Norudia GA 시약의 당화알부민 검사 분석능 평가

Evaluation of the Analytical Performance of the Norudia GA Glycoalbumin Test

하창희* · 오종원* · 박형두

Changhee Ha, M.D.* · Jongwon Oh, M.D.* · Hyung-Doo Park, M.D.

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 진단검사의학과

Department of Laboratory Medicine and Genetics, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Blood biomarkers for the diagnosis and monitoring of diabetes mellitus include fasting plasma glucose, HbA1c, glycoalbumin (GA), fructosamine, and 1,5-anhydro-D-glucitol levels. GA has a half-life of approximately three weeks, and its levels are useful for assessing short-term changes in glycemic control. Herein, we evaluated the performance of the Norudia GA assay kit (Sekisui Medical, Japan) using a Roche Modular E170 analyzer (Roche Diagnostics, Germany). We evaluated the precision and linearity of the assay in accordance with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP05-A3 and EP06-A guidelines, respectively. A comparison of the Norudia GA and Lucica GA-L (Asahi Kasei Pharma Corporation, Japan) methods was performed by Passing-Bablok regression, using blood samples obtained from 121 patients, in accordance with the CLSI guideline EP09-A3. The reference interval for GA concentration was established based on 120 healthy individuals, according to CLSI guideline EP28-A3C. Repeatability (% CV) ranged from 0.9-2.5% and within-laboratory precision was 2.6-4.5% at three levels. Linearity was observed for GA concentration in the performance ranges used (21.4-713.0 $\mu\text{mol/L}$). In the equation for the correlation between Norudia GA and Lucica GA-L assay results, the slope and y-intercept were 1.014 (95% confidence interval: 1.000-1.045) and -0.017 (95% confidence interval: -0.444-0.381), respectively. The reference interval was calculated to be 11.2-17.5%.

Key Words: Diabetes mellitus, Glycoalbumin, Norudia GA, Performance

당뇨병의 진단과 감시에는 포도당, 당화혈색소, 당화알부민, 프럭토사민, 1,5-anhydro-D-glucitol 등의 혈액표지자가 이용되고 있다. 혈중 포도당과 당화혈색소는 당뇨병 환자의 진단 및 추적 관찰에 사용되고 있으나[1], 공복 포도당과 당화혈색소 수치 간의 경향성이 일치하지 않는 경우들이 있다. 일부 환자들에서는 당화혈색소가 당뇨병의 진행 정도나 당 조절 능력을 정확히 반영하지 못하

는 경우가 있기에 다른 검사를 통해 보완할 필요성이 있다. 당화혈색소는 적혈구의 수명에 영향을 받는다. 적혈구의 수명이 길어지는 철결핍성 빈혈이나 신부전 환자에서는 당화 기간이 길어지기 때문에 당화혈색소 수치가 실제 혈당 조절에 비해 높게 측정된다. 반대로 적혈구 수명이 단축되는 용혈성 빈혈이나 조혈이 왕성한 철분치료 중인 철결핍성 빈혈 환자에서는 실제 혈당 조절에 비해 낮게 측정된다. 따라서 적혈구 수명이 영향을 받는 질환을 가진 환자들의 경우 직전 3개월의 평균 포도당 수치를 반영하는 당화혈색소보다는, 상대적으로 짧은 3주일의 반감기를 가지는 당화알부민이 단기간의 혈당 조절을 확인할 수 있기에 더 유용한 감시 지표로 사용될 수 있다[2-4].

임상검사에서 당화알부민은 당화혈색소와 마찬가지로 % 단위로 보고하고 있으며, 매 검사마다 당화알부민과 알부민의 농도($\mu\text{mol/L}$)를 측정하여 그 비율을 이용한다. 당화알부민의 측정을 위해서 사용되는 방법으로는 고성능 액체 크로마토그래피법, 면역측정법, 비효소화학측정법, 효소법 등이 있으나, 측정값들의 편차로 인하여 현재는 대부분의 임상검사에서 fructosyl amino acid oxidase를 이용한 효소법이 사용된다[5, 6]. 본원에서 기존에 Lucica GA-L (Asahi Kasei Pharma Corporation, Tokyo, Japan) 시약

Corresponding author: Hyung-Doo Park, M.D., Ph.D.

<https://orcid.org/0000-0003-1798-773X>

Department of Laboratory Medicine and Genetics, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, 81 Irwon-ro, Gangnam-gu, Seoul 06351, Korea

Tel: +82-2-3410-0290, Fax: +82-2-3410-2719, E-mail: nayadoo@hanmail.net

*These authors contributed equally to this work.

Received: January 12, 2020

Revision received: July 3, 2020

Accepted: July 30, 2020

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

© 2021, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

을 이용하여 당화알부민의 혈중 농도를 측정했는데, 이는 당화알부민을 산화시켜 생성되는 과산화수소와 N,N-Bis-(4-sulfobutyl)-3-methylaniline를 반응시켜 생성되는 청자색의 색소(blue-purple pigment)를 측정하여 당화알부민 값을 구하는 방식이다[7]. 한편, 최근 출시된 Norudia GA (Sekisui Medical, Tokyo, Japan) 시약은 과산화수소와 N,N-Bis-(4-sufobutyl)-m-toluidine disodium을 반응시켜 생성되는 적자색의 색소(purple-red pigment)를 측정하여 당화알부민의 값을 구한다. 기존 Lucica GA-L에 대한 성능 평가는 여러 연구에서 다루어졌으며, 1.9-3.9%의 반복정밀도와 1.0-4.1%의 검사실내정밀도 등이 보고된 바 있으나[3, 8-10], 현재까지 Norudia GA에 대한 성능 평가는 시행된 적이 없다. 이에 저자들은 Norudia GA의 정밀도, 직선성, 상관성 등의 성능을 평가하여 임상검사에 사용 가능한지 적절성을 확인하고자 하였다.

이 연구는 본원의 임상시험심사위원회의 승인(승인번호: 2018-04-067)을 받아 진행하였다. Norudia GA 평가에 사용된 시약과 보정물질은 각각 Norudia GA Control (Lot.801RLO, Exp.2019.01, Sekisui Medical, Tokyo, Japan)과 Norudia GA Calibrator (Lot.801RLO, Exp.2019.01, Sekisui Medical)였고, Roche Modular E170 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 장비를 이용하여 측정하였다. 정밀도는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP05-A3 지침에 따라 20일 동안 매일 두 차례씩, 한번 측정할 때마다 각각 2회씩 반복 측정하여 평가하였다[11]. 상품화된 정도관리물질인 Norudia GA Control level 1과 level 2, 그리고 환자들의 혈청으로 제조한 혈청 풀(pooled serum)을 사용하였으며, 반복정밀도(repeatability)와 검사실내정밀도(within-laboratory precision)의 변이계수(%CV)를 평가하였다. 직선성은 CLSI EP06-A에 따라 평가하였다[12]. 제조사의 프로토콜에 따라 D-(+)-glucose를 혈청 풀에 5 g/L의 농도가 되도록 조제한 다음 당화가 되도록 37°C에서 1주일간 반응시킨 물질을 사용하였고, 6:0, 5:1, 4:2, 3:3, 2:4, 1:5, 0:6의 비율로 단계적으로 혼합하여 7가지 농도를 만든 후, 각 농도에서 두 번씩 측정 후 평균값으로 회귀식과 결정계수를 구하였다. 다항회귀분석(polynomial regression analysis)으로 최적의 다항식을 확인하였으며, 최적의 다항식이 일차 선형식인 경우 해당 범위의 직선성이 유지되는 것으로 판정하였고, 최적의 다항식이 일차 선형식이 아닌 경우, 상대적 비직선성이 5% 이하를 만족하면 직선성이 있다고 판정하였다. 또한 CLSI EP09-A3 지침에 따라, 기존에 사용 중인 Lucica GA-L 측정 결과를 기준으로 Norudia GA 측정값을 비교하여 상관성을 평가하였다[13]. 2018년 3월에 전혈구검사, 공복 포도당 및 당화혈색소 등의 검사 결과가 있는 당뇨 환자 122명의 잔여검체에 대해 Lucica GA-L과 Norudia GA를 사용하여 당화알부민 농도를 측정하였으며 이들의 당화알부민 %값을 계산하였다. 이상치 여부는 generalized extreme studentized deviate 법을

사용하여 확인하였으며[11, 13], 한 명의 이상치를 제거한 후에 121명의 측정값을 상관성 평가에 사용하였다. Passing-Bablok 회귀분석을 시행하여 회귀방정식의 기울기 및 y절편과 각각의 95% 신뢰구간 그리고 Spearman 상관계수(r)를 계산하였으며, 상관계수가 0.975 이상인 경우 상관성이 있다고 판단하였다. 참고구간은 건강 의학센터를 방문한 수진자들의 잔여 혈청 검체를 이용하여 CLSI EP28-A3C 지침에 따라 설정하였다[14]. 건강검진을 받은 사람 중 고혈압과 당뇨가 없으면서 당화혈색소 측정 이력이 있고, 일반혈액 검사, 간기능검사, 신기능검사 결과 등이 모두 참고구간을 벗어나지 않은 20세에서 85세 사이(중앙값 52세)의 건강한 121명을 대상으로 하였다. 이들의 당화알부민 %값을 계산하였으며, Dixon-Reed 기준[15]에 따라 이상치를 제거한 후, Kolmogorov-Smirnov test를 시행하여 정규성을 평가하였다. 정규성을 만족하지 못하면, 비모수적인 방법으로 중앙 n백분위를 이용하여 참고구간을 구하였다. 통계분석은 Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), Labostats v1.5 (Laboratory Medicine Foundation, Seoul, Korea), MedCalc v11.5.1.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium) 프로그램을 이용하였다.

정밀도 평가 결과, Norudia GA의 당화알부민은 모든 경우에서 최대 5.0% 미만의 변이계수(%CV)를 보였다. 정도관리물질과 혈청 풀을 이용한 당화알부민의 반복정밀도는 0.9-2.5%였으며 검사실내 정밀도는 2.6-4.5%였다(Table 1). 직선성 평가 결과 다항회귀식이 이차 혹은 삼차식인 경우 최고차항의 계수에 대한 t-통계량은 각각 0.25, 2.11, 자유도는 각각 11, 10이었고 유의확률은 모두 0.05 이상으로 유의하지 않았다. 최적의 다항식은 일차 선형이었으며, 당화알부민은 21.4-713.0 $\mu\text{mol/L}$ (1.4-47.5 g/L)의 범위에서 직선성을 보여 임상적으로 의미 있는 범위 내에서 직선성이 유효한 것으로 평가하였다. 일차 회귀방정식의 기울기와 y절편은 각각 1.000과 -0.235였고, 결정계수는 0.992였다(Fig. 1). 상관성 평가는 121명의 환자 검체로 Passing-Bablok 회귀분석을 시행하였고, scatter plot과 difference plot은 Fig. 2에 나타냈다. Passing-Bablok 회귀분석 결과, Lucica GA-L과 Norudia GA의 회귀방정식은 기울기 1.014 (95% 신뢰구간: 1.000-1.045), y 절편 -0.017 (95% 신뢰구간: -0.444-

Table 1. Precision of Norudia GA kit for serum glycoalbumin measurement at three levels

Analyte	Level	Type	Mean	SD	Coefficient of variation (%)	
					Repeatability	Within-laboratory
Glycoalbumin ($\mu\text{mol/L}$)	Low	QC 1	78.02	3.53	2.5	4.5
	Middle	QC 2	211.04	5.45	0.9	2.6
	High	Pooled serum	303.14	8.51	1.1	2.8

Abbreviations: SD, standard deviation; QC, quality control material.

0.381), Spearman 상관계수 0.993으로 두 시약 간의 동등성이 있음을 확인하였다. 참고구간 설정에 사용된 121명의 결과 중 하나의 이상치가 제거되었으며, Kolmogorov-Smirnov test 결과 정규성을 만족하지 못하였다. 비모수적 방법인 중앙 95백분위수(central 95th percentile)로 설정된 참고구간은 11.2-17.5% (양 끝값의 90% 신뢰구간, 10.9-11.8% 및 16.2-20.5%)였다.

당화알부민은 당화혈색소보다 짧은 반감기를 갖고 있어 단기간의 혈당 조절 지표로 유용하게 사용될 수 있으며, 적혈구의 수명에 영향을 받지 않는 특징이 있다. 또한 당뇨병의 진단과 치료에서 프

럭토사민과 당화알부민의 장단점을 분석한 Danese 등[16]의 연구에 따르면 당화혈색소와 비교했을 때 비용 대비 효과가 좋은 것으로 보고되었다. 반면, 명확한 기전은 밝혀지지 않았으나 신체질량 지수가 높거나 체지방량이 많고 내장지방이 있는 사람들에서는 만성적인 염증반응, 포도당-인슐린 항상성 저하 등으로 인해 당화알부민 값이 낮기 때문에 결과 해석에 주의해야 한다[17, 18].

기존에는 Lucica GA-L 시약이 일반화학장비로 측정할 수 있는 유일한 당화알부민 측정용 시약이었기 때문에 고성능 액체 크로마토그래피로 측정된 당화알부민 값과 비교하거나[5, 10], 당화혈색소 농도와 비교하는 간접적인 방법으로 이루어졌다[3]. 그러나 최근 들어 국내에서 여러 종류의 일반화학검사용 당화알부민 시약이 출시되고 있는데, 시약들의 측정능 적절성이나 시약 간의 상관성을 평가한 연구는 없는 상태이다. 저자들은 이 연구에서 Norudia GA의 기존 시약과의 비교평가를 포함한 기본 성능 평가를 시행하였으며 참고구간을 설정하였다. 정밀도 평가 결과 Norudia GA의 당화알부민 반복정밀도는 세 농도에서 0.9-2.5%로 Westgard QC 자료[19]에 제시된 바람직한 비정밀도 수준(2.6%) 이내였다. 검사실내정밀도 변이계수(% CV)는 중간농도 정도관리물질에서 2.6%로 상기 기준에 들었지만 저농도 정도관리물질에서는 4.5%로 높은 편이었고 고농도의 혈청풀에서는 2.8%로 허용기준에 근접하였다. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988에 당화알부민은 기준이 제시되어 있지 않으나, Westgard QC 자료[19]의 생물학적 변동성(5.2%)과 총허용오차(allowable total error 7.2%) 기준으로 판단하였을 때 적합하였다. 직선성 평가에서는 일차 선형식이 최적 회귀식으로 도출되어 직선성이 확인되었다.

이 연구에서 설정된 중앙 95백분위수 참고구간은 11.2-17.5%로

Fig. 1. Linearity of the Norudia GA assay for serum glycoalbumin measurement.

Fig. 2. Comparison of serum glycoalbumin values measured by Lucica GA-L and Norudia GA kits. (A) Scatter plot. (B) Difference plot.

다른 과거 연구들에서 제시된 참고구간들과 차이가 있었다. Furusyo 등[20]이 일본 교외 지역의 인구집단 1,575명을 대상으로 수행한 연구에서 제시한 참고구간은 12.2-16.5%였으며, Kohzuma 등[9]이 North Carolina에 거주하는 당뇨병을 진단받지 않은 미국인 200명을 대상으로 한 연구의 참고구간은 11.9-15.8%로 본 연구의 참고구간에 비해 더 좁았다. 이것은 Furusyo 등의 연구가 참고구간을 중앙 80백분위수, 즉 10% 백분위-90% 백분위 값으로 저자들의 연구 중앙 95백분위수보다 좁게 설정한 점과, Kohzuma 등의 연구에서와 같은 건강인 참고집단의 인구학적 차이에서 기인한 것으로 생각된다. 실제 본 연구의 중앙 80백분위수로 설정한 참고구간은 12.1-15.6%로 좁아지면서 Furusyo 등의 연구와 비교했을 때 참고구간의 차이가 감소하였다.

본 연구에서는 두 종류의 일반화학검사용 시약에 대하여 당화알부민 값을 측정하여 상관성을 평가하였고 적절성을 확인하였다. 한편, 참고구간 설정에 사용된 건강인들의 검체에 대해 당화혈색소 값을 확인하여 Norudia GA로 측정된 당화알부민과의 Spearman 상관계수는 당화혈색소 값 4.7-6.5% 범위, 당화알부민 값 10.9-20.5% 범위에서 0.196으로 약한 상관관계를 보여서(자료 미제시) 당뇨병 환자에서는 두 가지의 당뇨병 혈액표지자를 병행한 치료 반응 평가가 필요할 것으로 사료된다. 본 연구의 상관성 평가에 이용된 환자들은 외래 진료 시 다른 혈액표지자들도 모니터링 중이었으며, 그 중 한 환자는 당화혈색소가 정상 범위에 속하나(5.3%) 당화알부민이 증가해 있었고(21.7%), 공복 포도당은 정상이었으나(0.9 g/L) 범혈구감소증(백혈구 $2.33 \times 10^9/L$, 적혈구 87 g/L, 혈소판 $7.7 \times 10^{10}/L$)과 합토클로빈 감소(30 mg/L)를 보였다. 적혈구의 기능에 문제가 있는 이와 같은 환자는 당뇨병의 치료 반응을 당화알부민으로 추적 관찰하여 확인하는 것이 유용하며 Norudia GA 시약이 그 값을 잘 반영하고 있음을 알 수 있었다.

요약하면, Norudia GA 시약을 이용한 당화알부민 측정은 정밀도와 직선성이 임상검사에서 사용하는 데 적합하다고 판단하였으며, 기존 중앙검사에서 사용하는 Lucica GA-L 당화알부민 측정치와 우수한 상관관계가 있는 것을 확인하였다. 저자들이 설정한 참고범위는 향후 이 시약을 사용하는 임상검사에서 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

요 약

당뇨병의 진단과 모니터링에 사용되는 혈액 지표들은 공복 혈당, 당화혈색소, 당화알부민, 프럭토사민, 1,5-anhydro-D-glucitol 등이 있는데, 당화알부민은 약 3주일의 반감기를 갖기에 상대적으로 짧은 기간의 당 조절능을 관찰하는데 유용하다. 본 연구에서는 Roche Modular E170 (Roche Diagnostics, Germany) 장비를 이용

하여 Norudia GA (Sekisui Medical, Japan) 시약의 분석성능을 평가하였다. 정밀도와 직선성은 각각 CLSI 가이드라인 EP05-A3와 EP06-A에 따라 평가했으며, 상관성 평가를 위해 CLSI 가이드라인 EP09-A3에 따라 121명을 대상으로 Norudia GA와 Lucica GA-L (Asahi Kasei Pharma Corporation, Japan) 시약 측정결과에 대해 Passing-Bablok 회귀분석을 수행하였다. 참고구간은 120명의 건강인을 대상으로 CLSI 가이드라인 EP28-A3C에 따라 설정하였다. 반복 정밀도와 검사실내정밀도의 변이계수는 각각 0.9-2.5%와 2.6-4.5%의 분포를 보였고, 임상적으로 의미 있는 범위(21.44-713.01 $\mu\text{mol/L}$)에서 직선성이 확인되었다. 상관성 평가에서 Norudia GA와 Lucica GA-L 두 시약 간의 동등성이 있음을 확인하였으며, 참고구간은 11.2-17.5%로 설정하였다.

이해관계

저자들은 본 연구와 관련하여 어떠한 이해관계도 없음을 밝힙니다.

REFERENCES

1. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2019 Abridged for primary care providers. Clin Diabetes 2019;37:11-34.
2. Gonen B, Rubenstein A, Rochman H, Tanega SP, Horwitz DL. Haemoglobin A1c: an indicator of the metabolic control of diabetic patients. Lancet 1977;2:734-7.
3. Park HI, Kim YS, Lee J, Kim Y, Shin SJ. Performance characteristics of glycated albumin and its clinical usefulness in diabetic patients on hemodialysis. Korean J Lab Med 2009;29:406-14.
4. Freitas PAC, Ehlert LR, Camargo JL. Glycated albumin: a potential biomarker in diabetes. Arch Endocrinol Metab 2017;61:296-304.
5. Kouzuma T, Uemastu Y, Usami T, Imamura S. Study of glycated amino acid elimination reaction for an improved enzymatic glycated albumin measurement method. Clin Chim Acta 2004;346:135-43.
6. Sato A, Yada S, Hosoba E, Kanno H, Miura H. Establishment of glycated albumin unit conversion equation from the standardized value (mmol/mol) to the routinely used value (%). Ann Clin Biochem 2019;56:204-9.
7. Testa R, Guerra E, Bonfigli AR, Di Gaetano N, Santini G, Ceriotti F. Analytical performances of an enzymatic assay for the measurement of glycated albumin. J Appl Lab Med 2016;1:162-71.
8. Kohzuma T and Koga M. Lucica GA-L glycated albumin assay kit: a new diagnostic test for diabetes mellitus. Mol Diagn Ther 2010;14:49-51.
9. Kohzuma T, Yamamoto T, Uematsu Y, Shihabi ZK, Freedman BI. Basic

- performance of an enzymatic method for glycated albumin and reference range determination. *J Diabetes Sci Technol* 2011;5:1455-62.
10. Paroni R, Ceriotti F, Galanello R, Battista Leoni G, Panico A, Scurati E, et al. Performance characteristics and clinical utility of an enzymatic method for the measurement of glycated albumin in plasma. *Clin Biochem* 2007;40:1398-405.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures; Approved guideline-Third edition. EP05-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures; a statistical approach; Approved guideline. EP06-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Measurement procedure comparison and bias estimation using patient samples; Approved guideline-Third edition. CLSI document EP09-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; Approved guideline-Third edition. EP28-A3C. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.
15. Reed AH, Henry RJ, Mason WB. Influence of statistical method used on the resulting estimate of normal range. *Clin Chem* 1971;17:275-84.
16. Danese E, Montagnana M, Nouvenne A, Lippi G. Advantages and pitfalls of fructosamine and glycated albumin in the diagnosis and treatment of diabetes. *J Diabetes Sci Technol* 2015;9:169-76.
17. Huh JH, Kim KJ, Lee BW, Kim DW, Kang ES, Cha BS, et al. The relationship between BMI and glycated albumin to glycated hemoglobin (GA/A1c) ratio according to glucose tolerance status. *PLoS One* 2014;9:e89478.
18. Koga M, Otsuki M, Matsumoto S, Saito H, Mukai M, Kasayama S. Negative association of obesity and its related chronic inflammation with serum glycated albumin but not glycated hemoglobin levels. *Clin Chim Acta* 2007;378:48-52.
19. Westgard QC. Desirable Biological Variation Database specifications. <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm> (Last updated in 2014).
20. Furusyo N, Koga T, Ai M, Otokozawa S, Kohzuma T, Ikezaki H, et al. Utility of glycated albumin for the diagnosis of diabetes mellitus in a Japanese population study: results from the Kyushu and Okinawa Population Study (KOPS). *Diabetologia* 2011;54:3028-36.