

당화혈색소 측정을 위한 Norudia[®] HbA1c 키트의 평가

주성대학 임상병리과¹, 충북대학병원 병리과²

홍 승 복¹ · 김 은 중²

Evaluation of Norudia[®] HbA1c Kit for Glycohemoglobin Assay

Seung-Bok Hong¹ and Eun-Joong Kim²

Department of Clinical Laboratory Science, Juseong College, Cheogwon 363-764, Korea¹

Department of Pathology, Chungbuk National University Hospital, Cheongju 361-711, Korea²

Measurement of hemoglobin A1c is used as an objective indicator of long-term blood glucose control in diabetic patients. We evaluated recently introduced Norudia[®] HbA1c (Daiichi Pure Chemical Co. Ltd, Tokyo, Japan) test reagent using enzyme method for HbA1c assay. Linearity, precision and correlation with VARIANT[™] II Turbo HbA1c analyzer (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) were evaluated. The reference range was determined from 201 healthy subjects. The Norudia[®] HbA1c test reagent was founded to be linear in a range of 5.6% to 14.0% ($r^2=0.9885$). The within-run and between-day precision were 0.954% and 1.03% for low level (HbA1c 5.24%), 0.67% and 1.28% for high level (HbA1c 9.01%), respectively. Comparison study between Norudia[®] HbA1c test reagent and VARIANT[™] II Turbo showed good correlation with a slope of 1.0489, an intercept at -0.9717, and coefficient of correlation was 0.9907. The reference range of HbA1c obtained from this reagent was 4.07-5.50%. The Norudia[®] HbA1c test reagent showed good linearity, precision and correlation with HbA1c analyzer with HPLC method. In addition, the exclusive analyzer is not required for assay and then this kit may be useful for HbA1c assay in clinical laboratory.

Key Words : HbA1c, Norudia[®] HbA1c test reagent, VARIANT[™] II Turbo, Evaluation

I. 서 론

당화혈색소(glycosylated hemoglobin)의 75%가 과거 2개월 내의 혈당치에 의해 결정되므로 당화혈색소는 과거 2~4개월 동안의 평균적인 혈당 조절 상태를 반영한다(Koenig 등, 1976a; Koenig 등, 1976b; Tahara와 Shima,

1993). 당화혈색소의 측정방법 중 전하 차이에 근거한 검사법에는 이온교환크로마토그래피법, 고속액체크로마토그래피법(HPLC) 및 전기영동법 등이 있고 구조적 차이에 근거한 검사법에는 친화크로마토그래피법(affinity chromatography)과 면역분석법(immunoassay)이 있다(Sacks 등, 2006). 현재 국내에서는 당화혈색소 측정은 HPLC 방법을 사용하는 검사실이 가장 많은데, 검사건수가 많을수록 HPLC 방법을 보다 많이 사용하고 있는 실정이다(송, 2007).

당화혈색소 측정에서 검체 자체에 의한 오류와 검사방

교신저자 : 홍승복, (우)363-794 충북 청원군 내수읍 덕암리 산4
주성대학 임상병리과
TEL : 043-210-8308, 011-9321-7056
E-Mail : sbhong@jsc.ac.kr

법에 의한 오류가 발생할 수 있다. 불안정한 중간산물인 Schiff 염기 및 다양한 혈색소 유도체는 전하차에 의한 분석법으로 측정할 경우 오류가 생길 수 있는데 이는 검사 방법에 의한 오류라 할 수 있다(Sacks 등, 2006). 한편 대부분의 검사실에서 당화혈색소 분석기가 1 대인 경우가 많으며 이 경우 장비의 고장에 의해 검사결과와 보고가 늦어 질 수도 있다. 결국 검사 방법 간 오류 교정이나 기기의 백업 목적으로 서로 다른 측정법을 보유하는 것은 임상 검사실에서 매우 유용할 수 있다.

최근에 국내에 소개된 Norudia[®] HbA1c(Daiichi Pure Chemical Co. LTD, Tokyo, Japan) 방법의 측정원리는 효소법이며 특이하게 당화혈색소만의 베타쇄의 N 말단에 유래하는 당화 이중펩타이드(glycosylated dipeptide)를 측정하는 방법이다. 혈색소 베타쇄와 3가지 효소(protease, fructosyl-peptide oxidase, peroxidase)에 의해 생성된 색고정 물질의 색을 흡광도로 측정한다. 이 원리는 화학분석기의 대부분의 측정원리와 유사하므로 전용측정기가 필요 없고 일반화학분석기기로도 측정이 가능하다. 그러나 아직까지 이 시약에 대한 기존 방법들과 비교된 국내의 보고가 없어 이 시약을 현재 국내에서 가장 많이 이용하고 있는 HPLC 방법과 비교하여 보았다.

II. 재료 및 방법

2008년 2-3월 사이에 한 대학병원 진단검사의학과에 의뢰된 HbA1c 검사 검체 85 예와 건강검진을 위해 내원한 201 명(남 102 명, 여 99 명)의 검체를 이용하였다.

1. 직선성 평가

이온교환 HPLC 방법인 기존의 VARIANT[™] II Turbo (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) 방법으로 측정된 HbA1c 치가 5.6%와 14.0% 인 두 검체를 저농도와 고농도의 검체로 하여 4:0, 3:1, 2:2, 1:3, 0:4의 비율로 섞어, 각각을 Norudia[®] HbA1c로 4 회 반복 측정된 측정치와 계산치를 회귀 분석하여 회귀방정식과 결정계수를 구하였다(NCCLS, 2003).

2. 정밀도 평가

기존 기기로 측정된 HbA1c의 측정치에 따라 검체를 저농도군(5.24%)과 고농도군(9.01%)으로 각각 나누어 각 군의 혼주 전혈을 만든 후 8개의 동일 검체로 나누어 4℃에 냉장 보관하면서 8일간 연속하여 Norudia[®] HbA1c로 측정하였다. 각 군의 검체는 2 시간 간격을 두고 2 회 검사하였으며 각 검사 시에 두 번씩 반복 측정하여 검사내 정밀도와 검사일간 정밀도를 각각 구하였다(NCCLS, 1999). 기존 기기인 VARIANT[™] II Turbo HbA1c 측정기의 검사내 및 검사일간 정밀도도 같은 방법으로 측정하였다.

3. 상관성 평가

기존 기기에 의한 HbA1c의 측정치가 5.3%에서 16.5%의 범위에 속하는 85 검체를 선별하여 VARIANT[™] II Turbo 방법과 Norudia[®] HbA1c로 각각 2 회씩 측정하여 상관방정식과 상관계수를 구하였다(NCCLS, 1995).

4. 참고치 설정

건강검진을 위해 내원한 사람 중 혈당 및 일반혈액 검사 결과가 정상인 20~60대 사이의 201 명(남자 102 명, 여자 99 명)을 대상으로 Norudia[®] HbA1c로 측정하여 참고치를 구하였다.

III. 결 과

1. 직선성 평가

저농도와 고농도의 검체를 4:0, 3:1, 2:2, 1:3, 0:4의 비율로 섞어 만든 검체의 계산된 HbA1c 농도는 각각 5.6%, 7.7%, 9.8%, 11.9%, 14%, 이었으며, 측정치와 계산치로 구한 직선의 회귀방정식은 $y=1.0512x - 0.49$ 이었고 결정계수(r^2)는 0.9885 이었다(Fig. 1).

2. 정밀도 평가

Norudia[®] HbA1c 검사시약과 VARIANT[™] II Turbo HbA1c 측정기의 정밀도를 Table 1에 나타내었다. Norudia[®] HbA1c 검사시약의 검사내 정밀도의 변이계수는 저농도군이 0.954%(5.24% 농도)이었고 고농도군이 0.67%(9.01%)이었다. 검사일간 정밀도는 각각 1.03%와 1.28%

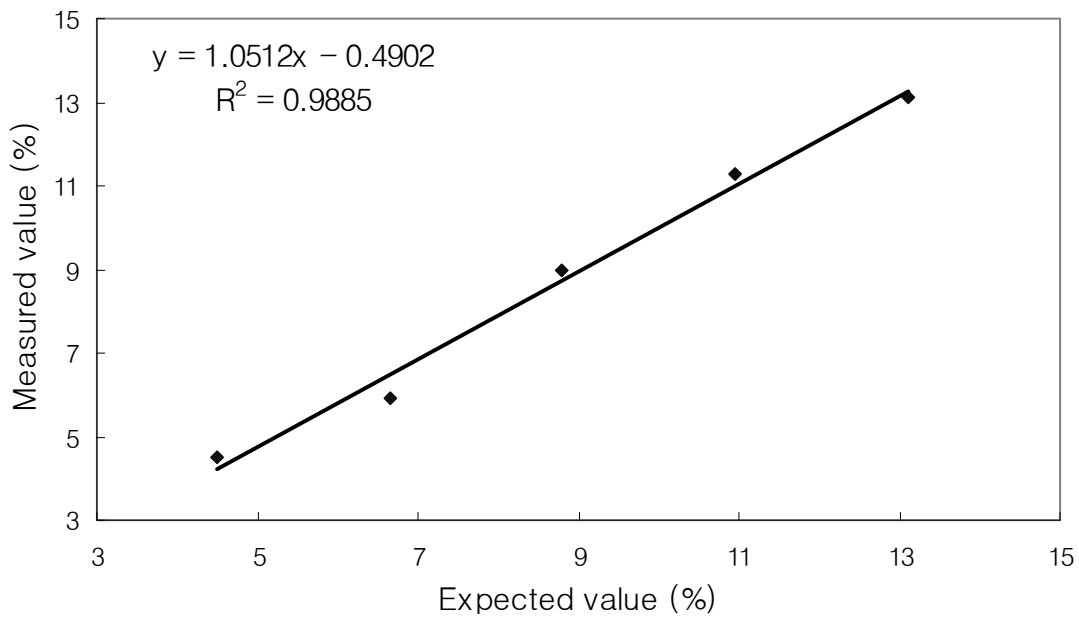


Fig. 1. Linearity of Norudia[®] HbA1c test reagent.

의 변이계수를 보였다.

IV. 고 찰

Table 1. Within-run and between-day precision of Norudia[®] HbA1c test reagent and VARIANT[™] II Turbo HbA1c analyzer

Parameter	Level of HbA1c			
	Norudia [®] HbA1c	VARIANT [™] II Turbo		
	Normal	High	Medium	High
Mean (% HbA1c)	5.24	9.01	7.79	9.20
Within-run CV (%)	0.95	0.67	1.09	0.39
Between-day CV (%)	1.03	1.28	2.87	1.68

3. 상관성 및 회귀분석 평가

VARIANT[™] II Turbo 방법과의 선형회귀분석 결과는 $y=1.0489x-0.9717$ 이었고 상관계수(r)는 0.9907이었다 ($p<0.001$)(Fig. 2).

4. 참고치 설정

102 명 및 99 명의 건강한 남, 여를 대상으로 설정한 참고범위는 남자에서 4.07~5.49% 그리고 여자에서 4.07~5.50% 이었다.

2007년 대한임상검사정도관리협회의 HbA1c의 검사방법에 대한 조사에서는 현재 국내에서 가장 많은 검사 방법은 HPLC 방법이며 중소 병원 검사실에서는 POCT 장비가 주로 이용되고 있다(송, 2007). 그 외 여러 가지 면역분석법이 이용되고 있다. 현재 당화혈색소의 검사량이 많은 경우 대부분 당화혈색소 전용 검사기기를 이용하며 이때 주로 한 가지 방법으로 측정하게 된다. 그러나 대형 병원에서 가장 많이 사용되고 있는 HPLC 방법은 전위차를 이용한 검사법으로 대량 검체의 처리나 안정도에서 우수한 결과를 보이거나 일부 임상 상황에서는 오류가 발생할 수 있다(Sacks, 2006). 기기의 특성상 혈색소 유도체(Hb derivatives)가 생기는 다양한 임상 상황에서는 부정확한 결과를 보일 수 있다. 1) 요독증 환자에서 carbamylated 혈색소(Chachou 등, 2000; Rose 등, 1995; Weykamp 등, 1993a; Weykamp 등, 1999), 2) 아스피린 대량 장기 복용환자에서 acetyl 혈색소(Weykamp 등, 1993a; Weykamp 등 1993b), 3) 알코올 중독환자에서 acetaldehyde 혈색소(Nguyen와 Peterson, 1984; Weykamp

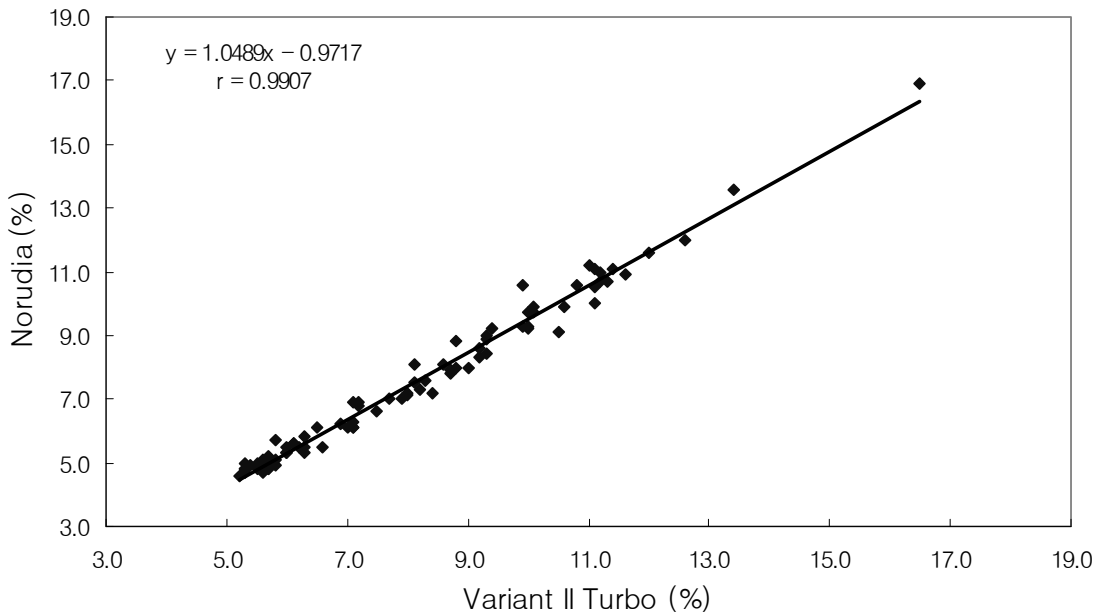


Fig. 2. Correlation of HbA1c between Norudia[®] HbA1c test reagent and VARIANT[™] II Turbo HbA1c analyzer.

등 1993b), 4) 불안정한 중간 산물인 Schiff 염기(Sacks, 2006; Weykamp 등, 1993b), 그리고 다양한 혈색소 변이형(Lee 등, 2007) 등에 의해 영향을 받을 수 있다. 그러나 면역측정법은 이들에 대한 영향이 거의 없는 것으로 알려져 있다(Weykamp 등, 1993a; Weykamp 등, 1993b). Norudia[®] HbA1c는 엄밀한 의미에서 면역측정법 보다는 protease, fructosyl-peptide oxidase(FPO) 및 peroxidase (POD)를 이용한 효소법으로 최근에 소개된 당화혈색소 측정법이다. 즉 protease에 의해 glycosylated dipeptide를 생성하고 FPO 및 POD에 의해 생성된 색을 흡광도의 변화를 측정하는 방법이다. 따라서 혈색소 유도체를 포함한 다양한 비특이 물질에 간섭이 적고, 기존에 이용하고 있는 화학분석법의 원리와의 유사하여 이들 기기를 이용할 수 있는 장점이 있다. 물론 전용기기를 이용하면 대량 검사도 가능하지만 기존 화학측정기기를 이용하는 경우는 HPLC와 같은 전용기기의 백업용으로 유용할 수 있을 것이다.

본 연구에서 Norudia[®] HbA1c의 직선성은 5.6~14.0% 농도에서 결정계수(r^2) 0.9885로 우수하였으며, 검사 중 정밀도는 저농도 (5.24%)와 고농도(9.01%)에서 각각

0.954%와 0.67%로 HPLC (VARIANT[™] II Turbo) 방법과 유사하거나 오히려 우수하였다(Table 1) 검사일간 정밀도도 각각 1.03%와 1.28%로 우수하였다. 기존기기 (VARIANT[™] II Turbo)와 상관성은 상관계수(r) 0.9907로 우수하였으며 회사에서 제공된 안내서 결과($r=0.994$)와도 유사하였다. 그리고 Norudia[®] HbA1c는 다른 면역측정법과도 우수한 상관성을 보였다($r=0.990$, 제조사 제공). 건강한 성인 201 명을 대상으로 시행한 참고치는 4.07~5.50%로 남·녀 간 차이가 거의 없었다.

기기 및 시약을 평가하고자 할 때 여러 가지 방해요소의 영향을 평가할 필요가 있다. 방해요소에는 통상적인 검사항목에서 방해할 수 있는 빌리루빈, 고지혈증 및 비타민 C 등과 당화혈색소에서 특이적으로 방해할 수 있는 acetaldehyde, sodium cyanate, acetyl aldehyde 및 glucose 등이 알려져 있다(Sacks, 2006; Weykamp 등, 1993b). 본 연구에서는 이들에 대한 평가를 시행하지는 못하였지만 앞으로 이들에 대한 평가도 진행되어야 할 것이다.

결론적으로 Norudia[®] HbA1c 측정 시약은 직선성 및 정밀도가 우수하였으며, VARIANT[™] II Turbo 방법과 상관관계도 우수하였다. 또한 간단한 검체 전처리 과정만

거치면 전용 분석기가 필요 없이 일반 자동 화학분석기로 측정할 수 있으며 HbA1c 유래의 당화 펩타이드를 효소법으로 특이하게 측정하므로 불안정한 당화혈색소 및 유사 당화혈색소에 의한 영향이 없다고 알려져 있다. 따라서 Norudia[®] HbA1c 측정 시약은 기존 방법을 백업할 수 있는 검사로도 이용할 수 있고 전용기기를 이용하면 대량 검체도 가능하므로 임상검사실에서 당화혈색소 측정에 효율적인 방법으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Chachou A, Randoux C, Millart H, Chanard J, Gillery P. Influence of in vivo hemoglobin carbamylation on HbA1c measurements by various methods. *Clin Chem Lab Med* 38:321-326, 2000.
2. Koenig RJ, Peterson CM, Kilo C, Cerami A, Williamson JR. Hemoglobin A1c as an indicator of the degree of glucose intolerance in diabetes. *Diabetes* 25:230-232, 1976a.
3. Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, Saudek C, Lehrman M, Cerami A. Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus. *N Engl J Med* 295:417-420, 1976b.
4. Lee ST, Weykamp CW, Lee YW, Kim JW, Ki CS. Effects of 7 hemoglobin variants on the measurement of glycohemoglobin by 14 analytical methods. *Clin Chem* 53:2202-2205, 2007.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline. NCCLS Document EP6-A. Wayne, PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of the precision performance of clinical chemistry devices; approved guideline. NCCLS document EP5-A. Wayne, PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method comparison and bias estimation using patient samples; approved guideline. NCCLS document EP9-A. Wayne, PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1995.
8. Nguyen LB, Peterson CM. Modification of hemoglobin by acetaldehyde: a time course study by high pressure liquid chromatography. *Alcohol Clin Exp Res* 8:516-521, 1984.
9. Rose AM, Tongate C, Valdes R Jr. A hemoglobin A1c immunoassay method not affected by carbamylated hemoglobin. *Ann Clin Lab Sci* 25:13-19, 1995.
10. Sacks DB. Carbohydrates. In Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE ed. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 4th ed. p837-901, Elsevier Saunders, St. Louis, 2006.
11. Tahara Y, Shima K. The response of GHb to stepwise plasma glucose change over time in diabetic patients. *Diabetes Care* 16:1313-1314, 1993.
12. Weykamp CW, Miedema K, de Haan T, Doelman CJ. Carbamylated hemoglobin interference in glycohemoglobin assays. *Clin Chem* 45:438-440, 1999.
13. Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FA, van der Slik W. Influence of hemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determinations, as investigated by 102 laboratories using 16 methods. *Clin Chem* 39:1717-1723, 1993a.
14. Weykamp CW, Penders TJ, Siebelder CWM, Muskiet FA, van der Slik W. Interference of carbamylated and acetylated hemoglobin in assays of glycohemoglobin by HPLC, electrophoresis, affinity chromatography, and Enzyme immunoassay. *Clin Chem* 39:138-142, 1993b.
15. 송정한. HbA1c 검사의 국내현황 및 표준화 방향. 대한진단검사의학회지 27(S2):S426-S432, 2007.