

# CLSI EP9-A3 在两种不同方法测定糖化血红蛋白结果比对及偏倚评估中的应用

胡军红, 谢建红, 邓灼斌, 黄燕莉, 曹证福, 毛文杰

(佛冈县人民医院, 广东 清远 511600)

**摘要:** 目的 应用美国临床和实验室标准协会(CLSI)EP9-A3 文件, 对科室两种检测系统不同方法学测定糖化血红蛋白(HbA<sub>1c</sub>)的结果进行比对和偏倚评估。方法 根据 CLSI EP9-A3 文件要求, 用普门(Pumen)H9 高效液相色谱(HPLC)仪器和配套试剂组成的检测系统作为参比系统, 美康免疫比浊法试剂及日立 7600 生化分析仪组成的检测系统作为待评系统, 收集的 40 例在测量线性范围内的 HbA<sub>1c</sub> 全血标本分别用这 2 套检测系统测定, 对其检测结果通过分析散点图和用广义极端学生化偏差(extreme studentized deviate, ESD)进行离群值检验, 选取最适合的回归模型拟合其回归方程, 并计算其在相应医学决定水平处的偏移, 以其偏移在 95%的可信区间(CI)范围内和比例偏移小于 1/2 允许总误差(TE<sub>a</sub>)为可接受标准。结果 通过分析散点图及离群值检测(ESD 法)发现检测 40 份 HbA<sub>1c</sub> 样本, 其结果间的相关性较好, 也没有离群值点。根据差值偏差图、百分比差值偏差图、差值排序偏差图和百分比差值排序偏差图等特征选取了普通线性回归(OLR)分析模型进行拟合, 其回归方程为  $Y=1.0084X+0.0018$ 。将 10%和 16%这两个 HbA<sub>1c</sub> 的医学决定水平值分别代入回归方程中, 普门(X)和美康(Y)比对, 其偏移值分别为 0.086%和 0.136%, 均在其医学决定水平处偏移的 95%的 CI 范围内, 其比例偏移分别为 0.85%、0.84%, 均小于  $\pm 4\%$  的可接受标准。结论 普门的高效液相色谱法与美康免疫比浊法这 2 种不同方法测定 HbA<sub>1c</sub> 的结果具有可比性。

**关键词:** 糖化血红蛋白; 液相色谱; 免疫比浊; 可比性; 偏倚

中图分类号: R446.11<sup>+</sup>2 文献标识码: A 文章编号: 1674-1129(2018)02-0188-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-1129.2018.02.017

糖化血红蛋白(HbA<sub>1c</sub>)是人体血液中红细胞内的血红蛋白与血糖进行非酶结合的产物, 其反应的是一段时期内病人的血糖控制水平, 是用来判断糖尿病患者血糖控制效果的理想指标。但在目前临床应用过程中, 由于仪器不同、方法不同以及实验室的检测能力不同, 导致 HbA<sub>1c</sub> 检测结果间仍有较大差异<sup>[1-3]</sup>, 因此探讨不同方法之间 HbA<sub>1c</sub> 结果的可比性显得非常重要。我院之前的 HbA<sub>1c</sub> 一直是用深圳普门的高效液相色谱法(HPLC)方法进行测定, 由于只有一台仪器, 除了在仪器发生故障时会影响工作开展, 还有碰到可疑的测定结果时, 也无法用其他方法去验证, 所以最近我们又准备引进宁波美康的免疫比浊法 HbA<sub>1c</sub> 测定试剂盒组建新的检测系统, 为了了解这两套检测系统测定 HbA<sub>1c</sub> 结果的可比性, 我们根据 2013 年 8 月 CLSI 发布的 EP9-A3《用患者样本进行方法学比对及偏移评估——批准指南; 第三版》文件<sup>[4]</sup>, 对普门的高效液相色谱法(HPLC)和宁波美康的免疫比浊法这两套 HbA<sub>1c</sub> 检测系统测定 HbA<sub>1c</sub> 结果进行了系统间的方法比对和偏移评估, 现报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 全血标本 收集 40 例本院住院及门诊病人新鲜全血标本, 全血标本采用乙二胺四乙酸二钾盐(EDTA-K<sub>2</sub>)抗凝, 采样后在 2-6℃冰箱储存, 并在 24h 内完成测定, 标本 HbA<sub>1c</sub> 浓度在测量线性范围(3%-18%)内均匀分布, 其中在 3.0%-6.7%浓度范围内样本 13 例, 在 6.9%-9.9%浓度范围内样本 13 个, 在 10%-18%浓度范围内样本 14 例。

1.1.2 仪器与试剂 普门 H9 高效液相色谱仪及其配套试剂(批号: H9V1700702)、校准品(批号: H9V1700702)、质控品(批号: H9V1700702); 日立 7600 生化分析仪及美康 HbA<sub>1c</sub> 试剂(批号: 17031401)、校准品(批号: 17031401)和质控品(Level 1: 170038; Level 2: 171089)

### 1.2 方法

1.2.1 比对系统 (1)普门 H9 高效液相色谱仪及其配套试剂组成的 HbA<sub>1c</sub> 测定系统为参比系统(X), 美康免疫比浊试剂与日立 7600 生化分析仪组成 HbA<sub>1c</sub> 测定系统为待评系统(Y)。

1.2.2 标本测定 按照 EP9-A3 文件要求, 收集的 40 例糖化血红蛋白标本分别用这两套检测系统随

机测定,每套系统对每份标本进行一次测定,并对结果进行记录。测定之前仪器已按相关要求进行了校准,当天的质控数据也在控制范围内。如发现离群值,则应舍弃其结果并补充浓度水平相近的标本再进行测定。

1.2.3 离群值检查 按照 EP9-A3 文件要求,用目测散点图和 ESD 方法对 40 例标本的 HbA<sub>1c</sub> 测定结果进行离群值检查。

1.2.4 结果比对与偏倚评估 绘制差值偏差图、百分比差值偏差图、差值排序偏差图和百分比差值排序偏差图和散点图,根据不同检测系统间测定结果的散点图和 4 种偏差图的具体特征,选择最适合的回归模型进行拟合,并计算医学决定水平处的比例偏移及偏移 95% 的 CI,以偏移值在 95% CI 范围内和比例偏移  $\leq 1/2$  允许总误差( $\pm 4\%$ )作为它的可接受标准。

1.3 统计学软件及方法 采用微软公司 Excel 2010 和 SPSS 19.0 软件处理测定数据。计量资料用( $\bar{x} \pm s$ )表示,通过分析测定数据的 4 种偏差图和散点图的具体特征,选取最合适的回归模型进行计算,显著性检验采用  $t$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 离群值检验结果

2.1.1 目测分析:从图 1 的散点图可以发现,两种不同系统检测的 40 例标本 HbA<sub>1c</sub> 结果有非常好的相关性( $R^2=0.9982$ ),目测分析没有发现离群值。

2.1.2 ESD 法检验:根据广义极端学生化偏差 ESD 计算公式: $ESD = \max(|d_j - \bar{d}|)/SD$ ,第 31 号样本差值最大,经计算, $ESD_{\max} = 2.35$ ,根据实验统计的样本量  $n=40$ ,设定  $\alpha=0.05$  的情况下,查询 ESD 临界值表, $\lambda=3.04$ ,故当  $i=1$  时, $ESD_i < \lambda_1$ ,此 2 种方法 HbA<sub>1c</sub> 检测结果具有非常好的相关性,ESD 法检验没有发现离群值。

### 2.2 结果比对与偏倚评估

2.2.1 方法间差值的偏差图特征分析及相应的回归模型选择:按照 EP9-A3 文件要求对此 40 份血清标本的 HbA<sub>1c</sub> 结果绘制数值偏差图(图 2A)、百分比差值偏差图(图 2B)、差值排序偏差图(图 2C)、百分比差值排序偏差图(图 2D)等。普门高效液相色谱法与美康免疫比浊法比较,两者差值变化为恒定值,两种方法测定结果总体呈现线性变化趋势,相关系数  $R^2 \geq 0.95$ ,故选择 OLR 回归分析模型进行拟合。

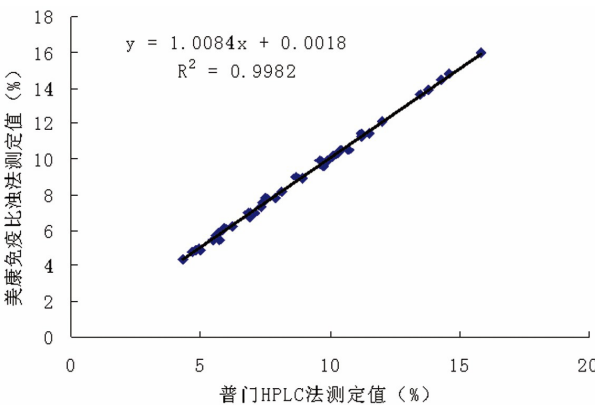


图 1 2 种不同方法测定 HbA<sub>1c</sub> 结果散点图

2.2.2 回归方程选择及偏移评估结果:EP9-A3 虽然提供了 4 种模型进行回归分析(OLR、WLS、Deming、Passing-Baklok),但根据这 2 种方法测定结果的上述 4 张偏差图和散点图表现出来的数值变化特点-各数据点差值变化相对一致(恒定 SD),相关系数  $R^2 \geq 0.95$ ,我们选取 OLR 作为最佳回归模型进行拟合,其回归方程为  $Y=1.0084X+0.0018$ 。将 10%、16%这两个 HbA<sub>1c</sub> 医学决定水平值分别代入拟合方程,其在医学决定水平处的偏移值分别为 0.086%和 0.136%,均在偏移的 95%的 CI 范围内,其比例偏移分别为 0.85%、0.84%,均小于  $\pm 4\%$  的可接受标准。(见表 1)。

## 3 讨论

近年来,HbA<sub>1c</sub> 在糖尿病的筛查、诊断和治疗

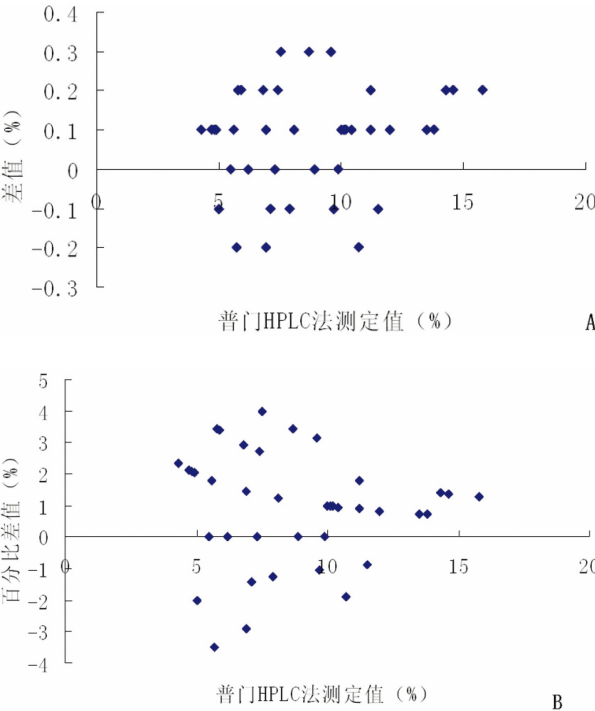


表 1 HbA<sub>1c</sub> 比对 OLR 回归模型在医学决定水平处的偏移结果

回归模型	回归方程	医学决定水平	估计值(%)	偏移(%)	偏移 95%CI(%)	比例偏移(%)	可接受范围	是否可接受
OLR	Y=1.0084X+0.0018	10%	10.086	0.086	-0.179%~0.351%	0.85	±4%	接受
		16%	16.136	0.136	-0.143%~0.416%	0.84	±4%	接受

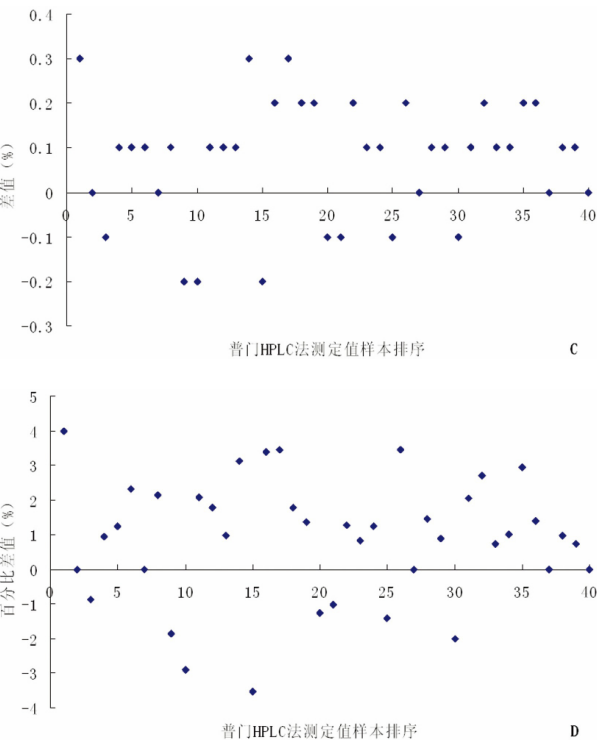


图 2 普门高效液相色谱法与美康免疫比浊法测定 HbA<sub>1c</sub> 差值偏差图与排序偏差图

中及糖尿病相关并发症的诊断和治疗中发挥着非常重要的作用<sup>[5-8]</sup>, 所以为临床提供准确的 HbA<sub>1c</sub> 结果显得尤为重要。由于目前糖化血红蛋白测定方法有很多种, 如有高效液相色谱法、电泳法、免疫比浊法、亲和层析法及酶法等方法, 其测定原理也各异<sup>[9]</sup>, 所以仪器的不同、方法学的不同及实验室人员检测能力的不同会导致 HbA<sub>1c</sub> 检测结果间存在较大差异<sup>[10-12]</sup>。因为工作的需要, 本实验室在原普门 HPLC 法测定 HbA<sub>1c</sub> 的基础上, 准备引进美康免疫比浊法试剂与日立 7600 组成新的 HbA<sub>1c</sub> 测定系统, 根据医学实验室质量和能力认可准则<sup>[13]</sup>要求, 实验室使用两套及以上检测系统检测同一项目时, 应对其检测结果的一致性进行验证。由于普门 HPLC 法 HbA<sub>1c</sub> 仪器已在实验室使用较长时间, 其室间质评成绩优秀, CV 值 < 2%, 故以此作为参比系统, 新引进美康免疫比浊法试剂盒和日立 7600 组成的 HbA<sub>1c</sub> 测定系统作为待评系统与其进行结果比对和偏移评估分析。参考 EP9-A3 文件及其他

相关论文<sup>[14,15]</sup>, 我们绘制了这两种检测系统之间 HbA<sub>1c</sub> 测定值的散点图, 没发现有明显的离群结果, 然后用 ESD 法检验进一步确认无离群值点。接下来通过分析两种系统间的 4 种偏差图(差值偏差图、百分比差值偏差图、差值排序偏差图和百分比差值排序偏差图)的变化特征, 发现这两种不同方法的测定 HbA<sub>1c</sub> 结果呈现线性变化趋势, 两者差值总体呈现恒定 SD 变化, 相关系数  $R^2 \geq 0.95$ , 因此我们对这两种方法间的比较分析选取了 OLR 回归分析模型进行拟合, 其回归方程为  $Y=1.0084X+0.0018$ 。将 HbA<sub>1c</sub> 两个医学决定水平 10%、16% 分别代入回归方程中, 结果显示, 其两个医学决定水平处的偏移值分别为 0.086% 和 0.136%, 均在医学决定水平偏移的 95%CI 范围内, 其比例偏移值为 0.85%、0.84%, 均小于 ±4% 的可接受标准, 所以普门的高效液相色谱法与美康免疫比浊法这 2 种不同方法测定 HbA<sub>1c</sub> 的结果具有可比性, 均能满足临床需求。

参考文献

[1] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. WS/T461-2015: 糖化血红蛋白检测 [S]. 2015-06-23[2015-12-31]. <http://www.nhfp.gov.cn/ewebeditor/uploadfile/2015/07/20150703091900134.pdf>.  
[2] 居漪. 再谈糖化血红蛋白[J]. 检验医学, 2015, 30(6): 547-553.  
[3] 薛声能, 程桦. 糖化血红蛋白的研究进展[J]. 国际内科学杂志, 2008, 35(10): 586-588, 601.  
[4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline—Third Edition[S]. Wayne, PA: CLSI, 2013.  
[5] 骆斯慧, 赵咏桔. 糖化血红蛋白 A<sub>1c</sub> 在糖尿病监测和诊断中的应用[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2011, 31(1): 9-12.  
[6] 刘艳梅. 糖化血红蛋白在糖尿病中的临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(11): 1035-1037.  
[7] 戴晓灵. 糖化血红蛋白在糖尿病诊治中的应用[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(6): 373-374.  
[8] 闫威, 姜海燕. 糖化血红蛋白检测在糖尿病监测中的价值[J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(8): 169.  
[9] 林莉, 戴永辉, 徐建华, 等. 三种不同方法测定糖化血红蛋白的结果比对和偏移评估分析[J]. 中华医学杂志, 2016, 96(8): 650-654.  
[10] 雷斌, 李碧. 糖化血红蛋白的检测意义及常用方法比较[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(10): 1458-1460.  
[11] 田伟, 陈榕方, 王毅, 等. 糖化血红蛋白五种检测方法的评价[J]. 实验与检验医学, 2014, 32(3): 252-263. (下转第 192 页)



和必不可少的快速检测方法,作为目前临床常用的自动化血液分析仪,其检测标本的数量及速度是手工法所无法比拟的<sup>[4]</sup>。虽然血细胞分析仪具有速度快和批量大的优点,但也有血涂片法不可替代的,尤其在近年来对血涂片的复核要求更为突出。国际血液学组织提出了显微镜复检的 41 条建议性标准,得到中国血液检验学界的密切关注,同时也是很多实验室作为血涂片复核的参考标准。

目前所有的血小板计数方法,都存在不少缺陷,尤其对低值血小板计数来说,体现得更为重要。血液分析仪对血小板计数减少,尤其是极低值血小板标本,不能很好地反映血小板的实际数量,此时往往需要依靠显微镜血涂片观察辅助诊断血小板减少症。文献报道血涂片法血小板计数与血细胞分析仪计数结果差别不大,国内也有相关文献报道<sup>[5]</sup>,认为仪器法对检测血小板低值标本的准确性较差,应以血小板手工计数法复检,以保证可靠性<sup>[6]</sup>。本次实验采用血涂片方法来计数血小板数量,经在显微镜下仔细辨认与识别血小板的形态与大小,从而进行间接计数。我们对 147 例血小板减少标本进行计数,血小板低组和较低组,血涂片法分别与血液分析仪法及手工法比较, $P$  值均 $>0.05$ 。血小板极低组,血涂片法分别与血液分析仪法及手工法比较, $P$  值 $<0.01$ ,差异有统计学意义,与文献报道基本吻合<sup>[7]</sup>;血涂片法计数血小板,不仅可以对血液分析仪计数进行复核,还可以观察血小板形态及大小,区别和判断所谓“非血小板颗粒”对计数的影响。血涂片镜检的另一优点是可直接地观察到巨大血小板、纤维蛋白丝、血小板假性聚集等,进而采取其它方法及时校正血小板计数,得到真实的小血小板结果<sup>[8]</sup>。这些情况仅通过仪器重新复做血小板是无法解决的。此外,对血小板减低的标本进行血涂片血小板计数,可在一定程度减少标本的复做频率,降低检验成

本,提高了准确率。

采用血涂片可以直观地间接计数血小板,对血液分析仪结果进行复核,这对血小板减少者来说尤为重要<sup>[9]</sup>。对于血小板减少症以及需要输注血小板的患者来说,输注血小板的疗效评价,主要是观察临床症状是否得到改善,输入的血小板进入患者循环血液后,血小板计数在短期内可能会升高明显,但可能很快游离到出血部位参与止血而被消耗,因此,计数输注血小板后的血小板数量有十分重要的临床意义。同时血涂片法还具有很好的保存性,当血小板数量正常,而形态不正常时,有利于辨认血小板形态,同时更加有助于临床疾病的诊断治疗。总之,血涂片计数血小板可以用于对血液分析仪的复核<sup>[10]</sup>,是值得推广应用、快速、简便的方法,具有较高的临床应用价值。

#### 参考文献

- [1] 顾晓菁, 巩晓芸. 血涂片血小板计数法对血液分析仪的复核作用[J]. 临床检验杂志, 2004, 22(6): 442-462.
- [2] 洪英, 董玉英. 血液分析仪检测血象时应对异常结果样本进行涂片镜检[J]. 实验与检验医学, 2011, 29(5): 314-314.
- [3] 王晓贤, 刘洁, 周永红. XT-4000i 血液分析仪血小板两种测定方法与血涂片复检的对比[J]. 中国实用医药, 2012, 7(26): 106-107.
- [4] 吕泰霞, 付行才, 张益红. Bayer2120 血液分析仪与血涂片结果相关性研究[J]. 实验与检验医学, 2009, 27(5): 557-557.
- [5] 陈军浩, 王以立, 顾光煜, 等. 血小板计数仪器法与手工法测定低血小板样品的评价[J]. 临床检验杂志, 1997, 15(6): 364-365.
- [6] 戴宏斌, 李强. 血涂片法对血球仪计数血小板的复核探讨[J]. 临床输血与检验杂志, 2012, 14(1): 79-80.
- [7] 苏丽莎. 血涂片在血细胞计数血小板异常结果中的作用[J]. 实用医技杂志, 2015, 1(22): 55-56.
- [8] 沙学明, 范广智, 赵天才. 观察血涂片对血液分析仪血小板计数复核作用的探讨[J]. 中国医学检验杂志, 2009, 10(3): 161-161.
- [9] 车轶群, 沈迪, 董莹莹, 等. 3 种方法检测血小板的对比分析[J]. 北京医学, 2011, 7(3): 593-594.
- [10] 黎红. 血涂片法对血液分析仪的血小板计数复核作用[J]. 基层医学论坛, 2011, 35(3): 1145-1146.

(收稿日期 2017-06-19; 修回日期 2018-03-11)

(上接第 190 页)

- [12] 宋银丹, 段勇. 糖化血红蛋白检测标准化的研究进展[J]. 实验与检验医学, 2013, 31(2): 108-130.
- [13] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL02: 医学实验室质量和能力认可准则[EB-OL]. (2013-11-22)[2014-11-01]. <https://www.cnas.org.cn/images/rkgf/sysrk/jbzz/2013/12/20/1C3A61EEC69A825B0FD01ECD986D9B78.pdf>

- [14] 徐建华, 刘冬冬, 黄宪章, 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, 38(5): 346-348.
- [15] 徐建华, 黄宪章, 庄俊华, 等. 新指南 CLSI EP9-A3 在方法学比对及偏移评估中的应用[J]. 中华医学杂志, 2015, 95(12): 894-897.

(收稿日期 2017-08-01; 修回日期 2017-10-30)