

· 临床检验 ·

亲和层析高效液相法检测糖化血红蛋白的性能验证

陈雨, 杜娟, 胡莹莹, 齐志宏, 张辉, 崔巍

中国医学科学院北京协和医院检验科, 北京 100730

摘要: 目的 验证亲和层析高效液相法检测糖化血红蛋白的性能。方法 参考美国临床实验室标准化协会(CLSI) EP5、EP6、EP9 文件对亲和层析高效液相法糖化血红蛋白分析仪的准确度、不精密度、检测范围、携带污染率、方法学比对和干扰性进行验证。结果 准确度与靶值接近。不精密度分别为 0.82%、0.72% 和 0.79%。糖化血红蛋白浓度在 5.2% ~ 18.8% 区间, 线性相关良好($r^2 = 0.999$)。检测浓度在 4.9% ~ 15% 区间, 携带污染率为 0.12。全血和稀释模式数据最大偏差为 0.1。Premier Hb9210 与 Variant II 仪器比对: $r^2 = 0.996$, 线性回归分析方程 $y = 1.0001x - 0.003$, t 检验 ($n = 40$), $t = 0$, $P = 1.43$ 。干扰试验中含变异血红蛋白的标本, 亲和层析高效液相法结果与血糖结果相关性: HbJ 组, $r = 0.93$; HbF 组, $r = 0.83$, 离子交换高效液相法与血糖相关性: HbJ 组, $r = 0.024$; HbF 组, $r = 0$ 。结论 亲和层析高效液相法设备各项性能参数符合 CLSI 文件要求, 适用于临床检测。

关键词: 糖化血红蛋白; 亲和层析高效液相法; 性能验证

中图分类号: R446.11

文献标识码: A

文章编号: 1004-8685(2014)16-2361-04

Performance verification of affinity chromatography HPLC in HbA1c detection

CHEN Yu, DU Juan, HU Ying-ying, QI Zhi-hong, ZHANG Hui, CUI Wei

Department of Laboratory Medicine, Peking Union Medical College Hospital,

Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100730, China

Abstract: Objective To verify the analytical performance of affinity chromatography HPLC in haemoglobin A1c (HbA1c) detection. **Methods** The accuracy, imprecision, detection range, contamination carryover rate, methodology comparison and interference of affinity chromatography HPLC were verified referring to the CLSI evaluation protocols EP5, EP6 and EP9. **Results** Accuracy test results were all within the range of quality controls, and close to the target values. Imprecision results at three different levels were 0.82%, 0.72% and 0.79%, respectively, which met the requirement (less than 1%). The HbA1c showed good linear correlation in the concentration range of 5.2% ~ 18.8% ($y = 1.003x - 0.125$, $r = 0.995$). The carryover value was 0.12 when HbA1c concentration in the range of 4.9% ~ 15%, the cross contamination between samples can be ignored. Manual dilution evaluation test results showed that the maximum deviation between whole blood and dilution mode was 0.1. Premier Hb9210 and Variant II were in good correlation, with the linear regression equation $y = 1.0001x - 0.003$ ($r = 0.998$). Paired t -test data of the two groups ($n = 40$) showed there was no significant statistical difference ($t = 0$, $P = 1.43$). In interference test, the results of affinity chromatography HPLC method (Premier Hb9210) had good correlation with the blood glucose (group HbJ, $r = 0.927$; group HbF, $r = 0.827$), and the results of Variant II had poor correlation with the blood glucose (group HbJ, $r = 0.024$; group HbF, $r = 0$). **Conclusion** The HbA1c detection by affinity chromatography HPLC method is in line with the requirements of CLSI, applicable to routine clinical testing.

Key Words: HbA1c; Affinity chromatography HPLC; Performance verification

糖化血红蛋白(HbA1c)是红细胞中血红蛋白与葡萄糖持续且不可逆地进行非酶促蛋白糖基化反应的产物,其寿命与红细胞的寿命一致。人体内红细胞的寿命一般为120 d,在红细胞死亡前,血液中HbA1c含量相对保持恒定。HbA1c水平反映的是在检测前120 d内机体的平均血糖水平,不受标本采集时间、是否空腹、是否使用胰岛素等因素影响,是判定糖尿病

患者血糖长期控制情况的良好指标^[1]。本研究评价了亲和层析高效液相法检测HbA1c的性能,以期验证该方法是否适用于临床应用。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 仪器A及配套试剂(性能验证用):Primus Premier Hb9210全自动糖化血红蛋白分析仪(亲和层析高效液相原理, CV < 2%),为本研究的测试仪器,来自英国Trinity Biotech公司,配套试剂A(批号:3816),试剂B(批号:4278),DIL(批号:42-

作者简介: 陈雨(1970-),女,大专,主管技师,主要从事临床基础检验及内分泌学研究。

通讯作者: 崔巍, E-mail: cuiw@pumch.cn

11)。仪器 B 及配套试剂: Variant II 全自动糖化血红蛋白分析仪(离子交换高效液相原理, $CV < 2\%$), 为本研究的参考仪器, 来自美国 Bio-Rad 公司, 配套试剂批号: 64001133。正确度验证所用的低值和高值质控品(批号: 33821), 为美国 Bio-Rad 公司提供。

1.2 标本来源 51 例标本来自 2013 年 8 月北京协和医院门诊患者, 均经 Variant II 全自动糖化血红蛋白分析仪首先测定了 HbA1c 浓度。其中, 30 例的 HbA1c 检测值在 4% ~ 6% 之间, 20 例的 HbA1c 检测值在 6% ~ 15% 之间, 1 例的结果 $> 15\%$ 者, 用于正确度、精密度、携带污染和方法学比对研究。1 例 HbA1c 为 18.9% 的标本来自北京大学人民医院, 用于线性验证。20 例变异血红蛋白阳性的标本来自北京协和医院门诊, 其中 HbF 阳性的标本共 10 例, 浓度为 65% ~ 80%; HbJ 阳性的标本共 10 例, 浓度为 25% ~ 53%, 用于干扰性验证。上述所有标本均为常规检测的剩余标本, 本研究不采集与患者隐私相关的任何医疗信息。

1.3 方法 严格按照校准程序进行仪器校准, 方法评价期间每日测定 2 个水平定值质控品, 判断是否在控。根据美国临床实验室标准化协会(CLSI) EP5、EP6、EP9 文件制定实验方案。

1.3.1 正确度验证 对于验证仪器 Premier Hb9210, 使用伯乐厂家赋值的低值质控品和高值质控品, 每个水平的质控分别测定 6 次, 计算测定均值与赋值的百分偏倚。要求每次测量的结果均应在质控要求的可信范围内。

1.3.2 精密度评价 根据 EP5 - A2 文件, 对高、中、低 3 个浓度水平的 HbA1c 标本, 每天检测同一浓度 2 份标本, 分 2 批检测, 每天得到 4 个测定值, 连续测定 20 d。对每个浓度水平独立进行精密度评价, 计算平均值、标准差和 CV 值。要求各浓度水平标本的 CV 值均应 $\leq 2\%$ 。

1.3.3 分析测量范围评估 根据 EP6 - P2 文件, 将接近分析仪检测上限的高值样本和检测下限的低值样本混合成 5 个不同浓度的标本, 浓度分别为 100% 低值, 75% 低值 + 25% 高值, 50% 低值 + 50% 高值, 25% 低值 + 75% 高值, 100% 高值。混合均匀后将各个浓度的标本分别测定 2 次, 取其均值, 采用直线回归方程进行数据分析, 直线回归方程, $y = bx + a$ 。要求 $r \geq 0.975$ 。

1.3.4 携带污染率评估 取 HbA1c 低值标本(5.0%左右)11 例, 及高值标本($> 15\%$)10 例, 按照 L1, L2, L3, H1, H2, L4, H3, H4, L5, L6, L7, L8, H5, H6, L9, H7, H8, L10, H9, H10, L11 顺序检测标本, 计算每个水平的 CV 值, 高-低标本的 s 值和低-低标本 s 值。要求: (1) 每个水平的 CV 值计算要低于 2%; (2) 高-低标本的 s 值 ≤ 3 倍的低-低标本 s 值; (3) 携带污染率 = 高-低标本检测平均值 - 低-低标

本检测平均值, 要求携带污染率 < 3 倍的低-低标本 s 值。

1.3.5 手工稀释验证 取 10 例抗凝血标本, 采用如下两种模式进行操作: (1) 全血模式: 原采血管上机检测, 记录结果。(2) 稀释模式: 同样 10 例血标本, 采用稀释模式进行检测, 记录结果。以全血模式检测结果为基础值 A, 以 $A \pm 7\% A$ 计算参考范围, 对比两种模式实验结果差异。要求稀释模式的检测值在此参考范围为符合。

1.3.6 比对实验 Premier Hb9210 作为实验仪器和实验方法, Variant II 作为基准仪器和比对方法。根据 NCCL EP9 - A2 要求, 取 50 例 HbA1c 水平不同的临床标本, 其中 20 例的 HbA1c 范围 $> 6\%$ 。每天检测 10 例标本, 按照 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 的标本顺序, 分别在 Premier Hb9210 和 Variant II 上进行检测, 持续 5 d。利用所有样本双份测定的有效数据, 计算两个方法的线性回归方程, $y = bx + a$, 要求 $r \geq 0.975$, b 接近 1, a 足够小。

1.3.7 干扰性研究 取 HbF 和 HbJ 增高的标本, 分别使用两种方法进行检测, 数据分析方法: (1) 对两组数据进行配对 t 检验分析, 评估两数据差异有无显著差异, $P < 0.05$ 表示两种方法的检测结果之间的差异有统计学意义。(2) 分析检测结果与血糖结果进行相关性分析, $r > 0.800$ 为检测结果与血糖有良好的相关性。

1.4 统计学处理 应用 Microsoft 2003 及 SPSS 11.5 软件进行统计学分析。两样本均数比较, 采用配对样本 t 检验, $P < 0.05$ 表示两种方法的检测结果之间的差异有统计学意义; 相关性分析采用 Pearson 相关分析, 计算相关系数 r 值, 判断 P 值: $r \leq 0.300$, 为不存在线性相关; $0.300 < r \leq 0.500$ 为低度线性相关; $0.500 < r \leq 0.800$ 为显著线性相关; $r > 0.800$ 为高度线性相关; $P > 0.05$ 为两变量无相关, $P < 0.05$ 为两变量相关; 线性回归采用简单线性回归分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 正确度评估 低值质控样本检测值范围为 $5.4\% \pm 0.08\%$, 在质控靶值和范围 5.6% (5.0% ~ 6.2%) 内。高值质控样本检测值范围 $9.8\% \pm 0.05\%$, 在质控靶值和范围 9.8% (8.6% ~ 11.0%) 内。提示, 结果符合正确度评估的要求。

2.2 精密度验证 对于高、中、低 3 个不同水平的 HbA1c 标本, 检测结果见表 1, $\bar{x} \pm s$ 分别为 $4.9\% \pm 0.04\%$ 、 $8.3\% \pm 0.06\%$ 和 $12.6\% \pm 0.1\%$; CV 分别为 0.82%、0.72% 和 0.79%, 均符合要求。

2.3 分析测量范围评估 2 次分析测量范围实验的结果见表 2, 检测相关性 r 均为 $0.995 > 0.975$, 符合线性要求。

表1 高、中、低3个水平的HbA1c重复性测定结果

| 序号 | HbA1c 低值(%) | HbA1c 中值(%) | HbA1c 高值(%) |
|----|-------------|-------------|-------------|
| 1 | 4.8 | 8.2 | 12.5 |
| 2 | 4.9 | 8.3 | 12.7 |
| 3 | 4.9 | 8.3 | 12.7 |
| 4 | 4.9 | 8.3 | 12.8 |
| 5 | 4.9 | 8.3 | 12.7 |
| 6 | 4.8 | 8.4 | 12.5 |
| 7 | 4.9 | 8.3 | 12.7 |
| 8 | 4.9 | 8.4 | 12.6 |
| 9 | 4.9 | 8.4 | 12.6 |
| 10 | 4.9 | 8.3 | 12.6 |
| 11 | 4.9 | 8.3 | 12.7 |
| 12 | 4.9 | 8.4 | 12.6 |
| 13 | 4.8 | 8.3 | 12.6 |
| 14 | 4.9 | 8.3 | 12.5 |
| 15 | 4.9 | 8.3 | 12.4 |
| 16 | 4.9 | 8.4 | 12.7 |
| 17 | 4.9 | 8.3 | 12.7 |
| 18 | 4.8 | 8.4 | 12.6 |
| 19 | 4.9 | 8.4 | 12.7 |
| 20 | 4.9 | 8.4 | 12.7 |

表2 HbA1c 2次分析测量范围实验结果(%)

| 构成因素 | 第1次检测 | | 第2次检测 | | 平均值 | |
|-----------|-------|------|-------|------|------|------|
| | 预期值 | 检测值 | 预期值 | 检测值 | 预期值 | 检测值 |
| 100%低 | 5.1 | 5.1 | 5.2 | 5.2 | 5.2 | 5.2 |
| 75%低+25%高 | 8.5 | 8.3 | 8.6 | 8.5 | 8.6 | 8.4 |
| 50%低+50%高 | 11.9 | 11.9 | 12.1 | 11.9 | 11.9 | 11.9 |
| 25%低+75%高 | 15.3 | 15.2 | 15.6 | 15.6 | 15.5 | 15.4 |
| 100%高 | 18.8 | 18.8 | 19.1 | 19.1 | 18.9 | 18.9 |

2.4 携带污染率评估 低值为4.9%的HbA1c标本和高值为15.0%的HbA1c标本,其CV值分别为1.4%和0.6%,低于2%;高-低标本的s值为0,低-低标本s值为0.045;携带污染率为0.12,携带污染率<3倍低-低标本s值(0.134)(表3)。所有结果均符合要求。

2.5 手工稀释验证 全血模式和稀释模式测定的HbA1c结果之间的差值绝对值在0~0.1之间(表4),符合结果要求。

2.6 方法对比研究 分别使用Premier Hb9210和Variant II测定50例HbA1c标本,结果分别为6.84±2.03和6.80±2.04;两组数据进行配对标本t检验,t=0,<t₃₉(2.023),P=1.43,提示两组数据无统计学显著差异;两种方法的线性回归分析方程为:y=1.0001x-0.003,r=0.998,提示二者相关性良好。

表3 HbA1c携带污染率结果

| 标本 | HbA1c 测定结果(%) | 低值-低值(%) | 高值-低值(%) |
|-----|---------------|----------|----------|
| L1 | 4.8 | | |
| L2 | 4.8 | 4.8 | |
| L3 | 4.9 | 4.9 | |
| H1 | 15.1 | | |
| H2 | 15.2 | | |
| L4 | 5 | | 5 |
| H3 | 15 | | |
| H4 | 15.2 | | |
| L5 | 5 | | 5 |
| L6 | 4.9 | 4.9 | |
| L7 | 4.9 | 4.9 | |
| L8 | 4.9 | 4.9 | |
| H5 | 15 | | |
| H6 | 15.3 | | |
| L9 | 5 | | 5 |
| H7 | 15 | | |
| H8 | 15.2 | | |
| L10 | 5 | | 5 |
| H9 | 15.1 | | |
| H10 | 15.1 | | |
| L11 | 5 | | 5 |
| 平均值 | | 4.88 | 5 |
| s值 | | 0.0447 | 0.00 |
| CV | | 0.9 | 0.0 |

表4 全血模式和稀释模式测定的HbA1c结果(n=10)

| 序号 | 全血模式测定值(%) | 手工稀释模式测定值(%) | 差值绝对值(%) |
|----|------------|--------------|----------|
| 1 | 5.5 | 5.4 | 0.1 |
| 2 | 5.7 | 5.7 | 0 |
| 3 | 5.4 | 5.4 | 0 |
| 4 | 5.4 | 5.5 | 0.1 |
| 5 | 5.3 | 5.4 | 0.1 |
| 6 | 7.6 | 7.6 | 0 |
| 7 | 7.2 | 7.2 | 0 |
| 8 | 7.2 | 7.2 | 0 |
| 9 | 7.8 | 7.8 | 0 |
| 10 | 8.9 | 8.9 | 0 |

2.7 干扰性研究 对于HbJ变异血红蛋白干扰组,血糖测定值为4.89 mmol/L±0.24 mmol/L,其中Premier Hb9210测定的HbA1c结果为4.90%±0.40%,Variant II测定的HbA1c结果为6.82%±2.56%,配对样本均数t检验结果显示,t=4.435,t_{0.05(9)}=2.262,P<0.05;对于HbF变异血红蛋白干扰组,血糖测定值为4.76 mmol/L±0.49 mmol/L,其中Premier Hb9210测定的HbA1c结果为3.92%±0.26%,Variant II测定的HbA1c结果为0,配对样本均数t检验结果显示,t=37.560,t_{0.05(19)}=2.262,P<0.05(表5)。

对于HbJ组,Premier Hb9210和Variant II检测结果与血糖的相关系数r值分别为0.927和0.024;对于HbF组,相关系数r值分别为0.827和0。

表5 HbJ 和 HbF 干扰性研究的检测结果($n=20$)

| 异常血红蛋白类型 | GLU (mmol/L) | 亲和层析法 HbA1c(%) | 高效液相法 HbA1c(%) |
|----------|-----------------|-------------------|-------------------|
| HbJ | 5.2 | 5.4 | 8.6 |
| HbJ | 4.9 | 4.9 | 10.2 |
| HbJ | 5.1 | 5.4 | 4.5 |
| HbJ | 4.9 | 5 | 7.7 |
| HbJ | 4.5 | 4.3 | 7.4 |
| HbJ | 4.9 | 4.8 | 7.5 |
| HbJ | 4.5 | 4.2 | 2.6 |
| HbJ | 5.1 | 5.2 | 6.5 |
| HbJ | 5 | 4.9 | 3.5 |
| HbJ | 4.8 | 4.9 | 9.7 |
| HbF | 4.9 | 3.9 | 0 |
| HbF | 4.4 | 4 | 0 |
| HbF | 5.1 | 3.9 | 0 |
| HbF | 4.8 | 3.8 | 0 |
| HbF | 5.5 | 3.9 | 0 |
| HbF | 5.3 | 3.8 | 0 |
| HbF | 4.3 | 3.9 | 0 |
| HbF | 5 | 3.7 | 0 |
| HbF | 4 | 4.6 | 0 |
| HbF | 4.3 | 3.7 | 0 |

3 讨论

1977年-1997年,英国23个临床中心在对5102例2型糖尿病患者开展的前瞻性糖尿病研究(UKPDS)发现,HbA1c水平仅降低1%,就可使糖尿病相关并发症发生的风险降低21%,相关死亡降低25%,患者总死亡率降低17%;患者心肌梗死的风险降低18%,脑卒中风险降低15%,眼和肾继发性疾病的风险降低35%。在HbA1c超过6.2%时,视网膜病变的发生率明显增高。当HbA1c超过8%以后才出现糖尿病肾病发生危险性明显增高。与神经病变相关的HbA1c切点可能会更低。多项研究证明:HbA1c与糖尿病并发症密切相关。所以,在2002年,美国糖尿病学会(ADA)将HbA1c定义为糖尿病病人血糖监控的“金标准”,HbA1c<7%时,一般可采用饮食和运动疗法。HbA1c>7%时,不管OGTT的诊断是糖耐量减退还是糖尿病,均需要药物治疗。

HbA1c在糖尿病监控上的作用很明显,那么它能否用于糖尿病的筛查和诊断呢?经过专家们多年的研究证明,HbA1c作为糖尿病的诊断指标有诸多优点:更好的反映长期血糖水平和慢性并发症风险生物变异性较小;分析前的不稳定性较小;无需空腹或特定时间取血;相对来讲不受急性(如应激、疾病相关)的血糖波动的影响;目前用于指导糖尿病的管理和治疗方案的调整。所以,在2010年ADA将HbA1c纳入糖尿病筛查和诊断指标,切点是6.5%。

基于HbA1c检测在糖尿病的管理中的重要性,实验室在引入一项新技术或新设备时必须要了解该新方法或新仪器的性能特点。Premier Hb9210采用

亲和层析高效液相技术,原理为葡萄糖和血红蛋白稳定结合都会产生cis-diol官能基,能与硼酸盐特异性结合,利用管柱层析法,来分析所有被糖化的血红蛋白,亲和层析法特异性强^[2]。本文从以下几个方面对该仪器进行了评价。

正确度验证结果显示,两个水平的质控样本检测6次,结果均在控。精密度验证结果显示,3个不同水平的HbA1c标本检测的CV值均<1%,符合临床和实验室的要求。在5.2%~18.8%之间,有着良好的线性梯度,尽管试剂说明书中标明该仪器在0%~33.1%之间均具有良好的线性,但在评估此仪器时,临床所能找到的最高浓度的HbA1c标本的测定值为18.8%,因此,针对这一标本进行了对该仪器的线性验证。本次采用4.9%和15.0%两个标本进行携带污染率的评估,携带污染率的结果为0.12,符合要求,在临床上,15%的高值标本的比例相对较少,所以本次实验可以证明该仪器对于样本间的交叉污染的比率很低,满足实验的要求。手工稀释实验结果显示,全血和稀释血之间的差异仅仅为0.1,这提示该仪器的全血模式和稀释模式均可以很好的满足实验需要。在方法比对研究中,Premier Hb9210作为亲和层析高效液相方法学的新仪器,与本研究的参比仪器Variant II(离子交换高效液相法)的检测结果有着良好的相关性,检测结果非常接近。异常血红蛋白有可能是干扰HbA1c测定的主要因素,实验结果表明,当血液中存在变异血红蛋白时,亲和层析高效液相法与离子交换高效液相法相比,前者更具有方法学上测定优势,变异血红蛋白的干扰甚小,其HbA1c的检测方法与血糖之间有着良好的相关性,这与文献报告的结果一致^[3-6]。

综上所述,全自动糖化血红蛋白分析仪Premier Hb9210的正确度和精密度高、交叉污染小(相邻极高的糖化标本时),且具有良好的线性。此外,有高效液相结果图实时监测软件支持,可自动检查仪器的状态和结果的可靠性,适合于临床常规检测HbA1c。

参考文献

- [1] 中华医学会糖尿病分会. 中国2型糖尿病防治指南[M]. 2010年版. 北京:北京大学医学出版社,2011:1.
- [2] 王虹,高颖,纪立农. Primus Uhra2亲和层析HPLC系统在糖化血红蛋白检测上的临床应用[J]. 中国医学检验杂志,2006,7(3):185-186.
- [3] Lin CN, Emery TJ, Little RR. Effects of hemoglobin C, D, E, and S traits on measurements of HbA1c by six methods[J]. Clin Chim Acta, 2012, 413(7-8): 819-821.
- [4] 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.
- [5] 谢荣荣,潘素芳,于涓. 离子交换HPLC法和亲和层析HPLC法检测糖化血红蛋白结果的比较和分析[J]. 中国实验诊断学,2009,13(3):384-386.
- [6] Lee ST, Weykamp CW, Lee YW, et al. Effects of 7 hemoglobin variants on the measurement of glycohemoglobin by 14 analytical methods[J]. Clin Chem, 2007,53(12): 2202-2205.

收稿日期:2013-11-27