

مقادیر مورد انتظار برای تست HbA1c

شرکت تولیدکننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این تست را به قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر برای آنالیت مورد نظر باید توسط آزمایشگاه مصرف کننده تعیین گردد.

Normal	< 5.7 %
Prediabetic (increased risk for diabetes)	5.7%-6.4%
Diabetic	≥ 6.5%

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 (در صورت لیوفیلیزه بودن) باید ابتدا بر اساس بروشور مربوطه حل شده و به آرامی مخلوط گردند. کالیبراتورهای حل شده، در صورتی که درب ویال آن‌ها محکم بسته شوند، تا ۱۴ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد پایدار هستند.

کنترل کیفی:

(۱) مجموعه کنترل‌ها را به صورت جداگانه تهیه نمایید و هر دو کنترل را به عنوان 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.

(۲) در صورتی که کنترل‌ها به صورت لیوفیلیزه باشند باید ابتدا بر اساس بروشور مربوطه حل شده و به آرامی مخلوط گردند. در صورتی که درب ویال کنترل‌ها پس از باز شدن محکم بسته شود، تا ۱۴ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد پایدار هستند.

نکته: کنترل‌ها نیاز به آماده سازی به وسیله بافر لیزکننده، همانند نمونه بیمار را ندارند.

نتایج:

مقادیر HbA1c به صورت درصدی و بر اساس نمودار کالیبراسیون گزارش می‌شوند. مقادیر گزارش شده توسط DCCT هم‌تراز شده و

(۵) کلیه مواد مخرب زیستی مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع آوری و آماده‌سازی نمونه:

این محصول جهت اندازه‌گیری HbA1c در نمونه خون تام انسان طراحی شده است و از نمونه خون تام وزیدی حاوی پتاسیم EDTA یا هپارین آمونیم 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:

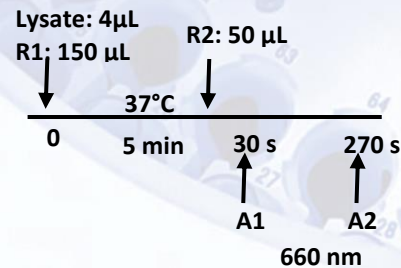
(۱) قبل از انجام تست، جهت یکنواخت شدن گلبول‌های قرمز ته‌نشین شده، باید نمونه خون تام به آرامی و ۵ مرتبه با سر و ته کردن همگن گردد. در صورت عدم همگن شدن نمونه، صحت تست تحت تأثیر قرار می‌گیرد.

(۲) حجم ۵۰۰ میکرولیتر از بافر لیزکننده را در هر کاپ بریزید.

(۳) حجم ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه خون تام را به کاپ حاوی بافر لیز کننده اضافه کنید. آن را به آرامی با یک سمپلر مناسب بدون ایجاد کف مخلوط کنید تا گلبول‌های قرمز کاملاً لیز شوند. مخلول تهیه شده پس از ۱۰ دقیقه آماده انجام تست می‌باشد.

طرح شماتیک:

توجه: اولین خوانش جذب (A1) ۳۰ ثانیه پس از افزودن مخلول ۲ (R2) و دومین خوانش جذب (A2) ۲۷۰ ثانیه بعد انجام گیرد.


محتویات کیت:

محتویات کیت	Cat. No: 2755	Cat. No: 2855
بافر لیزکننده (Lysis Buffer)	دو ویال ۵۰ میلی‌لیتری	سه ویال ۵۰ میلی‌لیتری
مخلول ۱ (R1)	یک ویال ۳۰ میلی‌لیتری	یک ویال ۴۵ میلی‌لیتری
مخلول ۲ (R2)	یک ویال ۱۰ میلی‌لیتری	یک ویال ۱۵ میلی‌لیتری

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند:

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

آماده سازی مخلول‌ها:

مخلول‌های موجود در این کیت به صورت آماده مصرف می‌باشند.

ذخیره سازی و ماندگاری:

(۱) تمامی معرف‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد تا زمان انقضای درج شده بر روی لیبل ویال‌ها پایدار هستند.
 (۲) به علت وجود ذرات لاتکس بهتر است قبل از انجام تست مخلول R1 را با چند بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.

احتیاط در استفاده از کیت:

(۱) محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است؛ لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.

(۲) کلیه مخلول‌ها تا زمان انقضای کیت پایدار هستند. از مخلول‌هایی که تاریخ انقضای آن‌ها گذشته است استفاده نکنید.

(۳) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HbSag، HIV1/2 و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های ایمنی انجام شوند.

(۴) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است. در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات آن بر روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود. از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جداً جلوگیری نمایید.

کیت اندازه‌گیری HbA1c به روش توربیدومتری
HbA1c Turbidimetric Assay Kit
 BT Cat. No: 2755
 BT Cat. No: 2855
 Rev.: A2 (1402/12/21)

مقدمه:

میزان HbA1c به منظور پایش طولانی مدت میزان گلوکز در خون افراد دیابتی مورد بررسی قرار می‌گیرد. HbA1c محصول اتصال غیر آنزیمی گلوکز به اسید آمینه والین در انتهای آمین زنجیره بتای هموگلوبین است که به عنوان شاخص میانگین سطح گلیسمیک خون و شاخص ریسک گسترش عوارض دیابت اندازه‌گیری می‌شود. امروزه سطح HbA1c باید هر دو سال یک بار در کل بیماران دیابتی و هر سه ماه یک بار در بیماران که پروتکل درمان آن‌ها تغییر کرده است یا به اهداف درمانی ایده‌آل نرسیده‌اند، به عنوان بخشی از برنامه مدیریت درمان دیابت، اندازه‌گیری شود. باتوجه به میانگین عمر ۱۲۰ روزه گلبول‌های قرمز خون، HbA1c نشانگر مناسبی برای کنترل گلیسمیک در ۲ تا ۳ ماه اخیر بیمار است. این کیت به منظور اندازه‌گیری HbA1c در خون سیاهرگی به روش توربیدومتری طراحی شده است.

اصول آزمایش:

در این روش از تعامل آنتی‌ژن و آنتی‌بادی برای تعیین مستقیم HbA1c در خون تام استفاده می‌شود. هموگلوبین توتال و HbA1c میزان جذب غیر اختصاصی یکسانی نسبت به ذرات لاتکس دارند. با اضافه شدن آنتی‌بادی مونوکلونال موشی ضد HbA1c انسانی (R2)، کمپلکس آنتی‌بادی ضد HbA1c-لاتکس HbA1c تشکیل می‌شود. آگلوتیناسیون زمانی ایجاد می‌شود که آنتی‌بادی پلی کلونال ضد IgG موشی با آنتی‌بادی مونوکلونال واکنش دهد. جذب اندازه‌گیری شده متناسب با HbA1c جذب شده در سطح قطعات لاتکس است که به نوبه خود متناسب با درصد HbA1c در نمونه می‌باشد.

References:

1. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2015. Diabetes Care 2015; 38(suppl 1): S1-S93
2. 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
3. Goldstein DE, *et al.* Tests of glycemia in diabetes. Diabetes Care 2004; 27(7): 1761-1773
4. American Diabetes Association. Tests of glycemia in diabetes. Diabetes Care 2003; 26 (suppl 1): S106-S108
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: 837-853

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

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

بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) و Limit of

Blank (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با ۰/۵۴

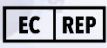






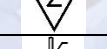
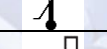

درصد تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645 SD_s$$

$$LOB = Mean_b + 1.645 SD_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

علائم استفاده شده در برجسب کالاها

	Authorized representative in the European community
	Manufacturer
	Use-by date
	Batch code
	In vitro diagnostic medical device
	European conformity
	Catalogue number
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه همولیزات به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب و سطح HbA1c در ترکیب به دست آمده اندازه‌گیری شد.

No.	Sample (%)	Added	Exp.	Obs.	% Rec.
1	4.2	5.1	4.65	4.73	101.7
2	6.1	8.9	7.5	7.39	98.5
3	6.1	10.2	8.15	8.21	100.7
4	9.2	7.2	8.25	8.5	103

بررسی درستی-آزمون خطی بودن (Linearity)

نتایج HbA1c حاصل از آنالیز نمونه‌های مختلف با استفاده از کیت حاضر نشان داد که این کیت در محدوده ۱۶-۲ درصد تست به صورت خطی عمل می‌کند. معیار پذیرش در این آزمایش Bias < 10% است.

بررسی درستی - مقایسه روش‌ها**(Comparison of Methods)**

جهت بررسی صحت نتایج این کیت، میزان HbA1c در ۱۰۰ نمونه همولیزات با مقادیر پایین، نرمال و بالا توسط این کیت اندازه‌گیری شد و نتایج آن با کیت مرجع مقایسه و ضریب همبستگی بین نتایج به دست آمده از دو کیت، بر اساس روش پیرسون ۰/۹۸۳ محاسبه گردید. معیار پذیرش برای این آزمایش به صورت زیر تعریف شده است:

$$0.9 \leq \text{Pearson Correlation Coefficient} \leq 1.0$$

بررسی تداخلات (Interference)

بر اساس فرمول زیر، درصد تداخلات رایج در سنجش HbA1c مورد ارزیابی قرار گرفت:

$$\% \text{ تداخل} = \frac{\text{میانگین غلظت قبل از افزودن آنالیت مداخله گر} - \text{میانگین غلظت بعد از افزودن آنالیت مداخله گر}}{\text{میانگین غلظت قبل از افزودن آنالیت مداخله گر}} \times 100$$

هموگلوبین استیل، کاربامیل، Labile HbA1c در این تست تداخلی ایجاد نمی‌کنند. همچنین انواع هموگلوبین S، C، E با سنجش HbA1c تداخل ندارند. مواد مداخله‌گر زیر نیز با واکنش آنزیمی اندازه‌گیری HbA1c تداخلی ندارند.

در فرمت NGSP گزارش می‌گردند. ارتباط بین نتایج HbA1c در فرمت NGSP (به صورت %HbA1c) با شبکه IFCC (به صورت mmol HbA1c/mol Hemoglobin) بر اساس فرمول زیر مشخص می‌گردد:

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

محدودیت‌ها:

- ۱) محدوده خطی تست تا ۱۶ درصد می‌باشد. نمونه‌های بالاتر از ۱۶ درصد نباید رقیق‌سازی و مجدداً تست شوند بلکه باید نتیجه تست بیمار، به صورت بالاتر از ۱۶ درصد گزارش گردد (>16%).
- ۲) این تست برای نمونه خون تام انسان حاوی K₂-EDTA طراحی شده است.
- ۳) مقدار هموگلوبین توتال نمونه خون باید بین ۲۱-۸ g/dL باشد.
- ۴) هموگلوبینوپاتی‌ها و مقادیر HbF بیش از ۱۰ درصد در نتایج تداخل ایجاد می‌کنند.

خصوصیات انجام آزمایش:

نتایج هر تست ممکن است در هر آزمایشگاهی متفاوت باشد.

پارامترهای کنترل کیفی**بررسی دقت-آزمون دقت درون‌دور (Within-Run)**

دقت درون‌دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه همولیزات با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد.

Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean (%)	4.5	7.41	9.6
SD (%)	0.20	0.18	0.2
CV (%)	4.4	2.4	2.0

بررسی دقت-آزمون دقت بین‌دور (Between-Run)

دقت بین‌دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه همولیزات با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت کاری) بررسی شد.

Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean (%)	4.28	7.28	10.11
SD (%)	0.13	0.2	0.19
CV (%)	3.0	2.7	1.8