

• 论 著 •

免疫比浊法与阳离子交换层析法检测糖化血红蛋白结果的对比分析

唐漫乔

作者单位: 515834 广东汕头, 汕头市澄海区莲下中心医院检验科

通信作者: 唐漫乔, Email: woodyou@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2019.03.013

【摘要】 目的 对比分析免疫比浊法 (TIIA) 和阳离子交换层析法 (IEC) 对全血糖化血红蛋白 (HbA1c) 的检测价值。**方法** 选择 2018 年 1 月—2019 年 2 月汕头市澄海区莲下中心医院收治的 168 例 2 型糖尿病 (T2DM) 患者作为研究对象, 分别采用 TIIA 法和 IEC 法检测 HbA1c 水平。设 Y 为 IEC 法所测 HbA1c 浓度水平, X 为 TIIA 法所测 HbA1c 浓度水平, 绘制回归方程曲线, 比较两种检测方法的精密度试验、线性相关分析和回收试验结果。**结果** HbA1c 精密度检测和回收试验中, IEC 法的平均回收率 (96.99%)、批内变异系数 ($CV_{\text{批内}}$, 3.43%) 和批间变异系数 ($CV_{\text{批间}}$, 4.19%) 均明显优于 TIIA 法 (分别为 92.86%、9.67%、10.67%, 均 $P < 0.05$)。相关性分析显示, IEC 法 (Y) 和 TIIA 法 (X) 的相关性分析回归方程为 $Y = 0.97X + 1.23$, $R^2 = 0.991$ 。**结论** 从方法学角度分析, IEC 法检测全血 HbA1c 的精密度优于 TIIA 法, 且与 TIIA 法的相关性较好, 同时 IEC 法可动态观察 T2DM 疗效和监测病情, 具有准确率高、快速简便的特点, 适合临床推广使用。

【关键词】 免疫比浊法; 阳离子交换层析法; 糖化血红蛋白; 2 型糖尿病

Comparative analyses of immunoturbidimetric assay and cation exchange chromatography for detection of glycosylated hemoglobin

Tang Manqiao. Department of Clinical Laboratory, Lianxia Central Hospital of Chenghai District, Shantou 515834, Guangdong, China

Corresponding author: Tang Manqiao, Email: woodyou@163.com

【Abstract】 Objective To compare and analyze the detection values of immunoturbidimetric (TIIA) assay and cation exchange chromatography (IEC) for the detection of total glycosylated hemoglobin (HbA1c). **Methods** A total of 168 patients with type II diabetes (T2DM) admitted to Lianxia Central Hospital in Chenghai District, Shantou City from January 2018 to February 2019 were selected as the research subjects, and their HbA1c levels were detected using TIIA method and IEC method respectively. The Y and X were assigned to be the HbA1c concentration levels measured by IEC and TIIA methods respectively, the regression equation curve was drawn, and the results of precision test, linear correlation analysis and recovery test of the two methods were compared. **Results** In the tests of HbA1c precision degree and recovery rate, the average recovery rate (96.99%), variable coefficient (CV) within batch (3.43%) and the CV among batches (4.19%) of the IEC method were significantly superior to those in the TIIA method (respectively 92.86%, 9.67% and 10.67%, all $P < 0.05$). The correlation analysis indicated that the regression equation of IEC method (Y) and TIIA method (X) was as follows: $Y = 0.97X + 1.23$, $R^2 = 0.991$. **Conclusion** From the methodological analysis point of view, using the IEC method to detect the precision degree of HbA1c in the whole blood is superior to that of TIIA method, and the correlation between IEC and TIIA method is relatively good. At the same time, the IEC method can dynamically observe the therapeutic effect and monitor the disease conditions of the patients with T2DM, thus IEC possesses the high accuracy rate, fast and simple characteristics, which is suitable for its wide application in clinics.

【Key words】 Immunoturbidimetry; Cation exchange chromatography; Glycosylated hemoglobin; Type II diabetes

2 型糖尿病 (type II diabetes mellitus, T2DM) 属于多病因代谢疾病, 主要是由胰岛素缺乏或抵抗引起的代谢紊乱综合征, 且具有遗传倾向^[1]。糖化血红蛋白 (glycated hemoglobin A1c, HbA1c) 是血液中血红蛋白 (hemoglobin, Hb) 与血糖 (blood glucose, Glu) 进行非酶结合的产物, 是 T2DM 患者疗效与预后评估的重要指标之一^[2]。HbA1c 浓度不受葡萄糖每日波动的影响, 主要反映 T2DM 患者过去 6~8 周的 Glu 浓度水平^[3]。随着医学生物科技的发展, HbA1c 临床实验室检测方法越来越多, 各实验室因所使用的仪器及配套试剂不同, 每种检测方法各有利弊, 对同一份标本在同一时间内测定的 HbA1c 浓度也存在较大差异^[4-5]。本研究采用免疫比浊法 (turbidimetric inhibition immuno assay, TIIA) 和阳离子交换层析法 (ion-exchange chromatography, IEC) 检测 HbA1c, 分析两种检测方法的性能, 评价 TIIA 法和 IEC 法检测 HbA1c 的应用价值, 以期提高 HbA1c 检测的准确性。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选取 2018 年 1 月—2019 年 2 月本院门诊接收的 T2DM 患者作为研究对象。

1.1.1 纳入标准 诊断均符合 2014 年美国糖尿病学会糖尿病医学诊治标准^[4]: ① 空腹血糖 (fasting blood glucose, FPG) ≥ 7.0 mmol/L; ② 口服葡萄糖耐量试验 (oral glucose tolerance test, OGTT) 2 h Glu ≥ 11.1 mmol/L。

1.1.2 排除标准 ① 合并酮症; ② 合并感染; ③ 合并酸碱失衡; ④ 合并电解质平衡紊乱; ⑤ 存在肾脏疾病或心脏病等器质性疾病。

1.1.3 伦理学 本研究符合医学伦理学标准, 并经医院伦理委员会批准 (审批号: S2019-XX-029-01), 对患者采取的治疗和检测得到过患者或家属的知情同意。

1.2 仪器与试剂 IEC 法使用 KH-101 型 HbA1c 全自动检测仪, 仪器、试剂盒和校准品均由深圳市凯特 (Caretim) 有限公司提供; TIIA 法使用日立 7020 型全自动生化分析仪, 仪器、试剂盒和校准品均由日本株式会社日立制作所提供; 上述检测详细操作步骤均按说明书操作。HbA1c 5.0%、15.0% 质控品由上海信帆有限公司提供 (生产批号: 181226)。

1.3 检测方法 采集所有受检者的空腹肘静脉血 10 mL, 使用乙二胺四乙酸二钾 (Ethylenediaminetetraacetic acid K₂, EDTA-K₂) 抗凝, 剔除明显溶血或脂血标本, 置于超低温 -86 卧式医用冰箱 (浙江爱雪 Iceshare 制冷电器有限公司提供) 于 -20 ℃ 备用。

1.3.1 IEC 法 采用 IEC 法定量检测 HbA1c 浓度, 其基质由带电荷的树脂或纤维素组成, 带正电荷的称为阴离子交换树脂, 而带负电荷的称为阳离子树脂。当蛋白质都处于不同等电点的 pH 条件下, 蛋白质所带电子情况均不同。带阴离子电荷的蛋白质能与阴离子交换基质结合, 因此这类蛋白质被留在柱子上, 接着通过改变洗脱液的 pH 或盐离子强度等措施, 将吸附在离子交换柱上的带阴离子电荷的蛋白质洗脱下来, 按结合由弱到强的顺序将相关蛋白质依次洗脱下来。反之阳离子交换基质结合带正电荷的蛋白质, 通过改变洗脱液的 pH 或盐离子强度将结合的带阳离子电荷的蛋白质洗脱下来, 并根据标准曲线计算待测蛋白质的浓度^[6]。

1.3.2 TIIA 法 利用抗原抗体结合动态定量检测 HbA1c 浓度, 当合适比例浓度的抗体与抗原在特殊稀释系统中反应时, 在稀释系统促聚剂的作用下, 可溶性免疫复合物自液相析出形成微小颗粒, 使反应液出现浊度。当抗体浓度固定在一定范围之内时, 形成的免疫复合物量随检样中抗原浓度的增加而增加, 反应液分光光度也随之增加, 并根据标准曲线计算待测抗原浓度^[7]。

1.4 精密度试验 从所有 T2DM 患者中随机抽取 30 份患者血液标本混合为 1 份 (HbA1c 浓度为 11.52%), 分别采用 IEC 法和 TIIA 法同时连续检测 20 d, 2 次 /d, 计算批内变异系数 ($CV_{\text{批内}}$) 与批间变异系数 ($CV_{\text{批间}}$)。

1.5 线性相关分析 分别采用 IEC 法和 TIIA 法对所有 T2DM 患者标本进行检测, 并对 HbA1c 检测结果进行直线函数回归统计。设 Y 为 IEC 法所测 HbA1c 浓度水平, X 为 TIIA 法所测 HbA1c 浓度水平。

1.6 回收试验 从所有 T2DM 患者中随机抽取 9 份不同浓度血液标本, HbA1c 浓度分别为 20.14%、17.91%、15.61%、14.63%、11.52%、10.24%、9.29%、8.56% 和 5.64%, 分别采用 IEC 法和 TIIA 法检测回收率, 每个浓度血液标本检测 20 次。

1.7 相关保养维护和校准 连续观察两台仪器运行状态 1 周, 确保两台仪器运行稳定且状态良好。培训相关操作者, 操作者在熟悉仪器操作和各项实验步骤后进行各项相关性能评价, 每次操作均带有 HbA1c 的标准品及 HbA1c 的质控物检测。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 t 检验。按照美国临床和实验室标准协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) EP15-A 文件要求^[8],两种检测方法在进行线性相关分析时,直线函数回归统计方法采用 Linear Regression 线性回归,计算回归方程为 $Y=aX+b$,相关性分析采用 Pearson 相关性检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者一般资料 共纳入 168 例 T2DM 患者。其中男性 84 例,女性 84 例;年龄 32~74 岁,平均 (47.8 ± 8.9) 岁。所有患者的性别、年龄等一般资料比较差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$),具有可比性。

2.2 精密度试验 IEC 法在同一批次检测中的 $CV_{\text{批内}}$ 和 $CV_{\text{批间}}$ 均明显优于 THIA 法 (均 $P<0.05$)。见表 1。

表 1 两种方法检测 HbA1c 的 $CV_{\text{批内}}$ 与 $CV_{\text{批间}}$ 比较

检测方法	检测次数 (次)	$CV_{\text{批内}} (\%)$	$CV_{\text{批间}} (\%)$
IEC 法	40	3.43	4.19
THIA 法	40	9.67 ^a	10.67 ^a

注:与 IEC 法比较,^a $P<0.05$

2.3 线性相关分析 IEC 法测得的 HbA1c 浓度水平与 THIA 法存在一元回归直线方程关系,THIA 法 (X) 与 IEC 法 (Y) 存在较好的正相关直线性回归关系。相关性分析回归方程为 $Y=0.97X+1.23Y$,相关系数 $R^2=0.991$ 。见图 1。

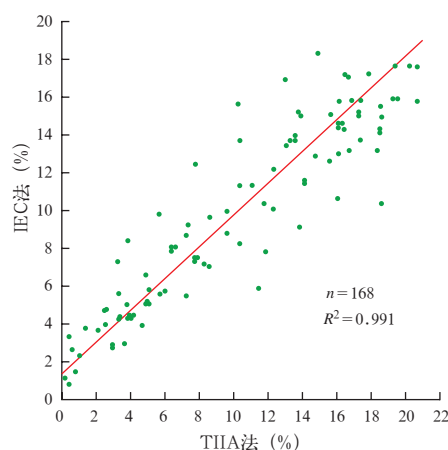


图 1 IEC 法与 THIA 法检测 HbA1c 浓度的回归方程曲线

2.4 回收率试验 IEC 法的平均回收率明显优于 THIA 法 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 两种检测方法的回收率试验结果比较

全血标本 浓度 (%)	测定值 (%)		回收率 (%)	
	THIA 法	IEC 法	THIA 法	IEC 法
20.14	18.63	19.65	92.50	97.57
17.91	16.54	17.24	92.35	96.26
15.61	14.45	15.01	92.57	96.16
14.63	13.95	14.52	95.35	99.25
11.52	10.24	11.02	88.89	95.66
10.24	9.46	10.01	92.38	97.75
9.29	8.56	9.01	92.14	96.99
8.56	8.12	8.32	94.86	97.20
5.64	5.34	5.42	94.68	96.10
平均值			92.86	96.99 ^a

注:与 THIA 法平均值比较,^a $P<0.05$

3 讨论

T2DM 是一种常见慢性疾病,因病程较长,且大多数患者 Glu 控制不太理想,常处于较高水平,容易导致人体代谢功能紊乱^[9],诱发靶器官 (包括心脑血管、视网膜、神经纤维和肾脏) 并发症及功能障碍等,严重影响患者身心健康和生活质量^[10]。HbA1c 是 Glu 与 Hb 结合所形成的产物,HbA1c 合成速度与 Glu 浓度呈正比,不受血糖暂时性升高的影响,不需要空腹,具有不可逆性、无需特定时间段抽取静脉血和分析前不稳定等特点,可真实有效地反映 T2DM 患者一段时间内 (前 120 d) Glu 控制情况,且不易受药物、情绪、应激、运动和饮食等因素的影响^[11]。虽然临床上检测 HbA1c 的敏感性和特异性较好,但各生产厂商 HbA1c 试剂盒质量参差不齐,操作方法各异,使不同厂商在检测 HbA1c 时存在重复性差、准确度不高等情况,导致 HbA1c 的检测结果出现较大误差,有时甚至容易误诊。为提高 T2DM 患者 HbA1c 的检测敏感性和特异性,近几年临床检验工作者都在尝试寻找敏感性和特异性更高、操作方式更便捷的 HbA1c 检测方法。

本研究结果表明,IEC 法的批内和批间精密度、平均回收率均优于 THIA 法。IEC 法和 THIA 法具有可比性和较好的相关性。IEC 法经典的离子交换原理是利用各种蛋白质分子在所设计检测条件下携带电荷类型及电荷量不同,与离子交换剂结合的强度不同,可用不同检测条件 (离子强度、温度、pH 值) 洗脱出不同蛋白质组分的一种层析法。IEC 法使用 KH-101 型全自动 HbA1c 分析仪,采用梯度洗脱组合技术,二元洗脱液无级连续变化,实现 HbA1c 与 HbA1ab 和 HbA0 的完全分离。该仪器自动化程度较高,仅需将抗凝全血置于仪器标本架上,无需手工干预,即可自动溶化细胞,混匀标本、适当

稀释标本进行自动化检测,使用指数模式的高斯对数(Gaussian logarithm, EMG),结合微积分拟合计算出分析结果和分析图谱,根据标准曲线直接换算出 HbA1c 检测结果,全程计算机控制全自动化完成,消除人为不熟练因素的影响^[12]。TIIA 法使用单克隆或多克隆抗体直接测定 Hb β 链糖基化 N 末端的 4~8 个氨基酸,溶血剂中使用十四烷基三甲基溴化铵为洗涤剂,因 TIIA 法标本需要预处理,手工溶血及稀释后才能使用日立 7020 型全自动生化分析仪进行检测,由于 TIIA 法反应中难免出现“HOOK”现象,即在进行抗原与抗体的标本测定时,待测标本中的抗原物质 HbA1c 浓度升高至检测限值的高浓度范围,其测定的吸光度(A)值随抗原物质 HbA1c 浓度升高而开始下降,容易造成漏检,必须将待测标本重新稀释至检测上限浓度,才可以准确检测出抗原物质 HbA1c 浓度结果。TIIA 法受操作者因素影响大,操作繁琐且受 HbA1c 浓度范围、溶血、脂血和黄疸等标本因素影响, HbA1c 检测结果存在重复性差、准确度不高的情况^[13]。

综上所述,从方法学角度分析,IEC 法检测全血 HbA1c 精密度优于 TIIA 法,且与 TIIA 法相关性较好,同时 IEC 法可动态观察 T2DM 疗效和监测病情,具有准确率高、快速简便的特点,适合临床推广使用。

参考文献

- 戴平,梅燕萍.糖化血红蛋白和血脂检测在老年 2 型糖尿病患者病情监控中的临床意义[J].医学理论与实践,2016, 29(4): 511-512.
- 黄敬泽,王健.2 型糖尿病糖化血红蛋白与全天不同时间血糖水平的关系[J].中国综合临床,2006, 22(12): 1101-1103. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1008-6315.2006.12.019.
- 陈爱莲,马小宏.胶乳凝集法检测糖化血红蛋白[J].国际检验医学杂志,2015, 36(19): 2882-2883. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.19.046.
- 邓子玄,周健,贾伟平.2014 年美国糖尿病学会糖尿病医学诊治标准更新内容解读[J/CD].中国医学前沿杂志(电子版),2014, 5(1): 66-73. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7372.2014.01.025.
- 沈霞.糖尿病诊断和监测的金标准-HbA1c[J].实用检验医师杂志,2015, 7(1): 1-4. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2015.01.001.
- 潘志雄,刘晓峰,刘丹.阳离子交换层析法和胶乳凝集抑制法测定糖化血红蛋白的对比研究[J].实验与检验医学,2011, 29(2): 131-133. DOI: 10.3969/j.issn.1674-1129.2011.02.012.
- 邹伟.免疫透射比浊法检测糖化血红蛋白的方法评价[J].临床和实验医学杂志,2010, 9(7): 527-528. DOI: 10.3969/j.issn.1671-4695.2010.07.023.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. EP15-A2 User demonstration of performance for precision and accuracy [S]. USA: Wayne, 2004.
- 马春芳,沈国荣,陆小芳,等.血清 C 肽与糖化血红蛋白联合检测对糖尿病诊断的临床意义[J].临床合理用药杂志,2017, 10(1): 113-114. DOI: 10.15887/j.cnki.13-1389/r.2017.01.069.
- 张忠亮.血清 C 肽与糖化血红蛋白检验诊断糖尿病临床价值研究[J].糖尿病新世界,2017, 20(23): 6-7. DOI: 10.16658/j.cnki.1672-4062.2017.23.006.
- 杨晓冬,林桂花.血清 C 肽联合糖化血红蛋白检验在糖尿病诊断中的应用[J].实用糖尿病杂志,2016, 12(4): 31.
- 冯仁丰.临床检验质量管理技术基础[M].上海:上海科学技术文献出版社,2007.
- 左万超,李莲,郑卫东.免疫比浊法与高效液相色谱法检测糖化血红蛋白结果的对比分析[J].山西医药杂志,2016, 45(6): 734-736. DOI: 10.3969/j.issn.0253-9926.2016.06.045.

(收稿日期:2019-06-27)

(本文编辑:张耘菲)

消 息

《实用检验医师杂志》广告业务招商

《实用检验医师杂志》由国家卫生和计划生育委员会主管,中国医师协会与天津市天津医院共同主办,是中国医师协会检验医师分会会刊。

《实用检验医师杂志》于 2009 年 7 月 21 日获得中华人民共和国新闻出版总署批准的中华人民共和国期刊出版许可证,京期出证第 5864 号;2018 年 1 月 12 日获得天津市和平区市场和监督管理局批准从事广告发布业务(许可证号:2018024)。广告经营范围:设计、制作印刷品广告,利用自有《实用检验医师杂志》发布广告。本刊为国内外公开发行。目前本刊编辑部已开发了广告业务,欢迎需要在本刊刊登广告的客户联系我们。

联系电话:022-23306917

