

of acute congenital and acquired Toxoplasma infection[J]. J Clin Microbiol, 1981, 14(5): 486-491.

(收稿日期: 2011-08-28)

• 检验技术与方法 •

免疫凝集法检测糖化血红蛋白的应用评价

吴晓虹, 沈雄文

(中国人民解放军南京军区杭州疗养院检验科, 杭州 310007)

摘要:目的 了解免疫凝集法检测糖化血红蛋白试剂盒测定结果的准确性、可靠性, 并对其方法进行方法学评价, 为临床在分析不同方法检测糖化血红蛋白结果时提供参考。方法 参照美国临床实验室标准化委员会的方法学评价方案, 与美国 BIO-RAD VARIANT II 糖化血红蛋白分析仪检测 HbA1c(%) 的结果进行对比, 同时监测放置时间对其结果的影响。结果 免疫凝集法线性良好, 稀释变异可接受, 线性范围为 0~5.2 g/L, 最低可检出限为 0.074 g/L。日间 CV=4.33%, 批内 CV=3.02%, 批间 CV=3.39%, 总 CV=4.51%。血浆中高浓度胆红素、三酰甘油和尿素干扰 HbA1c 的检测。全血标本 4℃ 条件下放置 2 周后结果稳定; 溶血标本 4℃ 条件下放置 6 个月结果稳定。结论 免疫凝集法检测 HbA1c 的线性范围、稀释变异均符合临床检测要求, 最低可检出限为 0.074 g/L, 不精密度小于 5%。与美国 BIO-RAD VARIANT II 糖化血红蛋白分析仪检测结果比较, 差异无统计学意义。可采用在 4℃ 保存的溶血标本作为室内质控品。

关键词: 质量控制; 糖化血红蛋白; 免疫凝集法; 方法比对

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.19.034

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)19-2240-02

糖尿病是一种全球性疾病, 在很多国家和地区的患者数逐年递增, 预计到 2025 年全世界糖尿病患者将达 3 亿人^[1-2]。糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin, HbA1c)检测可反映机体 1~2 个月前的平均血糖水平, 故在糖尿病的监测、治疗方面具有重要意义, 有助于从整体上准确地观察病情, 了解治疗效果, 受到普遍重视^[3]。HbA1c 的测定方法有手工微柱法、金标法、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)和免疫凝集法等。本组采用北京利德曼公司的糖化血红蛋白测定试剂盒检测 HbA1c, 了解该试剂盒测定结果的准确性、可靠性, 并对其方法进行方法学评价, 旨在为临床分析不同方法检测 HbA1c 提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 健康对照组 经该院体检的无高血压、糖尿病、高脂血症、贫血等疾病的健康者, 男 20 例, 平均年龄 33.8 岁; 女 20 例, 平均年龄 31.2 岁。采集空腹和餐后半小时静脉血, EDTA-K₂ 抗凝, 密闭室温保存。

1.1.2 病理组 2 型糖尿病患者 57 例, 采集空腹静脉血, EDTA-K₂ 抗凝, 密闭室温保存, 4 h 内完成检测。

1.1.3 高胆红素血清 收集黄疸患者及新生儿黄疸患者血清, 混合后检测总胆红素及直接胆红素, 共 4 次, 取均值。

1.1.4 高三酰甘油血清 收集高脂血症患者血清, 混合后检测总胆红素及直接胆红素, 共 4 次, 取均值。

1.2 仪器与试剂 美国 Abbott 公司 AEROSSET 全自动生化分析仪; 美国 BIO-RAD VARIANT II 糖化血红蛋白分析仪。北京利德曼公司提供的免疫凝集法 HbA1c 试剂盒(批号: 70711G211), 包括溶血剂、血红蛋白测定试剂及 HbA1c 测定试剂; 校准液(批号: 3670506); 美国 BIO-RAD VARIANT II 糖化血红蛋白分析仪配套试剂; 离子交换柱(批号: EA51800); 缓冲液 A(批号: AA70648), 缓冲液 B(批号: AA70497), 清洗液(批号: AA70650); 校准品(批号: BB62636); 全血底物(批号: AA70003)。

1.3 方法

1.3.1 HbA1c 测定 严格按照仪器、试剂说明及相关实验室技

术操作规程进行检测。标准曲线制作根据 AEROSSET 全自动生化分析仪说明书设定相关检测参数, 根据所得浓度与吸光度制作拟合曲线, 并作系列浓度校验。

1.3.2 方法学评价 参照杨昌国等^[4-5]关于美国临床实验室标准化委员会评价方案进行方法学评价。

1.3.2.1 线性评价 用溶血剂稀释 15.4 g/L 标准液, 制成 5 个不同浓度的标本随机排列, 每个标本测定 4 次, 分析在当天完成, 进行线性回归分析。

1.3.2.2 稀释变异试验 取病理组混合全血标本, 加入不同体积的溶血剂, 得到 20 份不同浓度的稀释样品, 检测结果进行统计学分析。

1.3.2.2 精密密度 取健康对照组混合全血标本, 和病理组混合全血标本各 1 份, 两份标本每天测定 2 次(2 次测定间隔大于 2 h), 每次测定做作双份, 共测定 20 d。每次测定做 1 个质控。

1.3.2.3 灵敏度 将健康对照组混合全血标本用溶血剂倍比稀释作为待检标本, 用溶血剂作为空白, 所测吸光度能区别于蒸馏水的最低 HbA1c 浓度为该法的最低灵敏度。

1.3.2.4 干扰试验 在两份健康对照组混合全血标本中分别加入混合高胆红素血清、混合高三酰甘油血清和混合高尿素血清, 另一份中加入等体积的蒸馏水, 按比例混合成 5 个不同干扰物浓度, 每份标本重复测定 4 次, 计算分析干扰。

1.3.2.5 对比试验 健康对照组 40 份标本及 2 型糖尿病患者 57 份全血标本分别在 AEROSSET 全自动生化分析仪和 BIO-RAD VARIANT II 糖化血红蛋白分析仪上检测 HbA1c。

1.3.2.6 标本放置时间对结果的影响^[6] 混合全血标本及溶血后标本在密闭 4℃ 放置 1 d、2 d、4 d、1 周、2 周、1 月和 6 月后分别检测 4 次, 取均值, 分析时间因素对结果的影响。

1.5 统计学处理 对重复性验证结果进行中位数、95% 可信区间分析, 对方法学比较结果进行配对资料 *t* 检验, 采用 SPSS 10.0 for Windows 统计软件包进行辅助分析。

2 结果

2.1 糖化血红蛋白检测标准曲线 见图 1。

2.1.2 HbA1c 浓度检测 采用两点定标方式。

2.2 线性评价

2.2.1 线性回归分析 $Y=1.0172X+0.0283, r^2=0.991, F<0.01$ 。

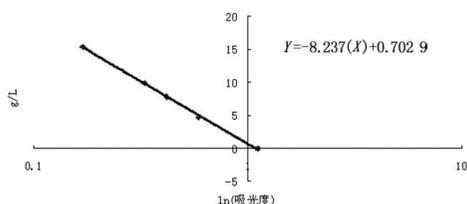


图 1 HbA1c 检测标准曲线

2.2.2 稀释变异试验 $t=0.033, P=0.974$, 稀释变异可接受。

2.2.3 线性失拟检查 $G=2.75$, 界限值 $F_{0.05}=3.29; F_{0.01}=5.42$; G 值小于 $F_{0.05}$ 说明线性良好。线性范围为 $0\sim5.2\text{ g/L}$ 。

2.3 精密度评价 日间 $CV=4.33\%$, 批内 $CV=3.02\%$, 批间 $CV=3.39\%$, 总 $CV=4.51\%$ 。

2.4 以溶血剂作为标本 检测 20 次, 吸光度 95% 可信区间为 $1.0174\sim1.0282$, 能区别于全血标本的最低 HbA1c 浓度为最低可检出限度 (0.074 g/L)。

2.5 干扰试验评价 胆红素对本试验无影响浓度为 $53.5\text{ }\mu\text{mol/L}$ (95% 可信区间: $52.7\sim54.3\text{ }\mu\text{mol/L}$)。三酰甘油浓度为 9.70 mmol/L (95% 可信区间: $9.27\sim10.12\text{ mmol/L}$)。尿素浓度为 15.2 mmol/L (95% 可信区间: $14.9\sim15.5\text{ mmol/L}$)。

2.6 对比试验 健康对照组 40 份标本及 2 型糖尿病患者 57 份全血标本分别在 AEROSSET 全自动生化分析仪和 BIO-RAD VARIANT II 糖化血红蛋白分析仪上检测 HbA1c (%)。见表 1。

表 1 2 种方法检测健康对照组及病理组 HbA1c 结果比较 ($\bar{x}\pm s, \text{Hb}$)

组别	免疫法	色谱法	t 值 (P)
健康对照组 (40)	4.51 ± 0.83	4.65 ± 0.77	$0.705(0.485)$
病理组 (57)	9.22 ± 3.74	9.04 ± 3.45	$0.211(0.834)$

2.7 时间因素对结果的影响 全血标本 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下放置 2 周后结果稳定; 溶血标本 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下放置 6 个月结果稳定。见表 2。

表 2 全血标本及溶血后标本在密闭 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下放置时间对结果的影响 (% , Hb)

标本	2 h	1 d	2 d	4 d	1 周	2 周	1 月	6 月	SD^Δ	SCL^\blacktriangle
全血	6.58	6.44	6.68	6.62	6.12	6.05	5.78*	5.34	0.22	7.20~5.96
溶血		6.52	6.59	6.35	6.75	6.28	6.54	6.61		

*: 1 个月后全血标本检测结果低于均值 -2.8 SD ; Δ : 全血标本检测结果 ($n=20$) 的标准差; \blacktriangle : 全血标本检测结果 ($n=20$) 的均值 $\pm 2.8\text{ SD}$ 。

3 讨 论

美国糖尿病协会 (ADA) 和欧洲糖尿病研究协会在 2008 年的联合声明中提出, HbA1c $<7\%$ 为糖尿病治疗的目标浓度^[7]。因此, 对于 HbA1c 的检测, 要求浓度在 7% 左右时的检测结果尽可能准确, 以满足临床对糖尿病诊断和监控的需要。另外, 方便、快速和廉价的临床检测方法也可为需要检测

HbA1c 的患者提供必要的服务, 通过对免疫凝集法检测 HbA1c 进行方法学评价, 判断该方法是否能满足临床需要。

免疫凝集法利用 HbA1c 抗体与凝集素结合, 使溶液中吸光度升高, 标本中的 HbA1c 与凝集素竞争 HbA1c 抗体的结合位点, 降低 HbA1c 抗体与凝集素结合速率, 凝集反应在 700 nm 造成的吸光度升高与 HbA1c 的浓度成反比。总血红蛋白检测利用血红蛋白在非离子变性剂作用下生成羟高铁血红素, 在 600 nm 波长吸光度升高与总血红蛋白浓度成正比。该方法可以在全自动生化分析仪上检测, 简便快捷。

本组结果显示, 免疫凝集法检测 HbA1c 的线性范围、稀释变异均符合临床检测要求, 最低可检出限为 0.074 g/L , 不精密度小于 5% 。与美国 BIO-RAD VARIANT II 糖化血红蛋白分析仪检测结果比较, 差异无统计学意义。但该方法受血浆中胆红素 ($52.7\text{ }\mu\text{mol/L}$)、三酰甘油 (9.27 mmol/L) 和尿素 (14.85 mmol/L) 的干扰。

时间因素对 HbA1c 结果的影响: 全血标本在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 放置 2 周结果未见明显改变, 溶血后标本在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 放置 6 个月结果也未见明显改变。因此, 作者认为溶血后标本更适合长时间保存, 作为室内质量控制的一种辅助标本, 能帮助实验室实现长期的质量稳定, 特别是对糖化血红蛋白在 $6\%\sim7\%$ 的标本, 能有一个较为稳定的结果, 将有助于临床和患者对疗效的评估及进一步治疗。

血浆中的干扰物是影响免疫凝集法检测 HbA1c 的重要因素, 如何确定干扰物并排除其影响, 是保证结果准确的关键。对糖尿病的诊断和监控, 本方法快速、简便, 较少受方法学以外的因素影响, 并可通过对标准品浓度的调整, 使得在 7% 左右的 HbA1c 更为准确可靠, 有利于对患者的血糖控制情况进行监控, 是一种比较适合于临床的检测方法。

参考文献

- [1] Zimmet P, Mc Carty D. The NIDDM epidemic: global estimates and projection; a look into the crystal ball[J]. IDF Bulletin, 1995, 40(8): 8-16.
- [2] King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projection[J]. Diabetes Care, 1998, 21(12): 1414-1431.
- [3] David B, Sacks G, David E, et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus[J]. Clinical Chemistry, 2002, 48(3): 436-472.
- [4] 杨昌国, 许叶, 周志, 等. 线性评价和干扰试验中 NCCLS 评价方案的应用[J]. 临床检验杂志, 1999, 17(3): 184-186.
- [5] 杨昌国, 许叶, 周民, 等. 精密度评价和方法比较中 NCCLS 评价方案的应用[J]. 临床检验杂志, 1999, 17(1): 47-49.
- [6] Passey RB. Quality control for the clinical chemistry laboratory [J]. Cvmosby Company, 1996, 28(3): 385-391.
- [7] David M, Nathan, Rury R, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy[J]. Diabetes Care, 2008, 31(3): 173-175.

(收稿日期: 2011-06-20)