

· 质量管理研究 ·

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2016.02.19

糖化血红蛋白不同测定方法的可比性研究*

胡红霞,张秀明,温冬梅,索明环,张德才,徐胜男,阚丽娟(中山大学附属中山医院检验医学中心,广东中山 528403)

摘要:目的 对离子交换高效液相色谱法(IE-HPLC)、硼酸盐亲和层析高效液相色谱法(AC-HPLC)和高效毛细管电泳法(HPCE)测定糖化血红蛋白(HbA1c)进行比对分析和偏倚评估,实现不同方法检测结果的可比性。方法 以 IE-HPLC 法为参比方法(该法已通过美国 NGSP I 级实验室认证),HPCE 法和 AC-HPLC 法为实验方法,依据美国临床和实验室标准化协会(CLSI)EP9-A3 文件进行方法学比对和偏倚评估,比对前进行参比方法正确度验证和实验方法精密度验证;对不可比的实验方法用经 NGSP 样本赋值传递的新鲜全血实施校准,校准后进行可比性的验证。结果 参比方法对 10 个定值 NGSP 样本进行检测,检测结果全部在靶值的 $\pm 6\%$ 内。两个实验方法的批内 CV 均 $< 1.5\%$,批间 CV 均 $< 2.0\%$ 。HPCE 法在医学决定水平处与参比方法的偏倚分别为 -0.06% 和 -0.07% ,小于 $1/2$ CAP TEa,与参比方法具有可比性;AC-HPLC 法分别为 -0.31% 和 -0.31% ,均大于 $1/2$ CAP TEa,与参比方法不可比;用经 NGSP 样本赋值传递的两个浓度新鲜全血校准 AC-HPLC 法,校准后的偏倚分别为 0.08% 和 0.09% ,均小于 $1/2$ CAP TEa,与参比方法具有可比性。结论 不同方法对 HbA1c 的测定结果可能存在差异,CLSI EP9-A3 是评估这些差异的有效工具,用经 NGSP 样本赋值传递的新鲜全血对不可比的方法实施校准,可实现检验结果的可比性。

关键词:糖化血红蛋白;比对研究,方法学;标准化

中图分类号:R446

文献标志码:A

Comparable study on determination of glycosylated hemoglobin (HbA1c) with different methods

HU Hong-xia, ZHANG Xiu-ming, WEN Dong-mei, SUO Ming-huan, ZHANG De-cai, XU Sheng-nan, KAN Li-juan (Zhongshan Hospital of Sun Yat-Sen University, Zhongshan 528403, Guangdong, China)

Abstract: Objective To perform comparative analysis and bias estimation for the results of HbA1c determination from three different methods, i. e., ion-exchange high performance liquid chromatography (IE-HPLC), affinity chromatography high performance liquid chromatography (AC-HPLC) and high performance capillary electrophoresis (HPCE) and realize the comparability of results from different methods intra-laboratory. **Methods** IE-HPLC method which passed the certification of NGSP I grade laboratory was used as the reference method, and HPCE and AC-HPLC were used as candidate methods. The method comparison and bias evaluation were performed based on the American Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP9-A3 document. The accuracy and precision of the reference methods were validated before determination of samples. The incomparable candidate methods were calibrated by fresh blood samples which were obtained value assignment transferred by NGSP and the verification of comparability was performed after calibration. **Results** The tested results of ten NGSP samples with given value were all within $\pm 6\%$ of target value. For the two candidate methods the intraassay coefficient of variation was less than 1.5% and the interassay coefficient of variation was less than 2.0% . The bias of HPCE method at medical decision level were -0.06% and -0.07% , less than half of CAP TEa, which was comparable with reference method. The bias of AC-HPLC method was -0.31% and -0.31% , larger than half of CAP TEa, which was incomparable with reference method. After calibration of AC-HPLC method the bias of two fresh blood samples with different concentration which was transferred value assignment by NGSP sample was 0.08% and 0.09% , less than half of CAP TEa, which was comparable with reference method. **Conclusion** The results of HbA1c determined by different methods may be variable. CLSI EP9-A3 should be an effective tool to evaluate the difference. The calibration for incomparable method by fresh blood samples which were transferred value assignment could realize the comparability of the tested results.

Key words: HbA1c; comparison study; methodology; standardization

糖化血红蛋白(HbA1c)是评价糖尿病血糖控制水平的重要指标,并且与糖尿病慢性并发症的发生和发展密切相关。2010年,美国糖尿病协会(Amer-

ican Diabetes Association, ADA)^[1]首先提出将 HbA1c $\geq 6.5\%$ (48 mmol/mol)作为糖尿病的诊断指标,近年来已得到许多国家糖尿病学会、国际糖尿病

* 基金项目:广东省自然科学基金资助项目(2013B021800112);中山市医疗卫生重大专项(2015B1002)。

作者简介:胡红霞,1988年生,女,硕士研究生,主要从事临床化学研究。

通信作者:张秀明,主任技师,E-mail:zxm0760@163.com。

联盟(International Diabetes Federation, IDF)和 WHO 的认可^[2]。但我国仍沿用 1999 年 WHO 的诊断标准,原因是国内测定 HbA1c 的方法众多,不同方法间的测定结果缺乏可比性^[3]。本研究参考美国临床和实验室标准化协会(CLSI)最新发布的 EP9-A3^[4]文件,对国内最常用的 3 种 HbA1c 测定方法进行方法学比对和偏倚评估,并对不可比的方法通过用美国国家糖化血红蛋白标准化计划(National Glycohemoglobin Standardization Program, NGSP)定值样本赋值传递的新鲜全血校准实现检验结果可比性。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂 美国 BioRad 公司 Variant II 全自动糖化血红蛋白分析仪及其配套试剂、校准品、质控品, HbA1c 检测原理为离子交换高效液相色谱法(ion-exchange high performance liquid chromatography, IE-HPLC);美国 Primus Trinity Ultra2 全自动糖化血红蛋白分析仪及其配套试剂、校准品、质控品,方法原理为硼酸盐亲和层析法(affinity chromatography high performance liquid chromatography, AC-HPLC);法国 Sebia 毛细管电泳分析仪及其配套试剂、校准品、质控品,方法原理为高效毛细管电泳法(high performance capillary electrophoresis, HPCE)。

1.2 样本收集 按照 CLSI EP9-A3 文件^[4]要求收集 EDTA-K₂ 抗凝血液样本 40 份,其中在中山大学附属中山医院诊治的糖尿病患者 20 例,健康体检者 20 例, HbA1c 浓度在 3.9% ~ 14.4% 范围内均匀分布。另外选取 5 份我院不同浓度 HbA1c 样本进行实验方法的精密度评估。所有研究对象经血液常规检查和血红蛋白电泳证实均无贫血和异常血红蛋白区带,且未服用任何影响 HbA1c 测定的药物,无溶血和脂血。10 个 NGSP 定值样本均来源于美国 NGSP 实验室。

1.3 参比方法正确度评估 IE-HPLC 法测定 HbA1c 参加卫生与计划生育委员会临床检验中心和广东省临床检验中心组织的室间质评成绩合格,参加上海 HbA1c 一致性计划成绩合格,且已通过了 NGSP I 级实验室认证,分析性能良好,检测结果可溯源至 NGSP 的参考方法。因此,以 IE-HPLC 法为参比方法(X)。在进行方法学比对前,选取 10 个 NGSP 定值样本,每个样本各测定 1 次,以美国病理学家协会(CAP)2015 年能力验证允许误差(TEa)靶值的 $\pm 6\%$ 为判断标准^[5],10 个样本的测定误差

均在此允许误差范围内,参比方法正确度符合要求。

1.4 实验方法精密度评估 AC-HPLC 法(Y_1)和 HPCE 法(Y_2)为实验方法。在进行方法学比对前用 EP15-A2 文件^[6]进行精密度性能验证。选取 5 个不同浓度的样本,每个样本每天做一批,每批重复测定 3 次,连续 5 d,每个样本共获得 15 个数据,计算 \bar{x} 、 s 和 CV , CV 满足分析质量要求^[2]后进行比对。

1.5 样本检测 用配套的校准品校准仪器,质控在控后进行实验样本检测。按照 EP9-A3^[4]文件要求,每个样本用比较方法和实验方法各测定 1 次,每天 8 个样本,连续 5 d,共 40 份样本,每个方法获得 40 个有效数据,共 120 个实验数据。

1.6 数据处理 离群值检查:按照 EP9-A3 文件^[4]要求,采用 ESD(extreme studentized deviate)法对所得数据进行离群值的检查。计算出残差的绝对值(EDS_i)及临界值(λ_i),如果 $EDS_i > \lambda_i$,则该值为离群值,剔除后补充相应浓度再重新计算。离群值的上限不超过样本总量的 5%,本实验样本总量为 40,则离群值最多不能超过 2 个,如果多于 2 个,则需要扩大样本量,寻找出现偏差的原因。回归分析和偏倚评估:绘制散点图、偏倚图,根据数据特征选择合适的回归分析模型。用比较方法和实验方法的 HbA1c 结果计算出回归分析的相关系数(r),若 $r \geq 0.975$,则认为样本浓度范围合适,可以计算回归方程。将 HbA1c 医学决定水平(X_c)代入回归方程,计算实验方法和比较方法之间的相对偏倚(SE)。

1.7 临床可接受性判断 CAP 对 HbA1c 室间质评 TEa 为靶值 $\times (\pm 6\%)$ ^[5],以方法间相对偏倚 \leq 靶值 $\pm 1/2TEa$ 即 \leq 靶值 $\times (\pm 3\%)$,判断实验方法和比较方法间结果是否具有可比性。

1.8 用赋值的新鲜全血校准实验方法 对与参比方法不可比的实验方法,参照本课题组先前建立的方法^[7],用经 NGSP 样本赋值传递的两个浓度新鲜全血进行校准,校准后重新用 40 份样本进行可比性验证,实现实验方法和参比方法的可比性。

2 结果

2.1 参比方法的正确度评估 参比方法与美国 NGSP 参考实验室进行比对,40 个 HbA1c 浓度在 4.40% ~ 10.10% 范围内的样本,偏倚除 1 个样本为 -11.22% 外,其余 39 个样本在 -5.10% ~ 2.11% 之间,小于 NGSP 规定的 6%。在进行方法学比对前,选择经 NGSP 参考实验室定值的 10 个样本验证参比方法的正确度,结果见表 1。

表 1 参比方法正确度验证结果

NGSP 样本编号	靶值 (%)	参比方法结果 (%)	绝对偏倚 (%)	相对偏倚 (%)	是否可接受*
1	10.10	9.75	-0.35	-3.50	是
2	4.40	4.30	-0.10	-2.30	是
3	9.30	9.40	0.10	1.10	是
4	8.30	8.25	0.05	0.60	是
5	7.05	6.90	-0.05	-0.70	是
6	5.20	5.20	0.00	0.00	是
7	6.85	6.70	-0.15	-2.20	是
8	5.55	5.40	-0.15	-2.70	是
9	8.60	8.70	0.10	1.20	是
10	7.00	6.65	-0.35	-5.00	是

注: *, 以靶值 $\times (\pm 6\%)$ 为标准。

2.2 实验方法的精密度验证 两个实验方法的批内 CV 均小于 1.5%, 批间 CV 均小于 2.0%。精密度验证结果见表 2。

表 2 两个实验方法检测 HbA1c 的精密度验证结果

样本号	\bar{x} (%)	AC-HPLC 法 (%)		\bar{x} (%)	HPCE 法 (%)	
		CV _{批内}	CV _{批间}		CV _{批内}	CV _{批间}
1	5.2	0.60	1.02	5.3	0.73	0.89
2	6.1	0.75	0.83	5.8	1.02	0.99
3	7.3	0.73	0.71	6.3	0.93	1.05
4	9.2	0.57	0.82	8.8	1.31	1.78
5	11.4	0.46	0.61	10.3	0.62	1.16

2.3 离群值检验 HPCE 法 (Y_1) 与参比方法 (X) 未发现离群值, 可直接进行下一步的数据处理及分析。AC-HPLC 法 (Y_2) 与参比方法 (X) 检查出一个离群值, 将该离群值剔除后, 补充相应浓度数据后再次进行离群值检验, 未再出现离群值。

2.4 偏倚评估 绘制两种实验方法与参比方法的浓度偏倚图和百分偏倚图 (图 1)、浓度偏倚排序图和百分比偏倚排序图 (图 2)。根据散点图及方法间差值的变化特征, 数据具有恒定标准差 (s) 变化, 实验方法与参比方法间检测值相关, 方法间数据点差值变化相对一致, 故选择 OLR 回归模型进行回归方程拟合分析。两个实验方法与参比方法间的 r 均 > 0.975 , 提示所选样本浓度合适, 可通过相应的回归方程计算偏倚。回归方程分别为: $Y_1 = 1.006X - 0.1007$ 和 $Y_2 = 1.0079X + 0.2595$ 。美国病理学家协会 (CAP) 对 HbA1c 室间质评允许误差为靶值的 $\pm 6\%$, HbA1c 的医学决定水平为 5.7% 和 6.5%^[8], 经计算其允许偏倚为 $\pm 0.34\%$ 和 $\pm 0.39\%$ 。将医学决定水平 (X_c) 代入线性回归方程, 计算出预期偏倚 (Y), 结果见表 3。

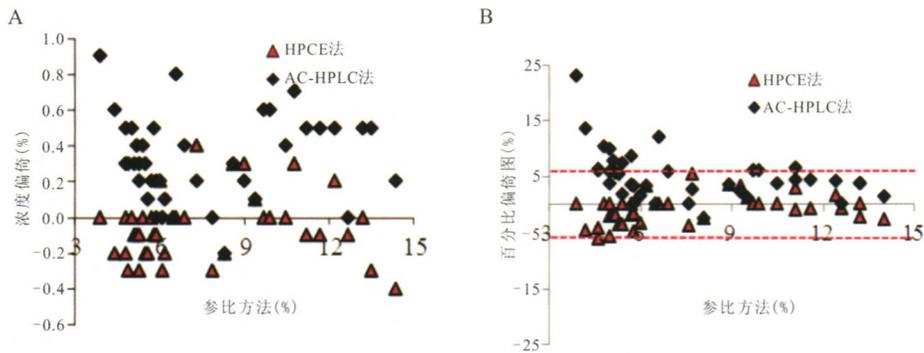


图 1 两种实验方法与参比方法的 HbA1c 浓度偏倚图 (A) 和百分比偏倚图 (B)

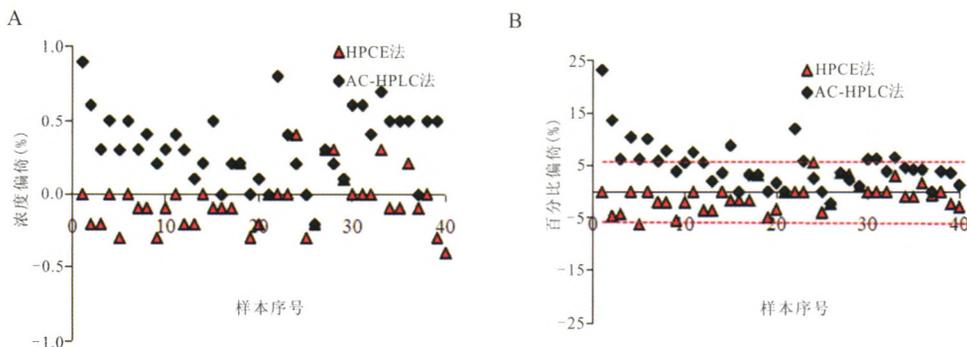


图 2 两种实验方法与参比方法的 HbA1c 浓度偏倚排序图 (A) 和百分比偏倚排序图 (B)

表 3 医学决定水平处偏倚的可接受性

实验方法	决定水平(X_c)	预期值(Y)	偏倚(%)	允许偏倚(%)	相对偏倚(%)	是否可接受
HPCE 法	5.7%	5.63	-0.07	± 0.171	1.23%	是
	6.5%	6.44	-0.06	± 0.195	0.92%	是
AC-HPLC 法	5.7%	6.01	0.31	± 0.171	5.44%	否
	6.5%	6.81	0.31	± 0.195	4.77%	否

2.5 用经 NGSP 样本赋值传递的新鲜全血校准实验方法 用经 NGSP 样本赋值传递的新鲜全血对 AC-HPLC 法进行校准后,用参比方法和 AC-HPLC 法重新检测 40 个新鲜全血样本,经检验后无离群值,相关系数 $r=0.9955$,两种方法检测结果高度相关,回归方程为 $Y_2 = 1.0242X - 0.0624$,将医学决定水平浓度(X_c)代入回归方程,计算预期值(Y),与

$1/2TEa$ 进行比较,判断偏倚的可接受性结果见表 4。以横坐标为参比方法结果,纵坐标 AC-HPLC 法结果绘制散点图(图 3A),以横坐标为参比方法结果,纵坐标 AC-HPLC 法与参比方法差值绘制偏倚图(图 3B),图 3 显示两种方法检测结果一致,且每一数据点均在 NGSP 规定的靶值的 $\pm 6\%$ 范围内。

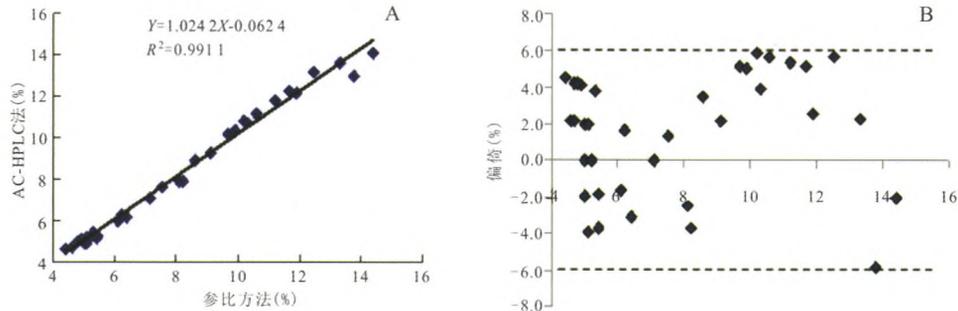


图 3 校准后 AC-HPLC 法与参比方法检测结果的散点图(A)和偏倚图(B)

表 4 校准后 AC-HPLC 法与参比方法偏倚的可接受性

医学决定水平(X_c)	预期值(Y)	偏倚(%)	允许偏倚(%)	是否可接受
5.7%	5.78	0.08	± 0.171	是
6.5%	6.59	0.09	± 0.195	是

3 讨论

本实验室用 IE-HPLC 法测定 HbA1c,自 2013 年开始参加 NGSP 的室间比对,并通过了糖化血红蛋白检测 I 级实验室认证,检测结果可溯源至糖尿病控制和并发症试验(DCCT)。本研究以此为参比方法,AC-HPLC 法、HPCE 法为实验方法,采用 CLSI 最新发布的 EP9-A3^[4] 文件进行方法学比对和偏倚评估,对与参比方法不可比的实验方法利用经 NGSP 样本赋值传递的新鲜全血实施校准,校准后进行可比性的验证,最终实现实验方法与参比方法检验结果的可比性。

在方法学比对前对参比方法的正确度进行了评估。选取 10 个定值 NGSP 样本,每个样本各测定 1 次,以 CAP 规定靶值的 $\pm 6\%$ 为判断标准^[5],验证参比方法的正确度。结果显示,10 个样本的测定误差均在此允许误差范围内,证实参比方法正确度符合要求。CLSI 推荐用 EP15-A2^[6] 或 EP15-A3^[9] 进行正

确度验证,它是用定值参考物质重复测定至少 10 次,计算 \bar{x} 和 s ,比较重复测量的 \bar{x} 与靶值之间是否有统计学差异。本研究参考 NGSP 候选实验室与参考实验室之间的比对方法和判断标准,10 个样本的单次测量结果均在靶值的 $\pm 6\%$ 内,证实参比方法正确度良好。

具有良好的精密度是方法学比对的前提。在方法学比对前采用 CLSI EP15-A2 文件^[6] 对实验方法的精密度进行了验证。Weykamp 等^[10] 根据临床研究结果制定的 HbA1c 测定分析质量目标日间 $CV < 2\%$ 。Barga 等^[11] 根据生物学变异数据推荐的日间 $CV < 2\%$ 。我国卫生行业标准规定的实验室内 CV 应不大于 3% ,并尽量控制在 2% 以内^[2]。本研究结果显示,AC-HPLC 法和 HP-CE 法的批内 CV 均小于 1.5% ,批间 CV 均小于 2.0% 。证实两个实验室方法的精密度均达到了上述要求,精密度性能良好,可以与参比方法进行比对试验。本研究采用 CLSI EP9-A3^[4] 文件进行方法学比对和偏倚评估。EP9-A3 与 EP9-A2 相比,在样本数量要求、离群值剔除方法、医学决定处水平偏倚计算、回归模型等方面均有较大改动。EP9-A3 文件对临床实验室标本数量要求最低为 40,标本随机单次测定即可;离群值

剔除方法采用的是 ESD 法,该方法直接以残差为对象进行分析,剔除离群值,更为直观和有效。EP9-A3 提供了 OLR、WLS、Deming、Passing-Baklok 等多种回归模型,它们的适用性各不相同,具体选择哪种回归模型最为适宜,则需要根据数据特征、相关性、偏倚等综合判断^[4,12]。本研究选择 20 例健康人和 20 例糖尿病患者共 40 份样本进行比对,符合文件要求。AC-HPLC 法与参比方法检查出一个离群值,将该离群值剔除后,补充相应浓度数据后再次进行离群值检验,未再出现离群值。两个实验方法与参比方法间的 $r > 0.975$,提示所选样本浓度合适。根据散点图及方法间差值的变化特征,数据具有恒定 s 变化,实验方法与参比方法间检测值有显著相关性,方法间数据点差值变化相对一致,故选择 OLR 回归模型进行回归方程拟合分析。

CLSI EP9-A3 文件^[4]以医学决定水平处的偏倚来判断实验方法和参比方法偏倚的可接受性。Weykamp 等^[10]依据临床研究结果制定的分析质量目标为 6.7%,偏倚 3.4%;Barga 等^[13]依据生物学变异制定的质量目标偏倚不大于 2.8%。本研究以 CAP 能力验证试验 2015 年的允许总误差靶值的 $\pm 6\%$ 为标准设定质量目标^[5]。HbA1c 有 5.7% 和 6.5% 两个医学决定水平,以靶值的 $\pm 6\%$ 的 1/2 为标准,医学决定水平 5.7% 和 6.5% 处的允许偏倚分别为 $\pm 0.171\%$ 和 $\pm 0.195\%$ 。本研究结果显示,HPCE 法在医学决定水平处与参比方法的偏倚分别为 -0.06% 和 -0.07% ,小于 1/2 CAP TEa,与参比方法具有可比性;AC-HPLC 法在医学决定水平处与参比方法的偏倚分别为 -0.31% 和 -0.31% ,均大于 1/2 CAP TEa,与参比方法不可比,需采取纠正措施实现 AC-HPLC 法与参比方法的可比性。

对与参比方法不可比的实验方法,参照本课题组先前建立的方法^[7],用经 NGSP 样本赋值传递的两个浓度新鲜全血校准 AC-HPLC 法,校准后重新用 40 份样本进行可比性验证。结果显示,校准后在医学决定水平处与参比方法的偏倚分别为 0.08% 和 0.09%,均小于 1/2 CAP TEa,与参比方法具有可比性,并且其检测结果可溯源至 DCCT。

总之,CLSI EP9-A3 是实验室内部方法学比对

的实用工具。选择具有溯源性的参比方法、评估实验方法精密度并达到规定要求、评估实验方法与参比方法的偏倚、对不具可比性的方法采用经 NGSP 样本赋值传递的新鲜全血实施校准是实现同一实验室 HbA1c 测定结果可比性的有效途径,也值得区域性糖化血红蛋白一致性计划参考。

4 参考文献

- [1] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes 2015: Summary of revisions[J]. Diabetes Care, 2015, 38(Suppl 1): S8-S16.
- [2] 王冬环,陈文祥,张传室,等.糖化血红蛋白实验室检测指南[J]. 中国糖尿病杂志,2013,21:673-678.
- [3] 张秀明,阚丽娟.影响糖化血红蛋白测定的因素及实验室检测注意事项[J]. 中华检验医学杂志,2014,37(12):893-895.
- [4] EP9-A3. Measurement procedure comparison and bias estimation using patient samples; Approved guideline-third edition[S]. CLSI, 2013.
- [5] Little R. Committee college of American pathologists(CAP)GH5 survey data: (updated 8/15) [EB/OL]. <http://www.ngsp.org/CAP/CAP15b.pdf>
- [6] EP15-A2 User demonstration of performance for precision and accuracy; Approved guideline-second edition[S]. CLSI, 2004.
- [7] 温冬梅,张秀明,吴剑杨,等.新鲜全血赋值传递实现不同 HbA1c 检测系统测定结果的溯源性和可比性[J]. 临床检验杂志,2014,32(10):790-792.
- [8] Badiou S, Guillot J, Kuster N, et al. Comparison of Arkray/ELITech ADAMS HA-8180V with Bio-Rad Variant, II2.0 and Tosoh Bioscience HLC-723G8 for HbA1c determination[J]. J Clin Lab Anal, 2014, 28(6):428-434.
- [9] EP15-A3. User verification of precision and estimation of bias; approved guideline-third edition[S]. CLSI, 2014.
- [10] Weykamp CW, Mosca A, Gillery P, et al. The analytical goals for hemoglobin A(1c) measurement in IFCC units and National Glycohemoglobin Standardization Program Units are different [J]. Clin Chem, 2011, 57(8):1204-1206.
- [11] Braga F, Panteghini M. Standardization and analytical goals for glycosylated hemoglobin measurement[J]. Clin Chem Lab Med, 2013, 51(9):1719-1726.
- [12] 徐建华,刘冬冬,戴永辉,等. CLSI EP9-A3 在临床生化方法学比对中的应用[J]. 中华检验医学杂志,2015, 95(12):346-348.

(收稿日期:2015-12-15)

(本文编辑:王海燕)