

吡喃糖氧化酶法检测血清 1,5-脱水葡萄糖醇的方法学性能评价

陈颖, 李莎, 索明环, 王伟佳

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 评价吡喃糖氧化酶法检测血清 1,5-脱水葡萄糖醇(1,5-AG)的方法学性能。方法 参考美国临床和实验室标准化协会(CLSI)发布的方法学评价文件,对吡喃糖氧化酶法检测血清 1,5-AG 的精密度、正确度、抗干扰性、分析测量范围(AMR)、临床可报告范围(CRR)、生物参考区间进行评价和验证,并与厂家声明的性能和有关的质量标准进行比较。结果 吡喃糖氧化酶法检测血清低高水平 1,5-AG 的批内精密密度为 1.58% 和 0.76%, 批间精密密度为 3.37% 和 1.22%, 小于厂家声明的标准;正确度验证显示与配套校准品标示值的偏倚为 1.42% 和 1.27%, 小于 10% 的质量目标;抗干扰评估显示,当 TG ≤ 500 mg/dL、Bil ≤ 50 mg/dL、Hb ≤ 20 mg/dL 和 VitC ≤ 50 mg/dL 时无显著干扰;AMR 验证判断最佳拟合方程为二次多项式,血清 1,5-AG 浓度在 0.16~49.82 μg/mL 范围内存在线性关系;CRR 最大稀释倍数是 32 倍,范围为 0.35~1 594.24 μg/mL。生物参考区间验证显示本研究选择的参考个体血清 1,5-AG 水平符合厂家试剂说明书给定的参考区间。结论 吡喃糖氧化酶法检测血清 1,5-AG 的各项性能指标均符合检测的要求,其可为实验室和临床提供可靠的 1,5-AG 结果;厂家声明的生物参考区间适用于本实验室,建立的最大稀释倍数和 CRR 可为临床提供更好的质量保证。

【关键词】 1,5-脱水葡萄糖醇;吡喃糖氧化酶法;方法学;性能评价;糖尿病

【中图分类号】 R446.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2020)03-0281-03

Performance evaluation of serum 1,5-anhydroglucitol assay by pyranose oxidase. CHEN Ying, LI Sha, SUO Ming-huan, WANG Wei-jia. Department of Laboratory Medicine, Sun Yat-sen University Affiliated Zhongshan Hospital, Zhongshan 528403, Guangdong, CHINA

【Abstract】 Objective To evaluate analytical performance of serum 1,5-anhydroglucitol (1,5-AG) by pyranose oxidase. **Methods** Precision, accuracy, anti-interference ability, analytical measure range (AMR), clinical reportable range (CRR) and biological reference interval of serum 1,5-AG were evaluated according to EP document issued by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and related reference. **Results** The within-run and between-run precision of low-level and high-level serum 1,5-AG were 1.58%, 0.76% and 3.37%, 1.22%, which were less than standard of manufacturer. The accuracy validation showed that the bias was 1.42% and 1.27%, which was less than the quality objectives for affiliated calibrators (10%). Anti-interference evaluation showed no significant interference at TG ≤ 500 mg/dL, Bil ≤ 50 mg/dL, Hb ≤ 20 mg/dL, and VitC ≤ 50 mg/dL. AMR validation showed that the best fit equation was linear equation polynomial. There was linear relationship when the concentration of serum 1,5-AG was 0.16 μg/mL to 49.82 μg/mL. CRR level was 0.35 μg/mL to 1 594.24 μg/mL, and the maximum dilution of CRR was 32 times. Biological reference interval validation showed that the overall level of serum 1,5-AG in this study reference individuals conformed to the standard of manufacturer for the population. **Conclusion** The analytical performance of serum 1,5-AG by pyranose oxidase basically met the needs of laboratory, which can provide reliable result. Biological reference that manufacturers have proclaimed is suitable for the laboratory. The establishment of the maximum dilution and CRR can provide better quality assurance.

【Key words】 1,5-anhydroglucitol; Pyranose oxidase; Methodology; Performance evaluation; Diabetes mellitus

1,5-脱水葡萄糖醇又称 1,5-脱水-D-山梨醇(1,5-anhydroglucitol, 1,5-AG),是自然界存在的多元醇,可反映检测前 1~2 周内的平均血糖水平。机体在高糖状态下,葡萄糖会竞争性地抑制 1,5-AG 在肾小管的重吸收,从而使血清 1,5-AG 的含量显著降低^[1-2]。近年来,1,5-AG 反映餐后高血糖和短期血糖波动的优势受到广泛的关注^[3-4]。1,5-AG 可作为糖尿病患者诊断和预测常见并发症的必要补充,其准确测定有着重要意

义。本研究参考 CLSI EP 文件和相关文献^[5-8],评价吡喃糖氧化酶法检测血清 1,5-AG 的主要分析性能,使其更好地应用于临床,现将结果报道如下:

1 材料与方 法

1.1 实验样本 选取 2019 年 4~6 月来自广东省中山大学附属中山医院就诊人员样本,无溶血、乳糜、黄疸等干扰物;其中生物参考区间验证样本,男性 10 例,年龄 20~62 岁;女性 10 例,年龄 19~62 岁,均无任何疾病史。

基金项目:广东省中山市科技计划项目(编号:2017B1034);广东省中山市医学科研基金(编号:2016J008)

通讯作者:王伟佳,E-mail:wwj0769@163.com

1.2 试剂与仪器 1,5-AG测定试剂盒、校准品及质控品均由北京九强生物技术股份有限公司提供。仪器为德国西门子ADVIA2400生化分析仪。

1.3 方法

1.3.1 精密度实验 参考EP5-A2文件进行确认。批内精密度:选取低值、高值新鲜血清1,5-AG样本,重复检测20次。批间精密度:选取低值、高值质控品,分成5份,每天测4次,连续测5d,分别计算其平均值(\bar{x})、标准偏差(SD)和变异系数(CV)。

1.3.2 正确度验证 测定另一个批号1,5-AG校准品低值(7.0 $\mu\text{g/mL}$)和高值(25 $\mu\text{g/mL}$)三次,计算测定均值与配套校准品标示值的相对偏倚。

1.3.3 抗干扰实验 参考EP7-A2文件进行确认,选择低高值1,5-AG新鲜血清样品作为基础样本。干扰物试剂盒和空白对照由北京九强公司提供,以添加不同浓度干扰物之后的血清1,5-AG测定均值超过同一浓度下空白对照管的 $\pm 5\%$ 为产生干扰作用。

1.3.4 分析测量范围(AMR)实验 即线性范围,参考EP6-A文件,分别收集血清1,5-AG浓度接近厂家声明的分析测量范围下限和上限的低值样本(L)和高值样本(H),将L和H样本按:7L、6L+1H、5L+2H、4L+3H、3L+4H、2L+5H、1L+6H、7H混合,配置成1,5-AG系列浓度血清,每个浓度重复测量两次,在一个分析批次内完成。

1.3.5 临床可报告范围(CRR)实验 选择分析范围内高浓度标本3份,配套稀释液做2、4、8、16、32倍稀释,计算稀释回收率,确定可靠测量低限及最大稀释倍数,以回收率(100 \pm 10)%为可接受范围;CRR上限

=AMR上限 \times 最大稀释倍数。

1.3.6 生物参考区间验证 参考C28-A2文件,对20个参考个体测定血清1,5-AG浓度,与厂家给定的参考区间比较($>14 \mu\text{g/mL}$)。

1.4 统计学方法 所有资料应用Microsoft Excel 2003及SPSS16.0软件进行统计学分析。精密度、正确度和抗干扰分析采用 \bar{x} 、SD和CV表示;分析测量和临床可报告范围的评价应用多项式回归分析;生物参考区间验证应用“1/3”规则进行离群值检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 精密度 吡喃糖氧化酶法检测血清1,5-AG的批内精密度的1.58和0.76%,批间精密度的3.37%和1.22%,见表1。

表1 吡喃糖氧化酶法检测血清1,5-AG的精密度的结果

项目	批内		批间	
	HS ₁	HS ₂	PC ₁	PC ₂
均值($\mu\text{g/mL}$)	9.56	20.82	7.07	17.04
SD ($\mu\text{g/mL}$)	0.15	0.16	0.24	0.21
CV (%)	1.58	0.76	3.37	1.22

注:HS为新鲜血清样本,PC为质控品样本。

2.2 正确度 另一个批号校准品测定均值分别是7.1 $\mu\text{g/mL}$ 和25.32 $\mu\text{g/mL}$,与配套校准品标示值相对偏倚分别为1.42%和1.27%。

2.3 抗干扰评价 低值和高值血清1,5-AG浓度基础样本重复10次测定,均值为7.1 $\mu\text{g/mL}$ 和25.2 $\mu\text{g/mL}$ 。当TG \leq 500 mg/dL、Bil \leq 50 mg/dL、Hb \leq 20 mg/dL、VitC \leq 50 mg/dL时,吡喃糖氧化酶法检测血清1,5-AG基本无干扰,见表2。

表2 吡喃糖氧化酶法检测血清1,5-AG干扰评价结果

1,5-AG	TG (mg/dL)				Bil (mg/dL)				Hb (mg/dL)				VitC (mg/dL)			
	500	250	125	空白	50	25	12.5	空白	20	10	5	空白	50	25	12.5	空白
低浓度	-0.58	-2.25	-0.34	0.00	-1.32	0.65	1.55	0.00	-0.49	-1.58	-0.91	0.00	-0.49	-1.58	-0.91	0.00
高浓度	-0.49	-1.58	-0.91	0.00	0.32	0.96	0.39	0.00	-0.70	-1.06	-0.42	0.00	-0.35	1.92	-0.35	0.00

2.4 AMR评价 8个系类浓度血清1,5-AG样本的重复测量结果的均值分别为49.82 $\mu\text{g/mL}$ 、42.99 $\mu\text{g/mL}$ 、35.99 $\mu\text{g/mL}$ 、28.86 $\mu\text{g/mL}$ 、21.71 $\mu\text{g/mL}$ 、14.75 $\mu\text{g/mL}$ 、7.23 $\mu\text{g/mL}$ 、0.16 $\mu\text{g/mL}$,重复测量误差变异系数 $<2.0\%$,小于设定的允许误差目标5%。以理论值为X轴,测定均值为Y轴,进行多项式回归分析,结果见表3。二次多项回归式中非线性系数b2(-3.391)具有显著性,三次回归中的非线性系数b2(0.090)、b3(-0.660)均不具显著性,二次多项式有较小的回归标准误,所以最合适多项式为二次,最佳拟合方程为二元一次多项式,则认为存在线性关系。本项目在0.16~49.82 $\mu\text{g/mL}$ 的线性范围内,为临床可接受线性范围。

表3 吡喃糖氧化酶法检测血清1,5-AG多项式回归分析结果

阶别	系数符号	系数值	系数E	t检验	自由度	回归标准误
1	b0	0.141	0.123	1.151	14	0.189
	b1	1.002	0.004	243.353		
2	b0	-0.073	0.097	-0.746	12	0.114
	b1	1.032	0.009	113.466		
	b2	-0.001	0.000	-3.391		
3	b0	-0.036	0.117	-0.308	10	0.121
	b1	1.019	0.022	46.616		
	b2	9.520E-5	0.001	0.090		
	b3	-9.189E-6	0.000	-0.660		

2.5 CRR评价 标本经2~32倍稀释后,确定样本最大稀释倍数是32倍及确定稀释后的可靠低限是0.35 $\mu\text{g/mL}$ 。回收率均落在90%~110%的最大稀释倍

数值,故其可报告的临床范围为 0.35~1 594.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$,可以满足临床的需求,见表 4。

表 4 吡喃糖氧化酶法检测血清 1,5-AG 稀释回收率测定结果

稀释倍数	实测均值($\mu\text{g}/\text{mL}$)	理论值($\mu\text{g}/\text{mL}$)	回收率(%)	结论
原倍	47.73	47.73	100.00	通过
2	23.65	23.86	99.12	通过
4	11.99	11.93	100.50	通过
8	5.95	5.96	99.83	通过
16	3.00	2.98	100.50	通过
32	1.54	1.49	103.35	通过

2.6 生物参考区间验证 20 名健康个体血清 1,5-AG 浓度除了一个检测值(12.68 $\mu\text{g}/\text{mL}$)低于商家提供的参考区间外,其余均在厂家提供的参考区间内。

3 讨论

血清 1,5-AG 作为一个新的糖尿病诊断指标,其筛查糖尿病的临床价值初露端倪,适于临床推广。1,5-AG 测定方法有很多种,如质谱分析法、高效液相色谱法、微柱层析法等,这些方法虽然较灵敏,但是操作繁琐、费时、设备要求高。吡喃糖氧化酶法检测血清 1,5-AG 可在生化分析仪上实现全自动化操作,微量简单快速,符合临床检测的要求^[4,9]。实验室在使用新的仪器设备或检测方法时,应对其方法学主要性能参数进行初步评估。结合本实验室具体实际,本研究评价国内常用生化分析仪德国西门子 ADVIA2400 采用吡喃糖氧化酶法检测血清 1,5-AG 的主要分析性能。

本研究参照 EP5-A2 文件,验证厂商声明的精密度性能。结果显示批内和批间的精密度均低于厂商的声明和基于生物学变异的精密度质量规范,说明吡喃糖氧化酶法检测血清 1,5-AG 重复性好、结果稳定,能够满足临床检测的要求。正确度验证采用北京九强公司提供另一个批号校准物,其校准物具有可靠的溯源性,结果显示相对偏倚分别为 1.42% 和 1.27%,均小于基于生物学变异设定质量规范中的允许误差,正确度性能得到验证,说明吡喃糖氧化酶法检测血清 1,5-AG 正确度高可满足质量要求。抗干扰评估显示吡喃糖氧化酶法检测血清 1,5-AG 具有良好的抗脂血、黄疸和溶血等干扰能力。AMR 验证对数据进行多项式回归分析,则认为血清 1,5-AG 浓度在 0.16~49.82 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内存在线性关系,该范围在厂家提供的范围内并且涵盖了临床医学决定水平。CRR 范围为 0.35~

1 594.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$,最大稀释倍数为 32 倍,能够满足临床的要求。厂家提供的参考区间得到验证,说明该范围有效,适合本实验室所在地区。

综上所述,吡喃糖氧化酶法检测血清 1,5-AG 的各项性能均符合临床检测要求。目前 1,5-AG 在国内外未有标准参考方法和参考物质可供选择,其检测方法的标准化和质量评价没有建立统一的标准,各生产厂商试剂盒的检测标准各异,实验室间的结果差异仍将存在。1,5-AG 的检测仍有其局限性和诸多方面需要更多的研究。1,5-AG 作为近年来开始在临床逐步推广应用的新项目,本室将继续参考相关评价文件进行后续方法学和临床应用的研究,为实现 1,5-AG 标准化和一致性提供必要的基础。

参考文献

- [1] SELVIN E, WANG D, MCEVOY JW, et al. Response of 1, 5-anhydroglucitol level to intensive glucose- and blood-pressure lowering interventions, and its associations with clinical outcomes in the ADVANCE trial [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2019, 21(8): 2017-2023.
- [2] WARREN B, LEE AK, BALLANTYNE CM, et al. Diagnostic performance of 1,5-anhydroglucitol compared to 2-H glucose in the atherosclerosis risk in communities study [J]. *Clin Chem*, 2018, 64(10): 1536-1537.
- [3] BAI Y, YANG R, SONG Y, et al. Serum 1,5-anhydroglucitol concentrations remain valid as a glycemic control marker in diabetes with earlier chronic kidney disease stages [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2019, 127(4): 220-225.
- [4] ZHOU ZD, ZHAO L, WANG ZH, et al. Colorimetric detection of 1,5-anhydroglucitol based on graphene quantum dots and enzyme-catalyzed reaction [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 2(112): 1217-1224.
- [5] NCCLS EP5-A2. Evaluation of precision performance of quantitative measurement procedures: approved guideline-second edition [S]. NCCLS, 2004.
- [6] NCCLS EP7-A2. Interference testing in clinical chemistry; approved guideline-second edition [S]. NCCLS, 2005.
- [7] NCCLS EP6-A. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline [S]. NCCLS, 2003.
- [8] NCCLS C28-A2. How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline-second edition [S]. NCCLS, 2000.
- [9] YING L, MA X, YIN J, et al. The metabolism and transport of 1, 5-anhydroglucitol in cells [J]. *Acta Diabetol*, 2018, 55(3): 279-286.

(收稿日期:2019-09-23)