

# 자동화학분석기에서의 라텍스 면역비탁법의 Autolab HbA<sub>1c</sub> 평가

## Evaluation of HbA<sub>1c</sub> Levels Via the Latex Immunoturbidimetric Method by Using Chemistry Autoanalyzer

조용준 · 이소영 · 박해일 · 김영식 · 이제훈 · 김용구 · 한경자

Yongjun Jo, M.D., So-young Lee, M.D., Hae-il Park, M.D., YeongSic Kim, M.D., Jehoon Lee, M.D., Yonggoo Kim, M.D., Kyungja Han, M.D.

가톨릭대학교 의과대학 진단검사의학교실

Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

**Background:** Measurement of HbA<sub>1c</sub> levels is widely used to diagnose diabetes mellitus and to evaluate and monitor plasma-glucose concentrations over 6-8 weeks. In this study, we evaluated the diagnostic performance of the newly developed latex immunoturbidimetric method by using Autolab HbA<sub>1c</sub>.

**Methods:** We analyzed and compared the diagnostic performance of Autolab HbA<sub>1c</sub> with that of Toshiba 200FR between April 2009 and July 2009. According to guidelines (EP5-A2, EP6-P, EP9-A2) of the clinical and laboratory standards institute (CLSI), we compared linearity, precision and correlation of Autolab HbA<sub>1c</sub> with those of G7 (Tosoh Corp., Kyoto, Japan) by using high-performance liquid chromatography (HPLC) method.

**Results:** Data obtained using Autolab HbA<sub>1c</sub> showed good linearity in mixtures of samples with low (3.1%) and high (15.1%) levels of HbA<sub>1c</sub> ( $r^2 = 0.9997$ ). In the analysis of within-run precision of the samples with HbA<sub>1c</sub> levels of 5.1% and 12.1%, the SDs were 0.04 and 0.06 and covariances of these samples were 0.8% and 0.5%, respectively. In the Deming regression model, the regression equation was as follows: Autolab HbA<sub>1c</sub> =  $1.0859 \times \text{Tosoh HPLC} - 0.6957$ .

**Conclusions:** In this study, Autolab HbA<sub>1c</sub> method showed better performance characteristics than Tosoh G7 did. In reference review, there was no interference of variant hemoglobin. The data acquisition time of Autolab HbA<sub>1c</sub> was lower than that of Tosoh G7. The advantages of Autolab HbA<sub>1c</sub> are that it can be used as an autoanalyzer in routine chemical analysis, it does not require pre-analytical treatment, and the samples are automatically treated with distilled water for hemolysis.

**Key Words:** HbA<sub>1c</sub>, Immunoturbidimetric method, HPLC

## 서론

당뇨병은 대표적인 만성질환으로 2010년에 전세계적으로 3억여

명의 환자가 추산되며 2030년에는 4억 4천여 명의 환자가 존재할 것으로 예상되는 질환으로[1], 한국에서도 유병률이 2009년 인구 10만 명당 19.6명으로 조사되었고[2] 2009년 한국인의 사망원인 중 5위를 차지하고 있다[3]. 당뇨병으로 인한 합병증과 사망을 줄이기 위해서는 엄격한 혈당 관리가 필요하며[4, 5] 관리의 지표로 HbA<sub>1c</sub> 나 fructosamine, 당화알부민 등이 사용되고 있다.

HbA<sub>1c</sub>는 당화혈색소의 일종으로 혈색소의  $\beta$  사슬의 N-말단에 발린(valine)에 혈당이 비가역적으로 결합하여 형성된 것으로 최근 6-8주간의 혈당조절을 반영하며 최근 미국당뇨학회(American Diabetes Association)에서 당뇨의 진단 및 고위험군 선정기준에 포함됐다[6]. 이 진단기준에 의하면 National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP)의 인증을 받고 Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) 참고법으로 표준화된 검사법의 결과가 6.5% 이상이면 당뇨병으로 진단되며 5.7-6.4%인 경우 당뇨병의

Corresponding author: Jehoon Lee, M.D.

Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, The Catholic University of Korea Yeouido St. Mary's Hospital, 62 Yeouido-dong Yeongdeungpo-gu, Seoul 150-713, Korea  
Tel: +82-2-3779-1297, Fax: +82-2-3779-2285, E-mail: lyejh@catholic.ac.kr

Received: December 10, 2010

Revision received: August 8, 2011

Accepted: August 9, 2011

This article is available from <http://www.labmedonline.org>

© 2012, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

고위험군으로 분류할 수 있다. HbA<sub>1c</sub>를 측정하는 방법으로는 전하 차이를 통한 방법(ion-exchange chromatography, high-performance liquid chromatography-HPLC, electrophoresis, isoelectric focusing), 구조의 차이를 통한 방법(affinity chromatography, immunoassay), 화학적 분석 방법(photometry, spectrophotometry)으로 나눌 수 있으며[7] 1995년에는 친화크로마토그래피방법을 많이 사용하였으나 2007년 조사에서는 면역분석법과 이온교환 방식을 99% 이상 사용하는 것으로 나타났다[8]. 2009년에 국내에서 시행된 대사질환검사 신빙도 조사에 의하면 196기관 중 84% 이상의 기관에서 면역분석법과 HPLC법을 사용하고 있는 것으로 조사되었다[9]. 이러한 분석 방법의 변화는 임상검사실에서 분석이 편리한 방법을 선호하는 것을 나타낸다[8]. 최근 IVD lab회사에서 개발된 Autolab HbA<sub>1c</sub> (IVD lab, Suwon, Korea)는 라텍스 면역비탁법을 사용하여 HbA<sub>1c</sub>를 측정하는 방법으로 전용분석장비가 필요하지 않고 자동화학분석기에 적용이 가능하며 전처리 과정이 필요하지 않으며 용혈액으로 증류수 사용이 가능하여 검사 단가가 낮아지는 장점을 가지고 있다. HPLC 방법인 Tosoh G7 (Tosoh Corp., Kyoto, Japan) 간의 결과를 비교하여 Autolab HbA<sub>1c</sub>의 분석 능력과 임상검사실에서의 유용성을 평가하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

2009년 4월부터 7월까지 본원 검사실에 HbA<sub>1c</sub> 검사가 의뢰된 환자의 EDTA 항응고처리된 전혈검체를 이용하여 직선성, 상관성, 검체침강에 따른 영향을 평가하였다. 채혈한 지 일주일 이내의 신선한 검체만을 사용하였으며 평가 이외에는 4℃의 냉장고에 보관하였다.

### 2. 검사법

#### 1) Autolab HbA<sub>1c</sub>

Autolab HbA<sub>1c</sub>는 전혈에서 HbA<sub>1c</sub>를 직접적으로 측정하는 방법으로 라텍스 면역비탁법을 이용한다. 전용장비가 필요하지 않으며 자동화학분석기에서 사용이 가능하다. 자동화학분석기에 항응고제로 처리된 전혈검체를 장착하면 검체 흡입 후 증류수로 용혈한다. 제1반응을 통하여 헤모글로빈과 HbA<sub>1c</sub>가 라텍스 입자와 균일한 비율로 반응하게 되며 제2반응을 통하여 mouse anti human HbA<sub>1c</sub> 단클론항체와 anti-mouse IgG 다클론항체 복합체가 라텍스 복합체 HbA<sub>1c</sub>와 반응한다. 응집의 정도는 라텍스에 흡착된 HbA<sub>1c</sub>의 농도에 비례하고 이때의 흡광도를 660 nm의 파장으로 측정하여 %결과값을 얻는다. Autolab HbA<sub>1c</sub>는 2010년 10월 1일에 NGSP로부터 DCCT에 대한 표준화된 방법으로 인증을 받았으며 제조사

가 밝힌 직선성은 2.0-16.0%이다.

#### 2) Tosoh G7

Tosoh G7은 이온교환 HPLC를 기본원리로 하여 HbA<sub>1c</sub>를 포함한 혈색소 분획을 분석하는 장비로 전혈검체가 기기에 장착되면 장비에서 검체를 흡입하여 용혈 희석 후 분석하게 된다. 칼럼을 통과하면서 여러 혈색소 성분들이 분리되어 415 nm에서의 흡광도를 측정하여 HbA<sub>1c</sub>의 %값을 계산하게 된다.

### 3. 평가방법

Autolab HbA<sub>1c</sub>의 직선성, 정밀도, 상관성은 본원에서 사용하는 TBA-200FR (Toshiba Medical Systems, Tokyo, Japan)으로 측정하여 평가하였고 혈액침강에 따른 변화는 Hitachi 7600 (Hitachi, Tokyo, Japan)에서 2009년 4월부터 7월까지 진행하였다. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) 가이드라인(EP5-A2, EP6-A, EP9-A2)을 참조하여 정밀도, 직선성, 상관성을 분석하였고, 정도관리물질은 시약에 동봉된 저농도와 고농도의 정도관리물질을 사용하였다.

#### 1) 직선성

직선성 평가는 CLSI EP06-A의 지침에 따라 실시하였다[10]. 저농도(3.1%), 고농도(15.1%) 검체를 희석하여 5가지 단계의 농도물질(3.1%, 6.1%, 9.1%, 12.1%, 15.1%)을 제조한 후 TBA-200FR에 각각 2회 측정하였다. StatPro v.1.11.50 (Analyse-it Software Ltd., Leeds, UK)으로 검증을 하였고 회귀선이 일차 선형이고 유의한 적합성 결여가 없는 경우 직선성이 있다고 판정하였다.

#### 2) 정밀도

제조사에서 제공되는 저농도와 고농도 정도관리물질을 CLSI EP05-A2를 일부 변형하여 2가지 정도관리물질을 하루 2회, 1회에 2번씩 총 20일간 측정하여 검사 일내 정밀도와 검사 일간 정밀도를 시행하였다[11]. 오전/오후에 나눠서 측정하였으며 1회의 검사 후에는 최소 30분 이상의 간격을 두고 시행하였다.

#### 3) 상관성

CLSI EP09-A2 지침에 따라 Tosoh G7으로 측정된 HbA<sub>1c</sub>의 값이 5.1-10.2%인 검체 40개를 선정하여 HPLC인 Tosoh G7방식과 TBA-200FR에 Autolab HbA<sub>1c</sub>를 사용하여 2회씩 측정 후 데밍 회귀분석을 시행하였다[12].

#### 4) 혈액침강과 HbA<sub>1c</sub>값의 변화측정

검사대기시간에 따른 영향을 파악하기 위해서 Tosoh G7에서

4.6-8.8%의 결과값을 나타내는 48개 검체를 대상으로 하여 Hitachi 7600에서 측정하였다. 측정방식은 검체를 잘 섞은 후 측정값을 기준으로 한 후 안정화 시간을 25분씩 증가시키며 측정하였다. 측정하기 전에 검체를 흔들어 섞어주었다.

#### 4. 분석도구

StatisPro v.1.11.50 (Analyse-it Software Ltd., Leeds, UK)와 MedCalc v.11.2.1.0 (MedCalc software, Broekstraat, Belgium), Excel 2007 (Microsoft Corporation, WA, USA)을 이용하였다.

## 결 과

#### 1. 직선성

Autolab HbA<sub>1c</sub>는 저농도(3.1%)와 고농도(15.1%)의 검체를 이용하여 5단계의 농도를 분석한 결과  $r^2 = 0.9997$ 의 높은 직선성을 나타내었고 유의한 적합성 결여가 관찰되지 않았다(Fig. 1).

#### 2. 정밀도

농도 12.1% 검체의 경우 검사 일내 정밀도와 검사 일간 정밀도의 표준편차는 각각 0.06, 0.12였고 변이계수는 0.5%, 1.0%였다. 농도

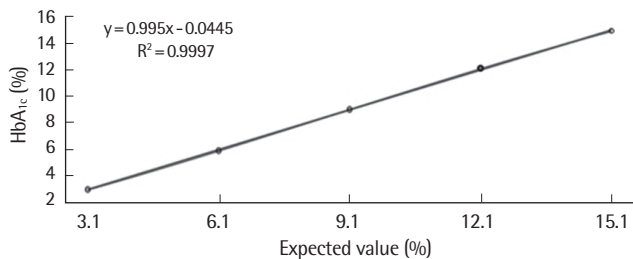


Fig. 1. Linearity of HbA<sub>1c</sub> values as measured by Autolab HbA<sub>1c</sub>.

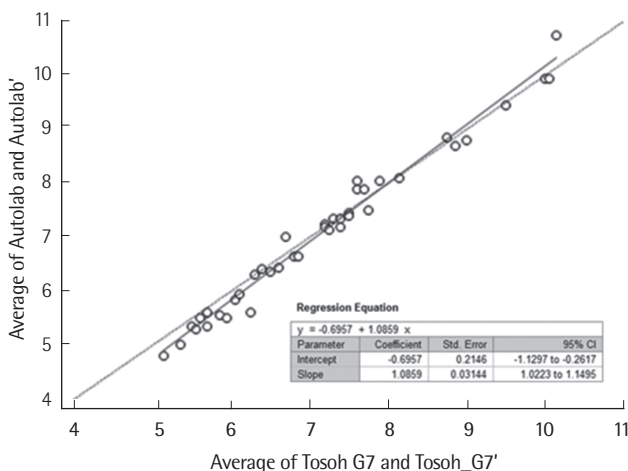


Fig. 2. Deming regression plot of Tosoh G7 vs. Autolab HbA<sub>1c</sub>.

5.1% 검체의 경우 각각 표준편차는 0.04, 0.08이었고 변이계수는 0.8%, 1.6%이었다. 제조사에서 제시한 검사 일내 정밀도의 표준편차와 변이계수는 각각 4.76%의 농도에서 0.06와 1.26%, 7.29% 농도에서 0.08과 1.1%, 10.9% 농도에서 0.16과 1.47%이었다.

#### 3. 상관성

비교식은  $\text{Autolab HbA}_{1c} = 1.0859 \times \text{Tosoh G7} - 0.6957$ 로 나타났다(Fig. 2). 기울기와 절편의 95% 구간은 각각 1.0223-1.1495, -1.1297--0.2617이었다. Tosoh G7값이 6.4% 미만의 경우 0.26의 음의 바이어스가, 6.4% 이상 7.6% 미만에서는 0.05의 음의 바이어스, 7.6% 이상의 농도에서 0.07의 양의 바이어스가 관찰되었다(Fig. 3).

#### 4. 혈액침강과 HbA<sub>1c</sub>와의 관계

총 48검체를 검사하였으며 한 검체는 재검한 결과를 반영하였다. 처음 결과와 비교하여 최대  $\pm 0.2\%$ 의 차이를 보였으며 평균적으로

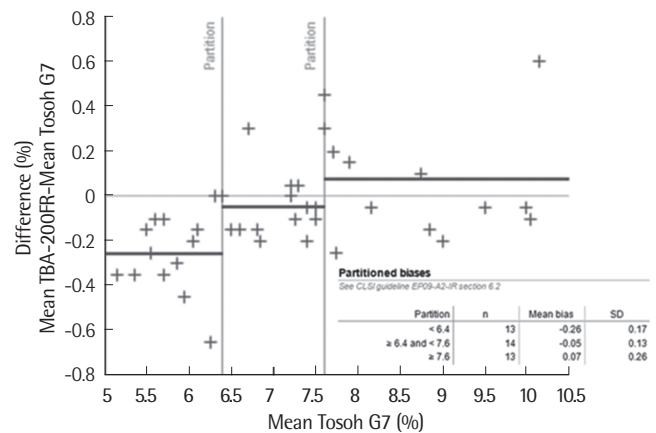


Fig. 3. Difference plot between Autolab HbA<sub>1c</sub> and Tosoh G7.

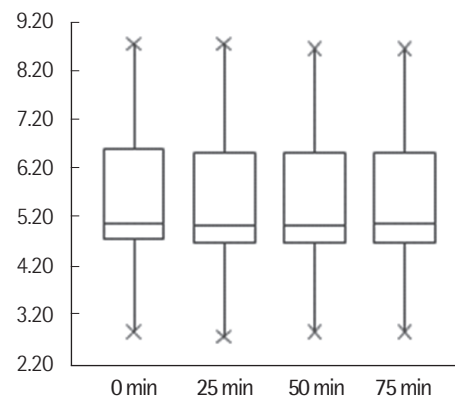


Fig. 4. Changes in HbA<sub>1c</sub> levels with the length of time after the samples were mixed.

25분 경과 시 0.008%, 50분 경과 시 0.037%, 75분 경과 시 0.037% 낮게 측정되었다(Fig. 4).

## 고 찰

HbA<sub>1c</sub>는 6-8주간의 혈당을 반영하고 당뇨병의 경과와 진단, 고위험군 분류에 사용되고 있다[6, 13]. HbA<sub>1c</sub>를 측정하는 여러 방법들이 존재하지만 방식과 제조회사에 따라서 측정된 결과의 차이를 보인다[14]. 이를 해결하기 위해 2001년 7월에 International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)에 의해 표준화된 방식이 도입되었다. NGSP방식은 %로, IFCC방식은 mmol/mol으로 결과가 다르게 표현되는데 IFCC방식의 경우 DCCT에서 사용된 방법보다 1.5-2% 정도 낮게 측정된다[15]. 이러한 차이 때문에 IFCC 결과수치를 NGSP방식으로 보고할 때는  $NGSP = [0.09148 \times IFCC] + 2.152$ 의 식에 의해 변환해 주어야 하며 최근의 consensus에 의하면 두 가지 방식의 결과를 동시에 보고하도록 권장하고 있다[16]. 그러나 IFCC의 표준 방식은 매우 특이적이고 분석시간이 오래 걸리며 기술적으로 복잡하고, 검사 비용이 비싸므로 일반 임상분석에서는 사용하기 어렵고 여러 검사법에 대한 기준으로 사용하고 있다.

Autolab HbA<sub>1c</sub>는 직선성, 정밀도, 상관성에서 좋은 수행 능력을 보였다. Tosoh G7과 비교하여 농도에 따른 바이어스가 다른 것으로 나타났지만 변환식을 통해서 교정이 가능한 것으로 생각된다.

검체침강시간에 따른 평가 결과에 의하면 침강시간에 따라 HbA<sub>1c</sub> 농도의 감소가 관찰되지만 75분 후에 측정하여도 0.05% 이내로 임상적 해석에서는 무시할 수 있는 수준으로 생각된다[13].

HbA<sub>1c</sub>를 측정함에 있어서 중요한 변수 중의 하나는 변이형 혈색소에 따른 HbA<sub>1c</sub> 결과의 차이이다. 본 연구에서 변이형 혈색소에 의한 간섭은 평가하지 못했지만 HbA<sub>1c</sub> 측정방식과 변이형 혈색소에 따른 간섭을 고찰한 논문에 따르면 같은 분석 방식에서도 측정 기기에 따른 간섭이 다른 것으로 나타났다[17]. 본 연구에서는 평가한 Autolab HbA<sub>1c</sub>와 유사한 라텍스 면역비탁법을 사용하는[18] Hitachi Tina Quant 방식은 HbAS, HbAC, HbAE, HbAD에 의한 간섭이 없는 것으로 조사되었는데 이는 Autolab HbA<sub>1c</sub>방식이 HbA<sub>1c</sub>의 N-말단의 당화 아미노산 염기에 특이적인 항체를 사용하기 때문으로 생각되나 전세계적으로 흔한 HbS, HbE, HbC, HbD뿐만 아니라[17] 한국인에게 흔한 HbG Coughatta, Hb Queens에 대한 평가가 필요할 것으로 생각된다[19].

Autolab HbA<sub>1c</sub>는 기존에 널리 사용되고 있는 Tosoh G7와 비교하여 좋은 수행능력을 나타냈고 용혈과정에서 증류수를 사용할 수 있고 검체 마개 제거 과정이 필요하지 않으며 전용분석장비를 필요치 않고 일반자동화학분석 장비에 이용이 가능하다. 따라서 관련 시약 구입 비용이 감소하게 되며 검사방법이 용이하다. 다만

Tosoh G7에서는 10검체를 검사하는 데 13분 정도 소요되는데 Autolab HbA<sub>1c</sub>는 15분 정도 소요되어 결과획득시간이 지연되는 것으로 나타났다. 그리고 검체침강으로 인해 혈장이 일부 분리되어 장비가 검체를 채취할 때 오류가 발생할 수 있기 때문에 분석 전에 잘 섞은 후 검사를 시행해야 검사대기시간에 따른 오류를 줄일 수 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

**배경:** HbA<sub>1c</sub>의 측정은 최근 6-8주간의 혈당조절을 평가하고 당뇨병을 진단하기 위해 사용되고 있다. 최근 라텍스 면역비탁법을 사용하는 HbA<sub>1c</sub> 측정법이 개발되어 분석 능력과 임상검사에서 유용성을 평가하였다.

**방법:** 2009년 4월부터 7월까지 TBA-200FR에 Autolab HbA<sub>1c</sub>를 장착하여 CLSI guideline (EP5-A2, EP6-P, EP9-A2)에 따라 직선성, 정밀도, 상관성을 평가하였다.

**결과:** Autolab HbA<sub>1c</sub>는 고농도(15.1%)와 저농도(3.1%)의 검체의 혼합에서  $r^2 = 0.9997$ 의 높은 직선성을 보였다. 12.1%의 경우 검사 일 내 정밀도와 검사 일간 정밀도의 표준편차는 각각 0.06, 0.12였고 변이계수는 0.5%, 1.0%였다. 5.1%의 경우 각각 표준편차는 0.04, 0.09이었고 변이계수는 0.8%, 1.6%이었다. 비교식은  $Autolab\ HbA_{1c} = 1.0859 \times HPLC - 0.6957$ 이었다.

**결론:** 본 연구에서 Autolab HbA<sub>1c</sub>는 Tosoh G7과 비교하여 좋은 수행능력을 보였다. 문헌고찰에서 변이형 혈색소에 따른 간섭은 없는 것으로 알려졌다. Tosoh G7에 비해 결과획득시간은 지연되는 단점이 있지만 Autolab HbA<sub>1c</sub>의 장점은 일반 화학분석기에 적용이 가능하고 검체의 전처리가 필요없으며 증류수를 사용하여 자동적으로 용혈과정이 이루어진다는 점이다.

## 감사의 글

본 연구는 지식경제부 산업원천기술 개발사업의 지원으로 이루어졌습니다.

## 참고문헌

1. International diabetes federation (Eds), Global burden: prevalence and projections. 2010 and 2030. <http://www.idf.org/diabetesatlas/diabetes-and-impaired-glucose-tolerance> (Updated on Nov 2010).
2. Statistics Korea (Eds), Chronic disease statistics of Korea. [http://www.index.go.kr/egams/stts/jsp/potal/stts/PO\\_STTS\\_IdxMain.jsp?idx\\_cd=1438](http://www.index.go.kr/egams/stts/jsp/potal/stts/PO_STTS_IdxMain.jsp?idx_cd=1438) (Updated on May 2011).

3. Statistics Korea. Cause of death statistics of Korea. [http://kostat.go.kr/portal/korea/kor\\_nw/2/6/1/index.board?bmode=read&bSeq=&aSeq=179505&pageNo=1&rowNum=10&navCount=10&currPg=&sTarget=title&sTxt](http://kostat.go.kr/portal/korea/kor_nw/2/6/1/index.board?bmode=read&bSeq=&aSeq=179505&pageNo=1&rowNum=10&navCount=10&currPg=&sTarget=title&sTxt) (Updated on Nov 2010).
4. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;329:977-86.
5. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998;352:837-53.
6. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2011;34(S1):S62-9.
7. Burtis CA, Ashwood ER, et al. eds. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 4th ed. Washington, D.C: Saunders, 2006: 880-3.
8. Molinaro RJ. Targeting HbA<sub>1c</sub>: standardization and clinical laboratory measurement. *MLO Med Lab Obs* 2008;40:10-4, 16-9.
9. Song J, Kwon KC, Kim JH, Kim JW, Min WK, Lee SY, et al. Annual report on external quality assessment in metabolic disorders in Korea (2009). *J Lab Med Qual Assur* 2010;32:131-46.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline. Document EP6-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; approved guideline. 2nd ed. Document EP5-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2004.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Method comparison and bias estimation using patient samples; approved guideline. 2nd ed. Document EP9-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002.
13. Little RR and Sacks DB. HbA<sub>1c</sub>: how do we measure it and what does it mean? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2009;16:113-8.
14. Caragher TE, Dohnal JC, Lomont ME. Cautionary note regarding HbA<sub>1c</sub> methods predicting the clinical status of diabetic patients. *Diabetes Care* 2000;23:867-9.
15. Kilpatrick ES. HbA<sub>1c</sub> measurement. *J Clin Pathol* 2004;57:344-5.
16. Hanas R, John G, International HbA<sub>1c</sub> Consensus Committee. 2010 consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A1C measurement. *Diabetes Care* 2010;33:1903-4.
17. Little RR and Roberts WL. A review of variant hemoglobins interfering with hemoglobin A1c measurement. *J Diabetes Sci Technol* 2009;3: 446-51.
18. Jones TG, Warber KD, Roberts BD. Analysis of hemoglobin A1c from dried blood spot samples with the Tina-quantR II immunoturbidimetric method. *J Diabetes Sci Technol* 2010;4:244-9.
19. Lee ST, Kim MS, Choi DY, Kim SK, Ki CS. Incidence of variant hemoglobin (Hb) and increased fetal Hb concentrations and their effect on HbA<sub>1c</sub> measurement in a Korean population. *Clin Chem* 2006;52:1445-6.