

کیت سنجش مستقیم HbA1c به روش آنزیمی
Direct HbA1c Assay (Enzymatic, On-Board Lysis) Kit
Cat. No: 1255
Brochure Rev.: 06 (1400/02/25)

مقدمه:

این کیت به منظور اندازه‌گیری HbA1c در خون سپاهریگی توسط دستگاه اتوآنالایزر طراحی شده است. سطح HbA1c به منظور پایش طولانی مدت سطح گلوکز در خون افراد دیابتی مورد بررسی قرار می‌گیرد. اهمیت فوق العاده HbA1c زمانی مشخص شد که کارآزمایی بالینی کنترل عوارض دیابت (DCCT) و مطالعه آینده‌نگر دیابت بریتانیا (UKPDS)، ارتباط قوی بین HbA1c و خطر عوارض دیابت را نشان دادند. بر این اساس، امروزه سطح HbA1c باید هر دو سال یک بار در کل بیماران دیابتی و هر سه ماه یک بار در بیمارانی که پروتکل درمان آن‌ها تغییر کرده است یا به اهداف درمانی ایده آل نرسیده‌اند، به عنوان بخشی از برنامه مدیریت درمان دیابت، اندازه‌گیری شود. HbA1c محصول اتصال غیر آنزیمی گلوکز به اسیدآمینه والین در انتهای آمین زنجیره بتای هموگلوبین است که به عنوان شاخص میانگین سطح گلیسمیک خون و شاخص ریسک گسترش عوارض دیابت اندازه‌گیری می‌شود. با توجه به عمر ۱۲۰ روزه گلوبول‌های قرمز خون، HbA1c نشانگر مناسبی برای کنترل گلیسمیک در ۲ تا ۳ ماه اخیر بیمار است.

اصول آزمایش:

تست مستقیم HbA1c یک سنجش آنزیمی است که در آن نمونه‌های لیز شده خون تام جهت تخریب و هضم بیشتر پروتئین‌ها در معرض آنزیم پروتئاز (تولید شده در یک گونه از باکتری باسیلوس) قرار می‌گیرند. این فرایند سبب رهاسازی آمینواسید والین گلیک به از زنجیره بتای هموگلوبین می‌گردد. والین گلیک به‌عنوان سوبسترا در معرض آنزیم نوترکیب فروکتوزیل والین اکسیداز (FVO) تولید شده در باکتری *E. coli* قرار می‌گیرد. پراکسید هیدروژن حاصل از تأثیر آنزیم FVO بر آمینو اسیدهای والین توسط آنزیم پراکسیداز (POD) و با استفاده از یک کروموژن مناسب اندازه‌گیری می‌شود. در این روش، نیاز به اندازه‌گیری جداگانه هموگلوبین توتال نیست و

غلظت HbA1c با استفاده از یک نمودار کالیبراتور به‌طور مستقیم و به‌صورت %HbA1c بیان می‌شود.

محتویات کیت:

- ۱) بافر لیزکننده: ۱ ویال ۱۳/۱ میلی‌لیتری.
- ۲) محلول ۱ (R1): ۱ ویال ۱۳/۵ میلی‌لیتری.
- ۳) محلول ۲ (R2): ۱ ویال ۶/۶ میلی‌لیتری.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند:

- ۱) مجموعه کالیبراتورهای HbA1c شرکت ایده آل تشخیص آتیه.
- ۲) کنترل‌های شرکت ایده آل تشخیص آتیه در دو سطح HbA1c.

آماده سازی محلول‌ها:

محلول‌های موجود در این کیت به‌صورت آماده مصرف می‌باشند.

ذخیره سازی و ماندگاری:

- ۱) تمامی معرف‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد تا زمان انقضای چاپ شده بر روی لیبل ویال‌ها پایدار هستند.
- ۲) معرف‌ها پس از باز شدن درب آن‌ها، تا ۴ هفته در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد پایدار هستند.
- ۳) اجزاء کیت نسبت به نور حساس هستند و لازم است که بلافاصله پس از انجام آزمایش درب آن‌ها بسته شود و در یخچال آزمایشگاه نگهداری گردند.

احتیاط در استفاده از کیت:

- ۱) همانند سایر تست‌های تشخیصی، نتایج بایستی بر اساس نتایج سایر تست‌ها و علائم بالینی بیمار تفسیر گردد.
- ۲) از مصرف معرف‌های تاریخ گذشته اکیداً خودداری نمایید.
- ۳) در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات آن بر روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود و از تماس مواد با دهان و سایر مخاط بدن جلوگیری شود.

۴) کلیه مواد مخرب زیستی براساس استانداردهای ملی و منطقه‌ای دور ریخته شوند.

جمع آوری و آماده‌سازی نمونه:

این محصول جهت اندازه‌گیری HbA1c در نمونه خون تام انسان طراحی شده است و از نمونه خون تام وریدی حاوی K₂EDTA می‌توان استفاده کرد. نمونه‌گیری باید با رعایت کامل شرایط آسپتیک انجام شود.

پایداری نمونه:

بر اساس راهنمایی‌های CLSI هر آزمایشگاه موظف است تا بر اساس منابع علمی موجود و یا نتایج حاصل از مطالعات خود در مورد شرایط پایداری نمونه‌ها تصمیم‌گیری نماید. توصیه می‌شود که نمونه‌های نگهداری شده در یخچال آزمایشگاه حداکثر تا دو هفته پس از نمونه‌گیری مورد سنجش قرار گیرند.

روش انجام آزمایش:

- ۱) قبل از انجام تست، جهت یکنواخت شدن اریتروسیت‌های ته‌نشین شده، باید نمونه خون تام به آرامی و ۵ مرتبه با سر و ته کردن (یا توسط اپلیکاتور) همگن گردد. در صورت عدم همگن شدن نمونه، صحت تست تحت تأثیر قرار می‌گیرد.
- توجه: حداکثر تعداد نمونه در هر مرتبه کاری، باید به‌نحوی تعیین شود که نمونه‌برداری دستگاه اتوآنالایزر از کل نمونه‌ها حداکثر در طی مدت زمان ۲۰ دقیقه پس از مخلوط کردن نمونه‌ها انجام شود.
- ۲) حد اقل ۱۵۰ الی ۲۵۰ از هر نمونه خون تام در ویال مخصوص دستگاه اتوآنالایزر ریخته شود.
- ۳) کالیبراتورها و کنترل‌ها پس از آماده‌سازی، باید کاملاً همانند نمونه‌های خون استفاده شوند.

طرح شماتیک:

توجه: اندازه‌گیری HbA1c یک روش End-point می‌باشد و اولین خوانش جذب (A1) باید درست قبل از افزودن محلول ۲ (R2) انجام شود.



کالیبراسیون:

- ۱) غلظت کالیبراتورها در هر سری تولید متفاوت است. کالیبراتورها از مقادیر کم به زیاد در دستگاه قرار داده شده و غلظت‌های مربوط به هر سری تولید وارد شود.
- ۲) کالیبراتورها به‌صورت لیوفیلیزه می‌باشند. بنابراین باید ابتدا بر اساس بروشور مربوطه حل شده و به آرامی مخلوط گردند. کالیبراتورهای حل شده، در صورتی که درب ویال آن‌ها محکم بسته باشد، تا ۱۴ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد پایدار هستند.

مقادیر مورد انتظار برای تست HbA1c

Normal	<5.7 %
Prediabetes (increased risk for diabetes)	5.7%-6.4%
Diabetes	≥ 6.5%

کنترل کیفی:

مجموعه کنترل‌ها را به‌صورت جداگانه تهیه نمایید و هر دو کنترل را به‌عنوان نمونه‌های مجهول در نظر بگیرید. در صورتی که نتایج حاصل از اندازه‌گیری غلظت کنترل‌ها، خارج از محدوده تعیین شده باشد، از انجام تست بر روی نمونه‌های بیماران خودداری نمایید.

نتایج:

مقادیر HbA1c به‌صورت درصدی و بر اساس نمودار کالیبراسیون گزارش می‌شوند. مقادیر گزارش شده توسط DCCT هم‌تراز شده و در فرمت NGSP گزارش می‌گردند. ارتباط بین نتایج HbA1c در فرمت NGSP (به صورت %HbA1c) با شبکه



IVD	In vitro diagnostic medical device
CE	European Conformity
REF	Catalogue number
Σ	Contains sufficient for tests
⌋	Temperature limit

Compound	Concentration
Ascorbic Acid	12 mg/dl
Total Bilirubin	15 mg/dl
Bilirubin (Conjugate)	13 mg/dl
Hemoglobin	21 g/dl
Total Protein	21 g/dl
Glucose	4000 mg/dl
Triglyceride	4000 mg/dl
Uric Acid	30 mg/dl
Urea	80 mg/dl

Sensitivity (بررسی حساسیت)

حداقل غلظت قابل تشخیص (LOD) در این کیت بر اساس مجموع LOB و دو برابر انحراف معیار حاصل از ۲۰ بار تکرار یک نمونه با غلظت کم برابر با ۰/۵۴ درصد می‌باشد.

علائم استفاده شده در برچسب کالاها

EC REP	Authorized representative in the European Community
	Date of manufacture
	Use-by date
LOT	Batch code

References:

- American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2015. Diabetes Care 2015; 38(suppl 1): S1-S93
- Sacks DB, et al. National Academy of Clinical Biochemistry. Position statement executive summary: guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. Diabetes Care 2011; 34: 1419- 1423
- Goldstein DE, et al. Tests of glycemia in diabetes. Diabetes Care 2004; 27(7): 1761-1773
- American Diabetes Association. Tests of glycemia in diabetes. Diabetes Care 2003; 26 (suppl 1): S106-S108
- 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: 837-853

در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با تلفن‌های مندرج بر روی جعبه بخش پشتیبانی تماس بگیرید.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean (%)	5.1	7.8	11.2
SD (%)	0.1	0.25	0.35
CV (%)	1.9	3.2	3.1

Recovery (بررسی درستی) ۱)

در این تست دو نمونه خون به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شد و به عنوان یک نمونه، میزان HbA1c در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش تغییر کمتر از ۱۰ درصد در نتایج به دست آمده است.

No.	Sample	Added	Exp.	Obs.	Rec. (%)
1	4.5	10.1	7.3	7.1	97.2
2	5.1	8.9	7	7.2	102.8
3	7.9	11.3	9.6	9.4	97.9

Linearity (بررسی درستی)

نتایج HbA1c حاصل از آنالیز نمونه‌های مختلف با استفاده از کیت حاضر نشان داد که این کیت در محدوده ۱۲-۴ درصد تست به صورت خطی عمل می‌کند. معیار پذیرش در این آزمایش $Bias < 10\%$ است.

Comparison of Methods (بررسی درستی)

۴۰ نمونه خون در سطوح مختلف تصمیم‌گیری بالینی انتخاب شد و نتایج حاصل از کیت حاضر با روش مرجع (HPLC) مقایسه گردید. نتایج، همبستگی قابل قبول ۹۷/۹ درصد بین دو روش مذکور را نشان داد. معیار پذیرش برای این آزمایش به صورت زیر تعریف شده است:
 $0.9 \leq \text{Pearson Correlation Coefficient} \leq 1.0$

Interferences (بررسی تداخلات)

هموگلوبین استیله، کاربامیل و Labile HbA1c در این تست تداخلی ایجاد نمی‌کنند. همچنین واریته‌های هموگلوبین C، S و E با واکنش آنزیمی سنسجش HbA1c تداخل ندارند. مواد مداخله‌گر زیر نیز با واکنش آنزیمی اندازه‌گیری HbA1c تداخلی ندارند.

IFCC (به صورت mmol/mol) بر اساس فرمول مشخص می‌گردد:

$$NGSP = (0.09148 \times IFCC) + 2.152$$

محدودیت‌ها:

۱) محدوده خطی تست تا ۱۲ درصد می‌باشد. نمونه‌های بالاتر از ۱۲٪ نباید رقیق‌سازی و مجدداً تست شوند بلکه باید نتیجه تست بیمار، به صورت بالاتر از ۱۲ درصد گزارش گردد ($>12\%$).

۲) این تست برای نمونه خون تام انسان حاوی K₂-EDTA طراحی شده است.

مقدار هموگلوبین توتال نمونه خون باید بین ۲۱-۸ g/dl باشد. ۳) هموگلوبینوپاتی‌ها و مقادیر HbF بیش از ۱۰ درصد در نتایج تداخل ایجاد می‌کند.

خصوصیات انجام آزمایش:

کلیه مراحل انجام این تست با استفاده از آنالایزر بیوشیمی Hitachi 912 انجام شده است. نتایج هر تست ممکن است در هر آزمایشگاهی متفاوت باشد.

پارامترهای کنترل کیفی**Intra- Assay (بررسی دقت)**

دقت داخلی با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه متفاوت در یک نوبت‌کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean (%)	5.54	7.41	9.32
SD (%)	0.20	0.22	0.27
CV (%)	3.6	3.0	2.9

Inter- Assay (بررسی دقت)

ارزیابی دقت بین‌تستی با سه نمونه متفاوت خون در ۴ نوبت‌کاری (هر نوبت ۵ تکرار) انجام پذیرفت. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

1. Trueness