

· 临床探讨 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.04.031

总峰面积对糖化血红蛋白结果的影响及其 2 种方法的比较*

张 伟, 汤学彪, 胡江红, 付魏萍, 汪永强, 袁平宗[△]

(四川省内江市第二人民医院检验科 641100)

摘要:目的 研究高效液相色谱法(HPLC)检测糖化血红蛋白(HbA1c)的总峰面积小于 1 M 时对结果的影响,以及比较 2 种处理方法的差异。方法 对糖化血红蛋白仪 D-10 1 个试剂包使用期间送检的患者标本进行回顾性分析。每目标本先原管进样,总峰面积小于 1 M 的标本按 2 种处理方法进行复查:一种为手工稀释模式,另一种先弃去一定量的血浆再混匀后上机测试,即全血处理模式。并以与全血处理模式的值偏倚小于或等于 0.3% HbA1c 为质量指标,判断总峰面积与发生峰异常的关系及对质量指标符合率的影响;同时分析比较 2 种处理方式数据间的差异。结果 总峰面积小于 1 M 标本峰异常率显著高于总峰面积大于或等于 1 M (14.29% vs. 1.00%, $P < 0.05$);将总峰面积小于 1 M 标本分为峰异常组和无峰异常组,前者总峰面积和指标符合率显著低于后者[(454 224±174 139) vs. (656 782±161 523);25.0% vs. 83.3%, $P < 0.05$];全血处理模式和手工稀释模式峰异常率均显著低于总峰面积小于 1 M 标本(1.79% vs. 14.29%, $P < 0.05$);全血处理模式总峰面积和 HbA1c 值低于手工稀释模式[(1 331 550±287 418) vs. (2 094 057±493 850);(8.2±2.6)% vs. (8.3±2.6)%, $P < 0.05$],但两种处理模式最大偏倚值为 0.2% HbA1c,符合质量指标的要求。结论 总峰面积偏低可能会导致峰异常率增加,影响检测质量。全血处理和手工稀释结果有一定的差异,但均可作为有效处理方式。

关键词:总峰面积; 糖化血红蛋白; 峰异常**中图分类号:**R446.1**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2018)04-0530-03

糖化血红蛋白仪 D-10 在分析通路中将分离的血红蛋白经光感测量计在 415 nm 处测量,经临床数据处理软件(CDM)收集还原得到色谱流出曲线图(简称色谱图),其纵坐标为检测器的响应信号,横坐标为时间、体积或距离。利用高斯函数(EMG)通过微积分可计算糖化血红蛋白(HbA1c)对应的峰面积占血红蛋白总峰面积的百分比。但实际使用中常会出现小于 1 M 而报信号的情况,其对应的检测结果可能并不真实,需要提高总峰面积进行复查。大多数实验室则依据仪器说明采用稀释模式(即 5 μ L 全血+1.5 mL 稀释液)进行复查,本实验室常根据血红蛋白水平采用低速离心或自然沉降后按吸去多余比例的血浆,经再次重新混匀全血而达到提高血红蛋白(Hb)水平并增加总峰面积的效果,有效避免了预稀释带来的基质效应。2 种处理方法均有提高总峰面积的作用,但提高多少不尽相同。且不同总峰面积所对应结果的差异也未知。现通过观察不同总峰面积下峰异常发生率及对检测结果的影响,探讨 2 种处理方法能否满足日常检测要求及其差异,为提高 HbA1c 检测质量及标准化提供参考,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将一个试剂包使用期间所有符合要求的患者标本数据纳入回顾性分析,包括原管标本和总峰面积小于 1 M 时 2 种复查处理方法的标本。采用 EDTA-K₂ 抗凝标本,出现凝块时需病房重新抽取。

根据《糖化血红蛋白实验室检测指南》要求,本实验室每日高低值质控均符合质量指标(\leq 靶值 $\pm 0.3\%$ HbA1c)时进行标本检测。依据仪器操作规程中对结果可接受性的要求,排除有异常血红蛋白 HbC 和 HbS,以及 HbF $\geq 10\%$ 的标本,同时排除易生成甲酰化血红蛋白的肾衰竭患者标本^[1]。峰异常是指基线漂移和滞留时间异常,如 A1c 和 A0 峰未出现在正确的窗口处或 LA1c-1 峰面积大于 4.0% 或 LA1c-2 峰面积大于 3.5%,以及 A0 峰前大于或等于 2 个 unknown 峰,或 A0 峰后出现 variant-window 及其他峰等干扰 A1c 峰计算的情况。

1.2 方法 (1)糖化血红蛋白仪 D-10 的一个试剂包使用期内,每日保证室内质控符合质量指标要求,且每目标本先全部原管进样,如果有标本量偏少的原管可在管槽底垫上 1~2 个专用橡胶垫。由于红细胞沉降率过快而导致加样失败无结果的标本须混匀后重新进样。出现总峰面积小于 1 M 的标本时,需按 2 种处理方法进行复查:一种是将标本充分混匀后按手工稀释模式(5 μ L 标本+1.5 mL wash/dilution 液)上机重测;一种是原管 1 500 r/min 离心 2 min 后,弃去一定量的上层血浆并混匀上机测试,即全血处理模式。吸走的血浆量根据刘世文等^[2]研究结果:Hb < 50 g/L 的标本吸走 800 μ L 血浆,50~65 g/L 吸走 500 μ L,>65 g/L 吸走 200 μ L。如果仍然出现总峰面积小于 1 M 可继续 1 500 r/min 离心 2 min 后吸走

* 基金项目:四川省卫生厅科研项目(100330)。

[△] 通信作者,E-mail:18990550580@126.com。

100~200 μL 血浆混匀上机,直到总峰面积大于或等于 1 M,标本量过少仍然采用垫橡胶垫的方法。而手工稀释模式则注意 wash/dilution 液从冰箱取出后需恢复至室温使用,总峰面积仍小于 1 M 时可视情况增加标本量重新稀释上机。根据纳入和排除标准,对符合要求的标本数据进行回顾性分析。分析每个数据的色谱图并记录总峰面积、HbA1c 值及有无峰异常等数据。(2)计算原管进样标本中总峰面积小于 1 M 的出现率,比较原管标本中总峰面积小于 1 M 与大于或等于 1 M 标本的峰异常率。将前者分为峰异常组和无峰异常组并以与全血处理模式的值偏倚小于或等于 0.3% HbA1c 为质量指标^[1,3]。比较 2 组总峰面积和指标符合率的差异。(3)分别比较全血处理模式及手工稀释模式与总峰面积小于 1 M 标本的峰异常率,并比较 2 种处理方法间总峰面积和 HbA1c 值的差异。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析。计数资料以例数表示,组间比较使用 χ^2 检验,其中独立样本间率的比较采用独立列联表 χ^2 检验,不同处理方式间率的比较则采用配对设计 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,独立样本间比较采用独立样本 t 检验,不同处理方式间比较采用配对 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原管进样峰异常发生率结果比较 纳入该研究的原管进样标本数 257 例,其中有 5 例标本因红细胞沉降率过快导致无结果。经再次充分混匀进样最终有 56 例总峰面积小于 1 M 标本,占 21.79%。总峰面积小于 1 M 的标本有 8 个出现峰异常,异常率 14.29%;总峰面积大于或等于 1 M 的标本有 2 例出现峰异常,异常率 1.00%,差异有统计学意义($\chi^2 = 20.688, P < 0.05$)。见表 1。

表 1 原管总峰面积小于 1 M 和大于或等于 1M 的峰异常率结果比较

| 原管类别 | 峰异常(n) | 无峰异常(n) | 合计(n) | 异常率(%) |
|------|--------|---------|-------|--------|
| <1 M | 8 | 48 | 56 | 14.29 |
| ≥1 M | 2 | 199 | 201 | 1.00 |
| 合计 | 10 | 247 | 257 | 3.89 |

2.2 峰异常与总峰面积大小和质量指标符合率的相关性 将总峰面积小于 1 M 标本分为峰异常组和无峰异常组,峰异常组总峰面积(454 224 \pm 174 139),质量指标符合率(2/8, 25.0%);无峰异常组总峰面积(656 782 \pm 161 523),质量指标符合率为(40/48, 83.3%)。两者总峰面积比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);质量指标符合率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 2 种处理方法对峰异常的影响结果比较 全血处理模式与手工稀释模式均发现 1 例峰异常,且为同一标本,异常率均为(1/56, 1.79%),两者峰异常率低于原管进样总峰面积小于 1 M 的标本($P = 0.016, P < 0.05$)。见表 2。

2.4 2 种处理方法总峰面积和 HbA1c 值结果比较 全血处理模式总峰面积(1 331 550 \pm 187 418),HbA1c 值(8.2 \pm 2.6)%;手工稀释模式总峰面积(2 094 057 \pm 493 850),HbA1c 值(8.3 \pm 2.6)% ,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。2 种处理模式所有标本结果中最大偏倚值为 0.2% HbA1c,符合质量指标要求。见图 1。

表 2 2 种处理方法与峰面积小于 1 M 标本峰异常率结果比较(n)

| 全血处理/手工稀释 | 总峰面积小于 1 M(原管进样) | | 合计 |
|-----------|------------------|------|----|
| | 峰异常 | 无峰异常 | |
| 峰异常 | 1 | 0 | 1 |
| 无峰异常 | 7 | 48 | 55 |
| 合计 | 8 | 48 | 56 |

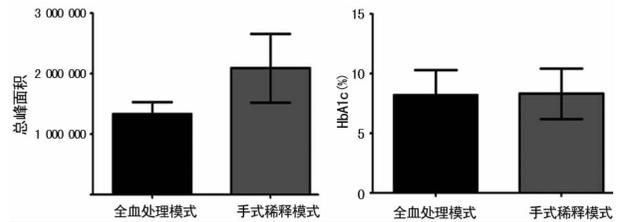


图 1 2 种处理模式总峰面积和 HbA1c 值结果比较

3 讨论

HPLC 法测定 HbA1c 是采用的归一化法,该法特点是所有出峰情况全部汇于色谱图上计算 A1c 峰占总峰面积的百分比。D-10 糖化血红蛋白仪要求总峰面积须在 1~4 M,偏低和偏高都可能使结果不能被接受。其中总峰面积偏高的情况除去手工稀释模式不按标准操作外基本不会遇到,而总峰面积偏低是实验经常遇到的问题。本研究总峰面积小于 1 M 的比例就高达 21.79%,这主要是因为标本量不足及 Hb 水平偏低和/或红细胞沉降过快,总之可以归结为样品针加入了低 Hb 导致。D-10 糖化血红蛋白仪一次可进样 10 例标本,但无自动混匀功能,如果有红细胞沉降率过快的标本或置于标本后几个孔位,极易导致低总峰面积甚至无结果,本研究 257 例标本出现了 5 例标本由于红细胞沉降率过快而无结果,而临床检测的大部分低 Hb 标本是因为患者的低血红蛋白症引起。范秀芳等^[4]通过研究发现糖尿病患者多有贫血,其中糖尿病肾病患者更易发生贫血且贫血程度较重。贾连玲等^[5]将糖尿病合并贫血组与单纯糖尿病组进行比较,Hb 和 HbA1c 水平均明显降低($P < 0.01$)。归其原因,不排除红细胞生存周期缩短而导致 HbA1c 假性降低,但从实验本身则疑似样品针加入低水平 Hb 引起低总峰面积而致使 HbA1c 值偏低,正如本研究全血处理模式和手工稀释模式进行比较,总峰面积和 HbA1c 值同时偏低($P < 0.05$),提示总峰面积的高低会影响 HbA1c 值的差异,即引起系统误差。

本研究总峰面积小于 1 M 峰异常率显著增大,从而出现峰异常组质量指标符合率显著低于无峰异常组,这可能是峰异常引起随机误差增大所致。而峰异

常主要表现为无峰或出现负峰、宽峰、双峰、肩峰、峰形不对称等情况,其均会影响色谱分析结果,可能与方法学有关^[6]。因为Hb中某些微量成分或其他杂质可能表现为杂峰或未知峰,当总峰面积满足一定的大小时其影响较小,但总峰面积偏低时其影响效果会被随之放大。其次,A1c峰往往与前HbA1c(西弗氏碱)或氨基乙酰化的Hb峰有一部分交错重叠,通过微积分将类高斯对称峰加以修正并计算结果,当总峰面积偏低后其分辨率也可能相对降低而导致分析和计算误差。冯仁丰^[7]解释异常Hb对HbA1c的干扰原理,总峰面积作分母,包括所有峰,出现异常峰后分母的数字被放大,导致最后计算得到HbA1c值缩小。另外本实验获得的峰异常组总峰面积和指标符合率均显著低于无峰异常组($P < 0.05$),同时表1和表2显示峰异常率增加与总峰面积偏低有关,以及峰异常会引起检测结果的不准确。

刘世文等^[2]对Hb偏低的处理是将血液浓缩即通过离心→弃掉部分上层血浆→混匀检测效果明显,本研究根据其经验实行不同Hb水平范围吸取不同量的血浆,充分混匀并及时加样防止红细胞沉降率过快的影响,同时禁止过分浓缩以防止高水平Hb进入色谱柱缩短其使用寿命。而另一种处理方法则是常规稀释模式, $< 1 M$ 则采用标本加量的方法。本研究表明这2种处理方法虽然总峰面积都满足 $1 \sim 4 M$ 要求,但手工稀释模式总峰面积明显大于全血处理模式($P < 0.05$),且前者HbA1c结果大于后者 0.1% HbA1c存在系统误差,该系统误差对应的均值为 8.2% HbA1c;由于HbA1c水平越低该误差会越不明显,所以对糖尿病诊断界值($\geq 6.5\%$ HbA1c)而

言,2种处理方法的系统误差会降低。而高水平HbA1c标本往往只作为糖尿病治疗效果的监测,该误差也无关系要。总之,该误差符合小于或等于 0.3% HbA1c的质量指标要求,2种处理方法都可采用。但同时这个系统误差的问题也应该值得重视,如进行仪器间比对或不同标本间结果比较时都应当采取同一种处理方法。

参考文献

- [1] 糖化血红蛋白测定专家共识委员会. 糖化血红蛋白测定专家共识[J]. 中华糖尿病杂志, 2014, 6(12): 853-858.
- [2] 刘世文, 崔海丽, 侯云修. 高效液相色谱法检测HbA1c未检出结果的原因分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 20(9): 2528-2530.
- [3] SACKS D B, ARNOLD M, BAKRIS G L, et al. Position statement executive summary: guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus[J]. Diabetes Care, 2011, 34(6): 1419-1423.
- [4] 范秀芳, 王嘉佳, 刁建辉, 等. 糖尿病肾病与非糖尿病肾病贫血的对照研究[J]. 中国当代医药, 2015, 19(24): 35-37.
- [5] 贾连玲, 王欣茹, 邓龙华, 等. 糖尿病合并贫血患者糖化血红蛋白检测的临床意义[J]. 西北国防医学杂志, 2017, 20(1): 51-53.
- [6] 龚时琼. 高效液相色谱分析中异常峰的分析与处理[J]. 实验技术与管理, 2010, 15(6): 37-38.
- [7] 冯仁丰. 糖化血红蛋白标准化和检测准确度现状(续)[J]. 检验医学, 2016, 28(6): 437-441.

(收稿日期: 2017-08-07 修回日期: 2017-10-06)

• 临床探讨 • DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 04. 032

核苷类似物结合肝动脉化疗栓塞术对乙型肝炎病毒再激活的研究

张晶芬, 付广双

(吉林大学第四医院感染科, 长春 130011)

摘要:目的 探讨核苷类似物结合肝动脉化疗栓塞(TACE)术对乙型肝炎病毒(HBV)再激活的影响。方法 选取该院2014年1月至2016年1月进行TACE治疗的原发性肝癌患者150例, CT等检测均明确诊断。随机选择50例患者作为对照组, 单纯进行TACE。具有慢性乙型肝炎基础的原发性肝癌患者100例作为观察组, 观察组患者手术前服用恩替卡韦分散片, 1 d 1片, 至少服用1年。结果 观察组患者HBV再激活率为 16.0% , 低于对照组(36.0%)($P < 0.05$), 观察组术后未激活84例, 丙氨酸氨基转移酶(ALT)术前为(61.35 ± 21.54)IU/L, 术后为(41.02 ± 29.01)IU/L($P < 0.05$)。术后再激活16例, ALT术前为(36.41 ± 21.36)IU/L, 术后为(133.86 ± 78.36)IU/L($P < 0.05$)。对照组术后未激活32例, ALT术前为(41.02 ± 26.94)IU/L, 术后为(41.23 ± 31.46)IU/L($P < 0.05$)。术后再激活18例, ALT术前为(45.98 ± 34.56)IU/L, 术后为(49.35 ± 48.12)IU/L($P < 0.05$)。结论 TACE可导致患者HBV再激活, 而核苷类似物恩替卡韦分散片具有抑制HBV再激活的作用。

关键词: 乙型肝炎病毒; 肝动脉化疗栓塞术; HBV再激活; 核苷类似物

中图法分类号: R633

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)04-0532-04

原发性肝癌是常见的恶性肿瘤之一。据统计, 每年我国原发性肝癌发病例数约为100万。该病早期

无明显症状, 就诊时已多属中晚期, 增大了治疗难度^[1]。中晚期肝癌患者主要采用肝动脉化疗栓塞术