

两种不同原理的方法测定糖化血红蛋白的结果比对评估

姜莹¹, 肖鹤飞^{1△}, 赵军¹, 陈福光², 黄琳² (1. 广东省珠海市妇幼保健院检验科/珠海市医学遗传研究所 519001; 2. 广东省珠海市人民医院检验科 519001)

【摘要】目的 以高效液相色谱法作为参考方法, 对免疫透射比浊法测定糖化血红蛋白(HbA1c)水平的正确度进行评估。**方法** 分别应用丽珠试剂股份有限公司生产的免疫透射比浊法试剂与美国 BIO-RAD 公司生产的高效液相色谱法试剂, 对 200 例不同程度糖尿病患者与健康人的临床血液标本的 HbA1c 水平进行盲法平行测定, 并对结果进行比较分析。**结果** 本批标本测定结果中最高值为 13.7%, 最低值为 4.5%, 无须剔除的离群值。两种检测方法经统计学分析, 计算出其相关性系数(r)=0.997 0, 组内相关系数(ICC)=0.996 6, 拟合的直线回归方程 $Y=0.999 8X-0.017 8$, $r^2=0.993 2$ 。**结论** 免疫透射比浊法测定 HbA1c 的结果与高效液相色谱法相比具有很好的相关性和一致性, 且因前种方法无须特殊的仪器设备及其相对较低的试剂成本而更适合在广大基层医院推广应用。

【关键词】 糖化血红蛋白; 高效液相色谱法; 免疫透射比浊法

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.01.010 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)01-0023-02

Comparative evaluation of HbA1c results detected by two methods of different principles JIANG Ying¹, XIAO Ge-fei^{1△}, ZHAO Jun¹, CHEN Fu-guang², HUANG Lin² (1. Department of Clinical Laboratory, Zhuhai Municipal Maternity and Child Health Care Hospital/ Zhuhai Municipal Medical Genetics Institute, Zhuhai, Guangdong 519001, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Zhuhai Municipal People's Hospital, Zhuhai, Guangdong 519001, China)

【Abstract】Objective To assess the accuracy of the immunoturbidimetry assay for detecting glycosylated hemoglobin A1c(HbA1c) with the high-performance liquid chromatography(HPLC) as the reference method. **Methods** 200 clinical blood samples collected from different degrees of diabetic patients and healthy people were performed the HbA1c blinded parallel detection by the Livzon HbA1c immunoturbidimetry reagent and the BIO-RAD HPLC reagent. **Results** The highest and the lowest values of HbA1c in the results of this batch of samples were 13.7% and 4.5% respectively, there was no outlier needing to be excluded. We calculated several parameters by statistical analysis, including the linearity correlation coefficient($r=0.997 0$), the intraclass correlation coefficient(ICC=0.996 6) and the fitting linear equation was($Y=0.999 8X-0.017 8$, $r^2=0.993 2$). **Conclusion** The immunoturbidimetry assay and HPLC have a good correlation and consistence for detecting HbA1c, and the former assay method is more suitable for promotion and application in primary hospitals because of its relative low reagent cost and no need of special instrument.

【Key words】 glycosylated haemoglobin; high-performance liquid chromatography; immunoturbidimetry assay

随着中国人民生活水平的提高和生活方式的改变, 糖尿病的患病率已由 1986 年的 1.04% 上升至 2008 年的 9.7%, 据估计, 中国成人糖尿病总数达 9 240 万, 可能已成为世界上糖尿病患病人数最多的国家^[1]。在糖尿病的监测指标中, 常用血清葡萄糖测定, 但其反映的只是患者当前的血糖水平, 且易受饮食、药物等因素影响。糖化血红蛋白是血红蛋白与糖类经非酶促反应结合而成的, 以 HbA1c 为主, 它的合成过程是缓慢且不可逆的, 其血液浓度反映了测定前 2~3 个月机体平均血糖水平, 因其分析前不稳定性较小被作为糖尿病(DM)的筛选、长期血糖控制、疗效评估的有效监测指标, 在临床上得到了广泛的应用。2011 年 WHO 发布的《应用糖化血红蛋白诊断糖尿病》咨询报告中推荐在有条件的地区采用 HbA1c 诊断糖尿病^[2]。目前 HbA1c 检测的方法有很多种, 包括离子交换高效液相法、亲和色谱高效液相法、免疫比浊法等。本研究在自动生化分析仪上用免疫透射比浊法测定 HbA1c 的结果与高效液

相色谱法(HPLC)测定 HbA1c 的结果进行方法学比对, 以评估前法在临床应用中的可行性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集珠海市人民医院(A 组)和珠海市妇幼保健院(B 组)两家临床机构 2012 年 6~8 月就诊的各 100 例 EDTA-K₃ 抗凝全血标本, 其中男 109 例, 女 91 例; 年龄 25~75 岁; 健康人 60 例、疑似糖尿病患者 60 例、治疗中糖尿病患者 60 例, 以及合并有尿毒症的糖尿病患者 20 例, C 组为两家医院就诊的 200 例患者的数据。

1.2 仪器和试剂

1.2.1 仪器 A 组使用日本 HITACHI 7600 全自动生化分析仪和美国 BIO-RAD D-10 HPLC HbA1c 分析仪对标本进行检测。B 组使用日本 HITACHI 7180 全自动生化分析仪和美国 BIO-RAD D-10 HPLC HbA1c 分析仪对标本进行检测。

1.2.2 试剂 全自动生化分析仪(日立 7600 和 7180)均使用

珠海丽珠试剂股份有限公司生产的 HbA1c 检测试剂盒(免疫透射比浊法),校准品为该公司生产的与检测试剂盒原装配套产品。HPLC 法使用的为 BIO-RAD 公司生产的原装 HbA1c 检测试剂盒,校准品为试剂原装配套产品。质控品均采用 BIO-RAD 公司生产的 HbA1c 专用质控品。

1.3 方法 200 例标本均采用盲法进行平行测定。在使用免疫透射比浊法测定前需对标本进行预处理,即吸取 5 μL 沉积红细胞加入至 500 μL 溶血剂中,让红细胞充分溶解后再进行检测。

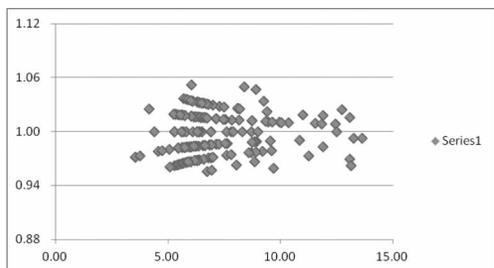
1.4 统计学处理 应用 SAS 8.0 统计学软件对两种方法进行 Bland-Altman 散点图分析、相关性检测、组内相关系数(ICC)及直线回归方程比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.5 溯源性说明 BIO-RAD 公司生产的 D-10 检测试剂盒已经过美国国家糖化血红蛋白标准化计划(NGSP)认证。珠海丽珠试剂股份有限公司生产的 HbA1c 校准品(制造商产品校准品)是严格遵照《体外诊断医疗器械 生物样品中量的测量校准品和控制物质赋值的计量学溯源性》(GB/T 21415-2008/ISO 17511:2003)的溯源量值程序进行的,通过 BIO-RAD D-10 HPLC 检测方法(制造商选定测量程序)向上溯源至国际约定校准品。

2 结 果

2.1 测定结果中最高值为 13.7%,最低值为 4.5%,同一份标本用 2 种不同方法检测结果的最大绝对差值为 0.5%,最小绝对差值为 0。A、B 两组数据均显示免疫透射比浊法相对 HPLC 法呈负偏差。

2.2 两种测定方法间离群点的检查 本研究的 200 组数据中,最大相对偏差为 0.051,未超过相对偏差均值的 4 倍(0.053),并经 Bland-Altman 偏倚散点图分析(图 1),95%置信区间为 0.94~1.06。由图 1 也可以看出,所有测量结果均在 95%置信区间内。无离群点需剔除,所有数据有效。



注:纵坐标是同份标本的比值(比值=考核试剂/参比试剂)、横坐标是同份标本的均值。

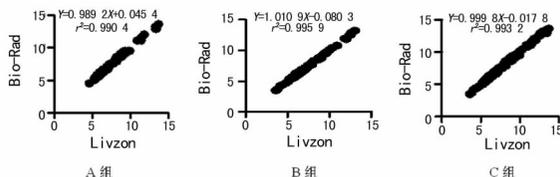
图 1 200 份标本检测结果相对偏倚散点图

2.3 相关性检测 经统计学分析,A 组 HbA1c 的免疫透射比浊法与 HPLC 法比较,相关系数(r)=0.995 1;B 组两种方法比较得 $r=0.997 9$;两家医院 200 份标本数据(C 组)的综合分析得 $r=0.997 0$ 。结果显示,所测试剂在不同仪器上的检测结果与 HPLC 法比较均显示了很好的相关性。

2.4 ICC 检验 经统计学分析,A 组内两台仪器间的 ICC=0.995 1,B 组内两台仪器间的 ICC=0.997 9,C 组内两种方法间的 ICC=0.996 6,三组结果均 ICC>0.75,说明用免疫透射比浊法在不同的仪器上检测 HbA1c 与 HPLC 法的检测结果比较,均显示出很好的一致性。

2.5 直线回归方程比较 A 组中两种不同方法的结果作直线回归分析,方程为 $Y=0.989 2X+0.045 4$, $r^2=0.990 4$;B 组

两组数据作直线回归分析,方程为 $Y=1.010 9X-0.080 3$, $r^2=0.995 9$;C 组为 A、B 两组综合数据的直线回归分析,方程为 $Y=0.999 8X-0.017 8$, $r^2=0.993 2$ 。各组测定结果作散点图分布如图 2。以上结果显示,每组比对方法间的 r 均大于 0.95,说明结果分布范围符合要求。



注:纵坐标是 HPLC 法测定的结果,横坐标是免疫透射比浊法测定的结果。

图 2 两种方法测定临床标本结果散点图

三组比对结果的回归方程中斜率与截距经统计学分析均为 $P > 0.05$,说明拟合直线回归方程的斜率与 1 之间的差异无统计学意义,截距与 0 之间的差异也无统计学意义,可以认为直线通过坐标原点,也说明了两种检测方法具有很好的一致性。

3 讨 论

HbA1c 不单只作为糖尿病治疗效果监测的指标,国内有研究表明,HbA1c 水平与非糖尿病高血压患者有密切关系,是原发性高血压的危险因素^[3]。国外也有学者通过对社区 9 603 例中年参与者的动脉粥样硬化风险的前瞻性研究分析观察到:HbA1c 是一个可以预测心血管疾病和脑卒中的因子,它与心血管风险均可能介导高血压的发展^[4]。美国杜克大学的 Hudson 等^[5]报道,对非糖尿病患者行心脏手术时,患者术前如果 HbA1c 水平高于 6.0%,其发生急性肾功能损伤的风险增加,是术后早期(30 d 内)病死率增高的独立风险因素。随着 HbA1c 在糖尿病诊断以外的多领域的广泛研究应用,该项指标的检测已越来越受到临床重视。

随着科学技术的不断进步,各种仪器设备不断进入检验领域,HbA1c 的测定方法就有几十种之多。目前常用的 HbA1c 检测原理基本上可分为两大类:一类是基于 HbA1c 与血红蛋白的电荷不同;另一类是基于血红蛋白上糖化基团的结构特点^[6]。离子交换 HPLC 检测 HbA1c 可以达到临床需求的精密度和稳定性。2011 年我国 HbA1c 室间质评结果统计显示,相同仪器的组内变异系数(CV)在 3.33%~15.44%,多数仪器组内 CV%>5%,而基于离子交换 HPLC 的仪器组内 CV 相对较小^[7],显示该法测定的结果在不同的仪器上具有很好的一致性。因此,美国国家糖化血红蛋白标准化计划(NGSP)将其作为 HbA1c 标准化参考系统的参考方法^[8]。然而,HPLC 法检测需要特殊的仪器,且仪器、试剂昂贵,测试成本较高,较难在我国各基层医院实验室推广应用。另外,近几年为广大临床单位所推崇的 HbA1c 的床旁快速诊断虽然也被广泛地应用,但由于其方法的精密密度、偏倚性能方面尚不足以满足质量保证的要求^[9],导致测定结果差异很大,临床上难以作出合理的评价。免疫透射比浊法测定 HbA1c 是利用抗原、抗体特异性反应的原理,检测所需用到的自动生化分析仪在广大基层医院也已广泛地普及。有研究使用进口的免疫透射比浊法产品与 HPLC 法进行比较,显示两种方法具有良好的相关性和可比性^[10]。本研究通过使用国产免疫透射比浊法检测试剂与 HPLC 法对 200 例不同浓度的 HbA1c 进行盲法平行测定,(下转第 27 页)

和骨骼生长影响大,喹诺酮类会影响未成年人软骨发育,而克林霉素临床与大环内酯类抗菌药物临床使用以到达更好的疗效^[6],因此肺炎支原体临床经验用药多采用大环内酯类抗菌药物,尤其是未成年患者,而红霉素更是大环内酯类的首选药,所以使临床肺炎支原体对大环内酯类抗菌药物的耐药形势越来越严峻。本次所研究的 A、B 两组患者是根据微生物敏感性检测前是否经验用药而分,通过研究数据可看出, A 组对不同类别抗菌药物的耐药性高于 B 组($P < 0.05$),说明不规范用药可能是造成临床耐药菌株增多的主要原因之一^[6],合理使用抗菌药物,可避免耐药性进一步播散。

肺炎支原体主要经飞沫传染,潜伏期 2~3 周,常表现为头痛、咽痛、发热、咳嗽等一般的呼吸道症状^[7]。从本实验对肺炎支原体感染患者的治疗效果看,根据微生物敏感性检测结果进行个性化治疗,所有患者用药治疗就有较好的疗效, A 组患者治疗一个疗程后的有效率要低于初次发病的 B 组患者,两组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。本研究 B 组患者依据微生物敏感性检测结果用药的有效率为 96.09%,高于王佩东^[8]所报道的临床有效率数据,说明按照微生物敏感性检测结果用药对肺炎支原体感染患者的治疗可取得较好的治疗效果。肺炎支原体引起空气飞沫传播性,是造成患者易复发的重要原因。及时的微生物敏感性检测,个性化的药物治疗,对提高治愈有效率、防止耐药株的增加具有重要意义。

参考文献

[1] 叶俏霞. 两种检测急性呼吸道感染患儿肺炎支原体方法

(上接第 24 页)

结果显示两种方法同样具有很好的相关性与一致性,表明用国产免疫透射比浊法试剂测定 HbA1c 的结果是有保障的。而且,该法测试成本相对较低,无须特殊检测仪器,操作简便,可用于批量检测,对临床提高血糖监控水平,降低糖尿病并发症的发生具有重要的意义。

当前国内市场上已有多家公司生产免疫透射比浊法测定 HbA1c 的试剂盒,虽有多名学者报道该法精密度高、偏倚度小,但是由于检测方法、仪器的标准化程度不够,每年卫生部室间质评结果均显示,不同厂家、不同批号的试剂在不同仪器上检测,表现出较大的变异度,这也是中国目前并不推荐采用 HbA1c 诊断糖尿病的原因之一。因此,不管选用哪种方法、哪家试剂,均应采取如下措施来提高 HbA1c 的检测质量:知晓 HbA1c 检测的干扰因素;重视量值溯源,使用科学、实用的分析系统;整个检测过程应严格按照规范的标准化操作规程进行和参加室间质量评价活动定期监测测定结果质量^[11]。

参考文献

[1] 中国 2 型糖尿病防治指南(2010 年版)[J]. 中国糖尿病杂志, 2012, 20(1): s1-s36.
 [2] World Health Organization. Use of glycosylated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus: abbreviated report of a WHO consultation[M]. Geneva: WHO, 2011: 1-25.
 [3] 徐安平,李卫宁,张毅,等. 糖化血红蛋白检测对非糖尿病高血压患者的临床价值[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(7): 777-778.

的比较[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(23): 2970-2971.

[2] Tuuminen T, Varjo S, Ingman H, et al. Prevalence of chlamydia pneumoniae and mycoplasma pneumoniae mmunoglobulin G and A antibodies in a healthy finnish population as analysed by quantitative enzyme immunoassays[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2000, 7(5): 734-738.
 [3] 胡亚美,江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社, 2006: 1204-1205.
 [4] 中华医学会呼吸分会. 社区获得性肺炎诊断和治疗指南[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2006, 29(10): 651-655.
 [5] 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: 331-333.
 [6] 贾秀红,段培锋,李建厂,等. 克林霉素辅佐阿奇霉素治疗小儿支原体肺炎 115 例疗效观察[J]. 滨州医学院学报, 2009, 32(1): 29-31.
 [7] 赵才祥. 小儿呼吸道感染肺炎支原体检测与分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(22): 5045-5046.
 [8] 王佩东. 大环内酯类药物序贯疗法治疗肺炎支原体肺炎的体会[J]. 中国感染控制杂志, 2007, 6(1): 21-23.

(收稿日期:2013-05-08 修回日期:2013-09-03)

[4] Bower JK, Appel LJ, Matsushita K, et al. Glycated hemoglobin and risk of hypertension in the atherosclerosis risk in communities study[J]. Diabetes Care, 2012, 35(5): 1031-1037.
 [5] Hudson CC, Welsby IJ, Phillips-Bute B, et al. Glycosylated hemoglobin levels and outcome in non-diabetic cardiac surgery patients[J]. Can J Anaesth, 2010, 57(6): 565-572.
 [6] 王冬环,张传宝,陈文祥,等. 应重视糖化血红蛋白测定技术及量值溯源[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(9): 965-968.
 [7] 闫颖,张传宝,张江涛,等. 三种相同原理的糖化血红蛋白分析仪检测结果的初步比对[J]. 检验医学, 2012, 27(7): 575-578.
 [8] Little RR, Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, et al. The national glycohemoglobin standardization program: a five-year progress report[J]. Clin Chem, 2001, 47(11): 1985-1992.
 [9] 王薇,杨雪,胡丽涛,等. 糖化血红蛋白两种床旁检测性能的比较[J]. 中国糖尿病杂志, 2012, 20(7): 511-514.
 [10] 黄保荣,王金松,王金安,等. 三个可溯源性糖化血红蛋白测定系统测定结果的比对和偏倚评估[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(1): 63-66.
 [11] 王冬环,陈文祥. 应注重糖化血红蛋白在糖尿病诊疗中的临床价值[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(6): 493-496.

(收稿日期:2013-04-12 修回日期:2013-08-19)