

• 论 著 •

高效液相色谱法检测糖化血红蛋白性能验证

罗利梅, 王凤学[△], 郑光柄

(遵义市第一人民医院检验科, 贵州遵义 563000)

摘要:目的 对 BIO-RAD D-10 高效液相色谱法检测糖化血红蛋白(HbA1c)的性能进行验证,评价其检测性能是否满足实验室质量及临床诊疗的要求。方法 按 CLSI EP15A2 文件的方法对糖化血红蛋白进行正确度、精密度的验证,采用线性回归分析方法对线性进行验证,按 WS/T 402 2012 的方法对参考区间进行验证。结果 HbA1c 校准品水平 1 的标识值为 5.3%,测定结果的验证限为 1.63%~8.78%,校准品水平 2 的标识值为 10.0%,测定结果的验证限为 4.76%~13.64%,校准品的标识值均包含在测定值的 95%置信区内,正确度验证通过。HbA1c 浓度为 5.24% 的实验室变异系数(CV)为 1.01%,HbA1c 浓度为 9.84% 的 CV 为 0.54%,均小于厂商声明的精密度,精密度验证通过。HbA1c 线性校准品的实测值和目标值的线性回归方程为 $Y = 1.008X + 0.023$,相关系数指数 r^2 为 0.999,线性良好。20 份健康成人标本的 HbA1c 检测结果均落在制造商提供的生物参考区间 4.1%~6.2% 范围内,参考区间验证通过。结论 BIO-RAD D-10 高效液相色谱法检测 HbA1c 的正确度、精密度、线性、参考区间均通过验证,能为临床诊疗供准确可靠的检验结果,满足临床检测的要求,可用于临床标本的检测。

关键词:糖化血红蛋白; 性能验证; 正确度; 精密度; 参考区间

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.16.021

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)16-2341-03

Performance verification for high performance liquid chromatography detection of glycated hemoglobin

Luo Limei, Wang Fengxue[△], Zheng Guangbing

(Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Zunyi, Zunyi, Guizhou 563000, China)

Abstract: Objective To verify the detection performance of glycated hemoglobin (HbA1c) by using the BIO-RAD D-10 high performance liquid chromatography method, and to evaluate whether the detection performance can satisfy the requirements of the laboratory and clinical diagnosis and treatment. **Methods** The method of CLSI EP15A2 was used to verify the accuracy and precision. The linear correlation and reference range were verified respectively by linear regression analysis and the method of the WS/T 402 2012. **Results** The calibration value of HbA1c calibrator level 1 was 5.3% and the validation limit of measured results was 1.63%–8.78%. The calibration value of HbA1c calibrator Level 2 was 10.0%, and the validation limit of measured results was 4.76%–13.64%. Both calibration values were included in the 95% confidence range of measured values, so the accuracy verification passed. Laboratory variation coefficient (CV) for HbA1c with concentration of 5.24% was 1.01% and for 9.84% was 0.54%, both less than the precision that the manufacturer declared, so the precision verification passed. The equation of linear regression analysis for HbA1c linearity calibrator measured value and target value was $Y = 1.008X + 0.023$, with correlation coefficient index r^2 of 0.999, so the linearity was good. The measured results of 20 healthy adults specimens were in the reference interval (4.1%–6.2%) that the manufacturer provided. **Conclusion** Accuracy, precision, linear correlation and reference range of HbA1c measured by BIO-RAD D-10 HPLC detection method were verified. It can provide the accurate and credible measurement results for clinical diagnosis and treatment, and can be used in the detection of clinical specimens.

Key words: glycosylated hemoglobin; performance verification; accuracy; precision; reference interval

糖化血红蛋白(HbA1c)是血红蛋白经由两步非酶化糖化反应形成的。HbA1c 的水平与血中糖的平均浓度及血红蛋白的循环寿命相关。因此它的测定被普遍认为可以反应临床上糖尿病控制的程度。2010 年 1 月,美国糖尿病协会(ADA)将 HbA1c 作为糖尿病筛查和诊断指标,确定 HbA1c $\geq 6.5\%$ 为诊断切点^[1]。因此,HbA1c 的检测需要更高的准确性,必须在临床标本检测前对 HbA1c 的分析性能进行验证。

1 材料与方

1.1 材料 卫生部临床检验中心 2013 年 3 月 HbA1c EQA 样本 5 份,作为正确度最终验证材料。线性验证物采用 Bio-Rad 公司提供的 Lyphochek[®] Hemoglobin A1c Linearity Set HbA1c 线性校准品,共四个水平,批号:34650,作为线性验证材料。体检标本收集健康体检成人男、女各 10 份 EDTA 抗凝血标本,作为参考区间验证材料。质控品 Lyphochek Diabetes

Control,糖化血红蛋白质控物,严格按照说明书进行复溶使用,批号:33841、33842,用于验证方法的精密度。校准品采用 Bio-Rad 公司配套校准品,在 2~10 °C 环境下保存,稳定至标签上所标识的有效期。复溶好的校准品 4 °C 可保存 1 周。批号:S31081,作为正确度验证预试验材料。

1.2 仪器与试剂 仪器美国 BIO-RAD D-10 HbA1c 分析仪(简称 D-10),采用离子交换高效液相色谱法(HPLC)对人全血 HbA1c 进行测定。试剂 D-10 配套试剂及校准品。

1.3 方法

1.3.1 正确度验证 采用 CLSI EP-15A2 文件的方法进行验证。使用参考物质验证真实度方案所得测定值的 95% 置信区包含参考物的指定值为正确度验证通过^[2]。

1.3.2 精密度验证 采用 CLSI EP-15A2 文件的方法进行验证。统计不精密度小于或等于判断限的,检测系统的不精密度

属可接受;大于判断限的,表示不精密度不符合要求^[2]。验证方案:在室内质控在控的条件下采用 Bio-Rad 提供的质控品,用于验证试验的质控物的批号不应与用于监控的质控物的批号相同。准备 2 个浓度水平的质控物,所选择的浓度水平应接近医学决定水平和制造商声明试验所用的浓度。样本分析方式采用机外稀释模式,每个质控物每天测定 1 批,每批重复测定 3 次,连续测定 5 d,收集数据。每批测定必须同时做质控测定。如质控测定结果失控,或因其他因素判断测定失控,剔除此批数据,重新检测其他批次数据。

1.3.3 线性验证 采用伯乐公司提供的线性验证物进行验证,将测试值与目标值比较,进行线性回归分析。回归方程 $Y=bX+a$ 中,如 b 很接近 1, a 近于 0,相关系数大于 0.975,线性评价处于可接受范围。

表 1 HbA1c 正确度验证预试验结果

水平	参考物指定值(%)	不确定度(%)	偏倚(%)	上置信限(%)	下置信限(%)	上验证限(%)	下验证限(%)	验证结论
1	5.3	1.1	1.89	5.2	5.2	8.78	1.63	验证通过
2	10	1.1	8.0	11.84	6.56	13.64	4.76	验证通过

2.3 精密度验证结果 精密度验证结果见表 3。低、高值质控品的检测变异系数(CV)均小于厂家声明的精密度,精密度验证通过。

表 2 2013 年 3 月卫生部 HbA1c 室内质评统计结果

样本编号	本实验室结果(%)	靶值(%)	偏倚(%)	允许范围(%)	评价结果
201311	4.90	4.80	2.08	4.22~5.38	通过
201312	9.00	9.10	-1.10	8.01~10.19	通过
201313	6.60	6.60	0.00	5.81~7.39	通过
201314	7.00	7.10	-1.41	6.25~7.95	通过
201315	5.90	5.80	1.72	5.10~6.50	通过

表 3 精密度验证结果

项目	\bar{x} (%)	CV(%)	本实验室 CV(%)	本实验室标准差(%)	验证结论
HbA1c	5.24	2.35	1.01	0.05	验证通过
HbA1c	9.84	1.65	0.54	0.05	验证通过

2.4 线性验证 线性验证结果见表 4 和图 1。回归方程 $Y=$

1.3.4 参考区间验证 使用制造商提供的参考区间^[3]。采集 20 份健康体检者(男、女各 10 份)EDTA 抗凝标本进行检测,落在参考区间以外的结果不超过 2 个为验证通过。

1.4 统计学处理 采用 Excel2007 办公软件进行数据处理。经统计学处理,实验室变异系数(CV)小于等于厂家声明的精密度,或实验室内标准差小于验证值为精密度通过验证。

2 结 果

2.1 正确度验证 正确度验证预试验结果见表 1。依据参考物指定值、不确定度(Sa)及 10 次数据计算出正确度水平 1、水平 2 的验证限,两个浓度的指定值均包含在验证区间内,厂家声明的正确度初步验证通过。

2.2 EQA 验证结果 5 份质控标本的偏倚均在允许范围内,验证通过,见表 2。

$1.008X+0.023, r^2=0.999$,线性良好。

2.5 参考区间验证 采用试剂制造商提供的生物参考区间 4.1%~6.2%,参考区间验证结果见表 5。20 份健康体检者的 HbA1c 检测结果均在厂家提供的参考区间 4.1%~6.2% 范围内,验证通过。

表 4 线性验证测试结果(%)

水平	目标值	实测值
1	4.4	4.4
2	6.1	6.2
3	9.8	10.0
4	14.6	14.7

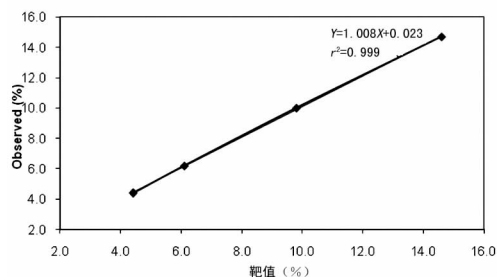


图 1 线性验证线性图

表 5 参考区间验证结果 HbA1c

性别	1 份(%)	2 份(%)	3 份(%)	4 份(%)	5 份(%)	6 份(%)	7 份(%)	8 份(%)	9 份(%)	10 份(%)	验证结论
女	4.2	5.1	4.7	6.0	4.2	4.7	5.5	6.1	4.8	4.9	验证通过
男	6.0	4.5	4.4	5.7	5.2	4.8	5.3	5.9	4.3	5.6	验证通过

3 讨 论

HbA1c 是红细胞血红蛋白的 β 链 N 端缬氨酸与葡萄糖非酶化结合的产物,占血红蛋白总量的 60%~70%^[4]。由于红细胞的寿命是 120 d,所以,HbA1c 反应过去 2~3 个月来血糖的平均水平,它不受偶尔一次血糖升高或降低、抽血时间、患者

是否空腹、是否使用胰岛素等因素的影响,因此,HbA1c 水平被认为是判断糖尿病病情控制程度和监测治疗的可靠指标,是评价糖尿病患者 2~3 个月内血糖控制水平的良好指标,而日益受到临床医生的重视。

目前 HbA1c 的检测方法有 30 多种,按原理主要分为两大

类:一是基于 HbA1c 与非 HbA1c 的电荷不同而设计的检测方法,包括离子交换色谱法、毛细管电泳法、等电聚焦法等;二是基于血红蛋白上糖化基团的结构差异来设计的检测方法,包括硼酸亲和色谱法和免疫分析方法^[5]。美国 HbA1c 标准化计划(NGSP)推荐以不同介质的 HPLC 方法为检测 HbA1c 的参考方法^[6]。《中国血糖监测临床应用指南》中指出,目前应采用具有 NGSP 标准化的 HbA1c 结果来估计平均血糖水平,实验室应该采用离子交换高效液相色谱法(HPLC)检测 HbA1c。本文按医学实验室质量和能力认可准则(ISO15189)CNAS-CL38 对 HbA1c 的正确度、精密度、可报告范围及生物参考区间进行验证。采用 EP-15A2 的正确度验证方案,用厂家提供的具有指定值的校准品作为正确度验证预试验材料,初步验证该检测方法的正确度,正确度验证结果通过。以卫生部临床检验中心能力比对(PT)结果作为最终该正确度验证结果,2013 年 3 月 5 份 HbA1c PT 样本的检测方法与靶值的相对偏倚为 -1.41%~2.08%,均在允许范围±10%以内^[7],正确度验证通过。从初步验证和最终验证结果可以看出,由于参考物质很难买到,可以使用制造商提供的校准品作初步验证,验证结果通过至少可以表明检验系统保持制造商声明的正确度。

精密度验证是性能验证的一个重要参数,尤其是 HbA1c 作为糖尿病筛查和诊断的指标。甚至有临床组织颁布的指南建议将 HbA1c 是否下降 0.5%来评判新的治疗方案是否有效^[8]。这就要求 HbA1c 的检测需要有很好的精密度。采用 EP-15A2 精密度验证方案,验证 HbA1c 水平 1 浓度为 5.24%,水平 2 浓度为 9.84%的精密度,验证的实验室变异系数(CV)分别为 1.01%和 0.64%,均小于制造商声明的精密度 2.35%和 1.65%,验证通过。

目前,关于线性验证的方法有很多,较为常用的有 EP6-A 法,CAP-IRC 法和改良 Doumas 法。但是,HbA1c 是以百分率来衡量浓度,即 HbA1c 占总血红蛋白的百分率,而非真正意义上的浓度。对于 HbA1c 线性范围验证的特殊性在于其混合样本预期值的计算,在计算预期值时将样本间的血红蛋白浓度差异应考虑在内^[9]。这样验证操作起来就会很麻烦,给实验室带来不必要的工作量。因此,本实验室采用伯乐公司提供的 HbA1c 线性验证物,对本室开展的 HbA1c 的线性进行验证,将测试值与目标值比较,作线性回归,看是否呈线性,若成线性,线性验证通过。本次线性验证物浓度为 4.4%、6.1%、9.8%、14.6%,分布在厂家声明的线性范围 3.8%~18.5%中

的低、中、高浓度,线性回归相关系数为 0.999,线性良好,线性验证通过。对于超出线性范围浓度的标本,不宜进行稀释。

本次生物参考区间验证选择了 20 份体检合格的健康人样本,10 份男性,10 份女性。对厂家提供的参考区间 4.1%~6.2%进行验证,20 份标本的检测结果均在参考区间内,符合 95%以上个体的检测结果在参考区间范围内,验证结果为可接受,可以使用厂家提供的参考区间^[10]。

综上所述,本实验室采用的 BIO-RAD D-10 高效液相色谱法检测 HbA1c 的性能符合制造商的声明要求,检测结果的正确度、精密度,检测方法的线性范围及生物参考区间均符合临床诊疗要求,可以用于检测临床标本。

参考文献

- [1] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus[J]. Diabetes Care, 2014, 37(1): 81-90.
- [2] Clinical Laboratory Standards Institute. EP-15A2 User demonstration of performance for precision and accuracy[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2004.
- [3] 王治国. 临床检验方法确认与性能验证[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 272.
- [4] 彭湘杭, 杨锐, 艾雅琴, 等. 糖化血红蛋白与空腹血糖诊断糖尿病效果比较[J]. 广东医学, 2011, 32(7): 863-865.
- [5] Weykamp C, John WG, Mosca A. A review of the challenge in measuring hemoglobin A1c[J]. J Diabetes Sci Technol, 2009, 3(2): 439-445.
- [6] Hoelzel W, weykamp C, Jeppsson J, et al. IFCC reference system for measurement of hemoglobin A1c in human blood and the National standardization schemes in the United States and Sweden: a method-comparison study[J]. Clin Chem, 2004, 50(1): 166-174.
- [7] 中华医学会糖尿病学分会. 中国血糖监测临床应用指南(2011 年版)[J]. 中华糖尿病杂志, 2011, 3(1): 13-20.
- [8] 宋银丹, 段勇. 糖化血红蛋白检测标准化的研究进展[J]. 实验与检验医学, 2013, 31(2): 108-110.
- [9] 姚少濠, 李云珍, 莫南勋, 等. 糖化血红蛋白线性范围的验证及其特殊性[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 25(6): 83-86.
- [10] 张葵. 定量检测系统方法学性能验证实验的基本方法[J]. 临床检验杂志, 2009, 27(5): 321-323.

(收稿日期: 2015-05-27)

(上接第 2340 页)

对策研究[J]. 全科护理, 2014, 12(15): 1345-1346.

- [3] 任岫, 夏莉, 马艳焱, 等. 乌鲁木齐市无偿献血人群分布及献血动机调查分析[J]. 临床军医杂志, 2012, 40(2): 434-437.
- [4] 严仲文. 东莞市街头无偿献血者知行信调查分析[J]. 临床血液学杂志, 2014, 27(4): 313-314.
- [5] 朱跃国, 何江江, 曹海亮, 等. 上海市自愿无偿献血现状调查[J]. 中国输血杂志, 2011, 24(5): 431-433.
- [6] 魏胜男, 明邦余. 无偿献血者服务需求调查分析[J]. 中国输血杂志, 2010, 23(7): 548-549.
- [7] 孔珂, 高丽. 浅析无偿献血 400 mL 的科学性探讨[J]. 中华医学研究杂志, 2005, 20(5): 377-378.
- [8] 罗丽花. 荆门市自愿无偿献血情况分析[J]. 临床血液学杂志,

- 2013, 26(12): 882-883.
- [9] 石骥. 加强军队无偿献血促进工作初探[J]. 西南国防医药, 2007, 17(1): 89-90.
- [10] 蔡桂荣. 舒适护理在无偿献血中的应用[J]. 黑龙江医药, 2013, 26(6): 215-216.
- [11] 毛乃绒. 沟通在无偿献血招募和献血者保留中的应用[J]. 中国实用医药, 2013, 35(8): 262.
- [12] 杨静. 无偿献血者调查分析及招募方法[J]. 甘肃医药, 2014, 33(5): 341-342.
- [13] 龚帅. 垫江县 2008~2012 年无偿献血血液检测不合格原因分析[J]. 重庆医学, 2014, 43(21): 199-201.

(收稿日期: 2015-04-26)