebia 公司),稀释液、红细胞裂解液、毛细管护理液、质控物和消耗品均为原装配套试剂。仪器使用前按厂家要求完成校准,室内质控达到要求后才进行标本检测。

1.3 方法

1.3.1 精密度验证 批内精密度:随机选取新鲜临床标本重复测定 HbA1c 20 次,计算均值(\bar{x})、标准差(SD)和变异系数(CV),以 $CV\%<2.5\%$ (厂家声明)为质量要求标准;批间精密度:根据美国临床实验室标准化协会(CLSI)EP15-A2 文件^[4]选用两个不同浓度水平(正常值与病理值)EDTA-K₂ 抗凝全血标本,每个水平每日检测 1 批,每批重复检测 4 次,一共检测 5 d(5 d 内标本稳定),计算 \bar{x} 、SD 和 CV,以 $CV\%<2.0\%$ (指南要求)为质量要求标准。

1.3.2 正确度验证 将卫生部临床检验中心提供的 HbA1c 正确度验证盲样标本(201411、201412、201413、201414、201415)分别在分析仪上进行测定,每批重复测定 3 次,其测定

结果与靶值比较,计算偏倚程度。按美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)EP6-A 文件^[5]要求:偏倚小于 5%。

1.3.3 可报告范围验证 按 NCCLS EP6-A 文件^[5]要求,选择患者新鲜 EDTA-K₂ 抗凝全血标本 2 份,高值(H)和低值(L)样品浓度使其接近厂家声明的线性范围的上限与下限。将 H 和 L 样品按照 L、4L+H、3L+2H、2L+3H、L+4H、H 的比例关系配置混合,形成系列评价样品。在一个分析批次内每份样品重复测定 2 次,计算出以上 6 个样品的理论浓度。为平均系统漂移产生的影响,第 1 次按升序,第 2 次按降序,以此类推。将各个评价样品的理论浓度记为 X,对应的实际测定浓度记为 Y。利用直线回归分析计算出 Y 与 X 的直线回归方程,以 $r^2\geq 0.95$ 作为是否呈线性的判别点。用直线回归对数据进行统计,得直线回归方程 $Y=bX+a$,若 $r^2\geq 0.95$,b 在 0.97~1.03 范围内,a 接近于 0,则可直接判断测定方法在实验所涉及的浓度范围内成线性。

1.3.4 抗干扰能力验证 按 CLSI EP7-A2 文件^[6]要求,对仪器的抗黄疸、血脂、血红蛋白(Hb)的干扰能力进行验证。黄疸与血脂干扰试验,收集患者新鲜 EDTA-K₂ 抗凝全血标本 3 份,分别用于验证黄疸、血脂和 Hb 的影响。以黄疸干扰试验为例,收集高、中、低 3 个浓度水平且 Hb 浓度为 120 g/L 的全标本,先检测 HbA1c 浓度(HbA1c 水平分别为 4.1%、8.3%、16.2%),混合均匀后平均分成 5 管,离心分离出血浆,每管吸取 200 μ L 血浆,加入 200 μ L 总胆红素(TBiL)浓度分别为 79、154、192、213、300 μ mol/L 的黄疸血浆;血脂干扰操作同上,5 份干扰物的总胆固醇(TC)浓度分别为 6.4、8.3、9.1、10.3、10.9 mmol/L,三酰甘油(TG)浓度分别为 2.0、2.8、2.5、3.5、4.7 mmol/L。Hb 浓度的干扰:样品离心收集血浆,将样品 Hb 分别稀释或浓缩至 Hb 浓度 40、80、120、180、240 g/L,以上标本上机检测 HbA1c,每个处理组检测 2 次,每批次之间相隔大于 2 h。将处理前与处理后样品的 HbA1c 检测结果进行比较,处理前与处理后绝对偏倚小于或等于 5% 认为无干扰。

1.3.5 不同检测系统结果一致性比较 按 EP9-A2 文件^[7]要求,将本仪器测定结果与美国 Bio-Rad Variant II 糖化血红蛋白分析仪测定 HbA1c 的结果作一致性比较,收集患者新鲜 EDTA-K₂ 抗凝全血标本 40 份(正常和异常标本各占 50%),分别

△ 通讯作者, E-mail:243699854@qq.com。

在 2 台 HbA1c 分析仪上检测,以正序和反序共测定 2 次并计算,以 Bio-Rad Variant II 所测 HbA1c 水平为 X,本试验检测系统所测结果为 Y 绘制散点图,评价不同系统检测的偏差、相关系数(r^2)。以基于生物学变异的最佳允许总误差($<3.6\%$)为质量目标。

表 1 Capillarys 2 Flex Piercing 精密度验证结果(%)

HbA1c	批内精密度			1/4CLIA'88	批间精密度			1/3CLIA'88
	\bar{x}	SD	CV		\bar{x}	SD	CV	
正常水平	4.98	0.10	0.80	2.0	4.74	0.16	0.92	2.67
病理水平	10.90	0.93	1.10	2.0	10.86	1.01	1.32	2.67

2.2 正确度 卫生部临床检验中心提供的 HbA1c 正确度验证盲样标本检测水平与靶值的相对偏移分别为 0.56%、1.1%、-1.14%、0.8%、1.15%,偏差均小于厂家声称的 5%,小于 CLSI EP6-A 文件 CV% $<3.5\%$ 的要求。

2.3 可报告范围 选取 HbA1c 低值浓度 4.4%,高值浓度 18.3%,按比例配成系列评价物得到回归方程: $Y=1.002X+0.023(r^2=0.023, P=0.000)$,说明该毛细管电泳仪检测 HbA1c 在本实验所涉及的浓度水平(4.4%~18.3%)范围内的检测结果能达到线性要求。

2.4 抗干扰能力 HbA1c 浓度分别在低、中、高水平时,干扰物 TBiL、脂血(TC 与 TG)、Hb 对测定 HbA1c 的偏差绝对值均未超过 5%,抗干扰能力符合厂家要求。见表 2(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

2.5 不同检测系统结果一致性比较 经方法内离群点的检验,均未发现离群点。直线回归方程: $Y=0.9877X-0.1344(r^2=0.9942, P=0.000)$,呈良好的线性关系。基于生物学变异的最佳允许总误差为 2.31%(小于 3.6%),两个系统偏差评估均合格,本系统结果与 Bio-Rad Variant II 糖化血红蛋白分析仪的检测结果有良好的一致性。见图 1。

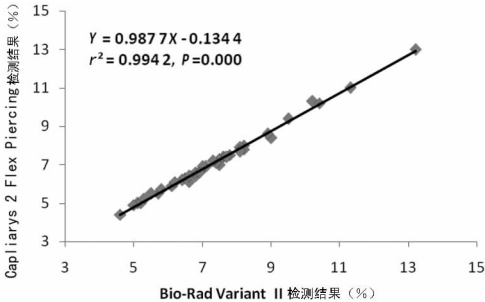


图 1 Capillarys 2 Flex Piercing 与 Bio-Rad Variant II 相关性比较

3 讨 论

Hb 糖化是一种红细胞内葡萄糖和 Hb 的 β 链 N-末端氨基间的非酶促反应,这一反应贯穿于整个生命过程。HbA1c 形成的速度和血糖水平密切相关,因为红细胞内的血糖水平只取决于血糖水平。在红细胞 120 d 的生命期内,HbA1c 会不断地聚集,它不仅是 WHO 推荐的糖尿病诊断标准,也是糖尿病病血糖控制目标,以及评价糖尿病治疗方案有效性的指标^[8]。

目前,HbA1c 的检测方法以基于糖化与非 HbA1c 所带电荷不同的离子交换高效液相色谱法(HPLC)为金标准,在偏酸溶液中 GHb 及 HbA1c 均具有阳离子的特性,经过阳离子交换层析时因二者吸附率不同,GHb 正电荷较少、吸附率较低,HbA1c 正电荷较多、吸附率较高。用不同 pH 值的磷酸盐缓冲液可以分次洗脱出 GHb 和 HbA1c,用氰化钾(KCN)可将

2 结 果

2.1 精密度 批内精密度均小于 1/4CLIA'88,小于厂家声称,即 CV% $<2.5\%$,均符合要求;批间精密度小于 1/3CLIA'88,小于 CLIS EP15-A2 文件要求的 CV% $<2.0\%$,均符合要求。见表 1。

Hb 转化为高铁氰化血红蛋白,用分光光度计测定其结果稳定可靠,但缺点是仪器价格昂贵,试剂有剧毒,且胎儿血红蛋白(HbF)与 HbA1c 的带电性很相近,在离子交换 HPLC 分析图上可能呈现一个独立的 HbF 峰,也可能与 HbA1c 峰重叠^[9]。也有学者发现,HPLC 法检测结果受到 Hb 的 D、Q、G、J 和 E 不同程度的干扰^[10]。

HbA1c 检测的干扰因素分为方法特异性和非方法学特异性两种,前者有血红蛋白病、衍生血红蛋白、Schiff 碱等的干扰,后者有红细胞生存周期异常、药物、妊娠、血红蛋白病、进展迅速的 1 型糖尿病(T1DM)、黄疸和高脂血症等^[1]。操作者除了严格按照厂家说明操作外,还应知晓 HbA1c 检测系统的干扰因素,部分人群可能需要用某种特异的 HbA1c 测定方法或不适宜采用 HbA1c 来反映体内平均血糖水平^[11]。

Sebia 公司的 Capillarys 2 Flex Piercing 全自动毛细管电泳仪应用液相电泳原理,执行全自动分析检测,分离速度快,可同时 8 份全血标本进行 HbA1c 的定量分析。同时该仪器的程序具有很高的分辨率,特别是当存在不稳定的 HbA1c、氨基酰化和乙酰化血红蛋白及 Hb 的主要变异体时,通过使用碱性缓冲液,正常和异常(或变异体)Hb 按下列顺序检测^[12],从阴极到阳极依次为 A2/C、E、S/D、F、A0、其他 Hb(包括次要 HbA1)及 HbA1c。这是该仪器有别于 Bio-Rad Variant II 的优势,该 HbA1c 检测系统特别适合用于异常血红蛋白病高发地区,也提示了不同地区在选择检测系统时应考虑区域性的流行病学。

国际标准化组织(ISO)15189:2012 和国家标准 GB/T 22576-2008 均指出,临床实验室在使用厂家已严格评估的检验方法或试剂盒之前,应验证相关分析性能,以证实在本实验室能达到厂家声明,才可以将其应用于临床实际工作当中。中国合格评定国家认可委员会(CNAS)-CL38^[13]要求性能验证项目至少应包括正确度、精密度和可报告范围。本文从精密度、正确度、可报告范围、抗干扰能力、不同检测系统结果一致性 5 个方面验证 Capillarys 2 Flex Piercing 毛细管电泳分析仪测定 HbA1c 的性能,结果表明,该检测系统性能达到 CLSI 指南和厂家说明书的要求,可以满足临床检测需求。

参考文献

[1] International Expert Committee, International Expert Committee report on the role of the A1c assay in the diagnosis of diabetes: response to the International Expert Committee[J]. Diabetes Care, 2009, 32(7): 1327-1334.
[2] World Health Organization. Use of glycated haemoglobin(HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus; abbreviated report of a WHO consultation[R]. Geneva, WHO, 2011.
[3] 王冬环,陈文祥,张传宝,等. 糖化血红蛋白实验室检测指南[J].

中国糖尿病杂志, 2013, 21(8): 679-681.

[4] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP15-A2 User verification of performance for precision and trueness; approved guideline[S]. 2nd ed. Wayne, PA, USA: CLSI, 2005.

[5] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP6-A Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures; a statistical approach; approved guideline [S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2003.

[6] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP7-A2 Interference testing in clinical chemistry; approved guideline [S]. 2nd ed. Wayne, PA, USA: CLSI, 2005.

[7] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP9-A2 Comparison and bias estimation using patient samples; approved guideline[S]. 2nd ed. Wayne, PA, USA: CLSI, 2010.

[8] Koga M, Kasayarlla S. Clinical impact of glycated albumin as another glycemic control marker[J]. Endocr J, 2010, 57(9): 751-762.

[9] 黄颖, 樊希承. 糖化血红蛋白几种常见检测方法[J]. 临床和实验医学杂志, 2009, 8(2): 126-127.

[10] 潘琦, 李维依, 张丽娜, 等. 三种检测方法对变异血红蛋白患者糖化血红蛋白测定结果比较分析[J]. 中华糖尿病杂志, 2014, 6(9): 665-667.

[11] 纪立农, 宁光. 糖化血红蛋白[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 124-127.

[12] Jaisson S, Leroy N, Meurice J, et al. First evaluation of Capillarys 2 Flex Piercing® (Sebia) as a new analyzer for HbA1c assay by capillary electrophoresis[J]. Clin Chem Lab Med, 2012, 50(10): 1769-1775.

[13] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL38 医学实验室质量和能力认可准则在临床化学检验领域的应用说明[S]. 北京: 中国合格评定国家认可委员会, 2012.

(收稿日期: 2015-04-02)



骨外科住院患者肺部感染细菌特点和药敏结果分析

张辉亮, 夏厚才, 黄树华, 刘健玲, 黄苑宜, 梁艺华
(广州市南沙区第六人民医院检验科, 广东广州 511470)

摘要:目的 了解骨外科住院患者肺部感染细菌的分布特点和药物敏感状况, 为合理使用抗菌药物提供参考依据。方法 对该院检验科微生物实验室 2011 年 1 月至 2014 年 12 月从 579 例骨外科住院患者痰标本分离的病原菌和主要细菌的药敏试验结果进行统计分析。结果 共分离病原菌 188 株, 其中革兰阴性杆菌 102 株(54.26%), 以肺炎克雷伯菌为主; 革兰阳性球菌 44 株(23.4%), 以金黄色葡萄球菌为主; 酵母样真菌 41 株(21.81%), 主要为白假丝酵母菌。革兰阴性杆菌对碳青霉烯类和氨基糖苷类均有较高的敏感性, 对 β -内酰胺类敏感性较低; 葡萄球菌对万古霉素、夫西地酸、米诺环素、喹奴普汀/达福普汀、呋喃妥因、替考拉宁等敏感性较高, 对青霉素类敏感性较低; 白假丝酵母菌对 5-氟胞嘧啶和两性霉素 B 敏感性较高。结论 骨外科住院患者肺部所感染的细菌基本为院内感染菌, 围手术期合理使用抗菌药物可减少和避免院内感染的发生。

关键词: 骨外科; 痰培养; 细菌; 药敏试验

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.13.058 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2015)13-1934-03

骨外科由于伤口或术口外敞等特点, 为防止创伤部位感染, 医生在围手术期往往会预防性使用抗菌药物^[1-5], 另外如果出现创口感染抗菌药物则会被加强使用。抗菌药物长期广泛的使用容易导致体内菌群失调, 尤其是常居菌较多、较杂的肺部, 如某种或几种菌被抑制后, 未被抗菌药物抑制的细菌即会大量繁殖, 导致感染。因此, 除创口之外, 骨外科住院患者肺部是最易被细菌感染的部位。痰培养是分离肺部感染细菌的主要途径, 笔者对本院微生物实验室近 3 年分离的骨外科痰培养标本阳性菌株及主要细菌的药敏结果进行了统计分析。现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 标本来源与质控菌株 标本来自 2011 年 1 月至 2014 年 12 月广州市南沙区第六人民医院骨外科 579 例住院患者送检痰培养标本。质控菌株: 大肠埃希菌(ATCC 25922)、铜绿假单胞菌(ATCC 27853)及金黄色葡萄球菌(ATCC 25923), 均购自卫生部临床检验中心。

1.2 仪器与试剂 所用仪器为法国生物梅里埃 VITEK-ATB 细菌鉴定和药敏分析仪, 细菌鉴定和药敏卡分别为: 肠杆菌科 ID 32E 和 ATB G-5; 非发酵菌 ID 32GN 和 ATB PSE 5; 葡萄球菌 ID32 STAPH 和 ATB STAPH 5; 链球菌 ID32 STREP 和 ATB STREP 5; 酵母样真菌 ID 32 C 和 ATB FUNGUS 2 INT。

所用培养基羊血平板、巧克力平板和 MH 平板均为江门凯琳生物有限公司生产。超广谱 β 内酰胺酶(ESBLs) 确认试验所用药敏纸片为杭州天和微生物试剂有限公司生产。

1.3 方法

1.3.1 培养、鉴定和药敏试验 标本采集和分离培养严格按照《全国临床检验操作规程》第 3 版进行, 用羊血平板和巧克力平板对痰标本作初次接种, 巧克力平板须置于 5%~10% 的 CO₂ 环境。获得纯化培养后, 经革兰染色, 作触酶、氧化酶和凝固酶等试验初筛, 再用上述对应的鉴定和药敏卡在 VITEK-ATB 分析仪上进行菌株鉴定和药敏试验。

1.3.2 ESBLs 确认试验 对 VITEK-ATB 分析仪药敏试验提示可能为产 ESBLs 的肠杆菌科细菌, 用头孢他啶、头孢噻吩及加有克拉维酸的这两种复合药敏纸片做药敏纸片扩散法(K-B 法)药敏试验, 若加有克拉维酸的药敏纸片抑菌圈比不加克拉维酸的对应药敏纸片抑菌圈大于或等于 5 mm, 则可确认为 ESBLs 菌株。

1.4 统计学处理 采用 WHONET 5.6 软件对耐药性进行分析。

2 结果

2.1 细菌分布特点 579 份骨外科送检的痰培养标本中培养阳性 162 份, 共分离细菌 188 株, 其中 39 株为同一患者在不同