

## HbA1c Enzymatic

### کیت بیوشیمی HbA1c به روش آنزیماتیک

#### نکات قابل توجه برای مصرف کنندگان:

- ۱- از این کیت تنها برای مصرف در آزمایشگاههای تشخیص طبی میتوان استفاده نمود.
- ۲- در معرفهای این کیت از سدیم آزاید و Proclin 300 به عنوان ماده نگهدارنده (Preservative) استفاده شده است، لذا به هیچ عنوان از دهان برای کار با پیت استفاده نشود و از تماس مستقیم محلولها با دست و چشمها خودداری شود و در صورت تماس با الفاصله با آب فراوان شسته شود.
- ۳- کلیه هشدارهای معمول آزمایشگاه، در هنگام کار با محلولها رعایت گردد. در صورت نیاز به راهنماییهای ایمنی در خصوص هر یک از مواد (MSDS) می-توانید با شرکت تماس حاصل فرمایید.

#### جمع آوری و پایداری نمونه

باید یک نمونه خون تام جهت سنجش تهیه شود و اقدامات پیشگیرانه معمول در جمع آوری نمونه های وریدی رعایت شود. خون باید در یک لوله ی حاوی EDTA+NaF-EDTA و هپارین جمع شود. توجه شود که از نمونه های خون تام همولیز شده نباید استفاده شود. نمونه ها را می توان برای مدت زمان حداکثر هفت روز در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد در یخچال نگهداری کرد.

#### آماده سازی معرف ها :

معرف های R1, R2, R3 به صورت مایع و آماده مصرف می باشند.

#### آماده سازی نمونه ها:

مرحله آماده سازی نمونه ها به صورت دستی و طبق مراحل زیر انجام می شود:

- ۱- 500  $\mu$ L از محلول لیزکننده (R3) را به یک لوله آزمایش اضافه کنید.
- ۲- نمونه خون وریدی را به مدت ۵ دقیقه در دور RPM 1200 سانتریفیوژ کنید.
- ۳- 25  $\mu$ L از سلولهای خونی (لایه پایینی) نمونه سانتریفیوژ شده را به لوله حاوی محلول لیزکننده اضافه کرده و به خوبی مخلوط کنید. نمونه مخلوط شده آماده استفاده (در دستگاه اتوآنالیزر) می باشد.

#### روش انجام آزمایش با دستگاه:

این محصول بر روی انواع دستگاههای اتوآنالیزر قابل نصب و استفاده است. پارامترهای مورد نیاز برای استفاده در اتوآنالیزرهای مختلف موجود بوده، که در صورت نیاز می توانید آن را از بخش فروش شرکت جاوید طب درخواست نمایید.

#### روش انجام آزمایش به صورت دستی:

##### ۱- تست Hb

- طول موج: ۵۰۵ نانومتر
- قطر کووت: ۱ سانتی متر
- دما: ۳۷ درجه سانتیگراد
- فتومتر با هواروی صفر تنظیم شود.

#### مقدمه:

قندی که در جریان خون وجود دارد تمایل به اتصال به هموگلوبین (هموگلوبین مسئول حمل اکسیژن در خون است) در گلبول قرمز دارد این فرایند گلیکوزیلیشن (Glycosylation) نامیده می شود. هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1c) از اضافه شدن گلوکز به آمینو اسید والین انتهای آمین (ترمینال-N) زنجیره  $\beta$  در هموگلوبین HbA تشکیل می شود. قند متصل شده به هموگلوبین GHb (Glycated hemoglobin) در طی مدت ۱۲۰ روز عمر گلبول قرمز همچنان به هموگلوبین باقی می ماند.

به دلیل اینکه مقادیر GHb تحت تاثیر نوسانات روزانه غلظت گلوکز نیست و انجام فعالیتهای ورزشی و مصرف وعده غذایی تاثیری بر روی مقدار (روزانه) GHb ندارد، لذا میتوان از GHb به عنوان معیاری برای ارزیابی سطح گلوکز خون استفاده نمود. علاوه بر این، GHb به عنوان معیاری برای تشخیص دیابت و همچنین تعیین میزان خطر بروز مشکلات و عوارض میکروواسکولار (رتینوپاتی، نفروپاتی و نوروپاتی) در بیماران دیابتی است.

#### اساس آزمایش:

جهت انجام آزمایش در مرحله اول، غلظت هموگلوبین موجود در نمونه در طول موج مناسب اندازه گیری می شود و همچنین در این مرحله آنزیم پروتئاز، دیپپتید گلیکوزیله شده انتهای آمین زنجیره  $\beta$  هموگلوبین را برش می دهد. در مرحله دوم آنزیم Fructosyl در حضور اکسیژن مولکولی بر روی دی پپتید گلیکوزیله جدا شده، اثر کرده و باعث تولید پروکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) می شود. پروکسید هیدروژن تولید شده در حضور آنزیم پروکسیداز (POD) با عامل رنگزا (کروموزن) واکنش داده و باعث تشکیل رنگ می شود. با اندازه گیری میزان تغییرات جذب نوری، غلظت هموگلوبین و HbA1c موجود در نمونه تعیین می شود. در نهایت با جمع بندی نتایج حاصل از محاسبه غلظت هموگلوبین و HbA1c، میزان درصد HbA1c محاسبه می شود.

#### معرف ها:

| فرمت         | محتویات کیت |           |           |
|--------------|-------------|-----------|-----------|
| A1C - 80ML   | R1 2×30ML   | R2 2×10ML | R3 3×50ML |
| A1C - 140 ML | R1 4×30ML   | R2 2×10ML | R3 3×50ML |

#### مواد و لوازم مورد نیاز:

- ۱- معرف ها
- ۲- تجهیزات معمول مورد استفاده در آزمایشگاه
- ۳- کالیبراتورها و کنترل های HbA1c
- ۴- آب مقطر

## HbA1c Enzymatic

### کیت بیوشیمی HbA1c به روش آنزیماتیک

**دامنه اندازه گیری:**

این کیت توانایی اندازه گیری HbA1C در محدوده 3% تا 14% را دارد.

| Inter assay Precision n=50 | Mean(%) | SD(%) | CV(%) |
|----------------------------|---------|-------|-------|
| نمونه ۱                    | 3.16    | 0.05  | 1.93  |
| نمونه ۲                    | 5.99    | 0.08  | 1.77  |
| نمونه ۳                    | 11.87   | 0.1   | 1.06  |

**محدودیت ها و تداخلات:**

بیلیروبین آزاد تا غلظت 50mg/dL، بیلیروبین کونژوگه تا غلظت 50mg/dL، Intralipos (امولسیون لیپید تزریقی) با غلظت 2% آسکوربیک اسید تا غلظت 50 mg/dL و کدورت ناشی از فرمازین تا 3000 واحد موجب تداخلی در نتیجه آزمایش نمی شوند.

**مقایسه روشها (Accuracy):**

در مقایسه انجام شده جهت ارزیابی کیت HbA1C شرکت جاوید طب (y) با یکی از متداول ترین کیت های HbA1C (x) بر روی ۵۰ نمونه بیمار نتایج زیر به دست آمد.

$$y = 0.98x + 0.04, r = 0.991$$

**منابع:**

- 1- Burtis, C. A., et al, (2012), Tietz textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 5th edition, Elsevier.
- 2- Japan Diabetes Society: A guideline for medical treatment of diabetes 2010, p. 9, Bunkodo (2010).
- 3- American Diabetes Association, Standards of Medical Care in Diabetes-2015, Diabetes Care, Vol. 38.
- 4- Japan Society of Clinical Chemistry Committee on the Standardization of Diabetes-Related Laboratory Testing: Guideline for the use of IFCC units for HbA1c Measurements (ver.2.0:2008-10-06) supplement, Clinical Chemistry, 38, 440-445 (2009)

| نمونه یا کالیبراتور | بلانک  | آب مقطر |
|---------------------|--------|---------|
| ---                 | 20 µL  | نمونه   |
| 20 µL               | ---    | R1      |
| 300 µL              | 300 µL |         |

پس از مخلوط نمودن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه نموده و جذب نوری نمونه یا کالیبراتور یا کنترل را در مقابل شاهد اندازه گیری نمایید.

$$\text{محاسبات: } \text{Hb} = \frac{\text{Abs}_{\text{Sample}}}{\text{Abs}_{\text{Cal}}} \times \text{Cal. Concen.} (\mu\text{mol/L})$$

**۲- تست Hb**

طول موج: ۶۶۰ نانومتر

قطر کووت: ۱ سانتی متر

دمای: ۳۷ درجه سانتیگراد

فلتومتر با هوا روی صفر تنظیم شود.

| نمونه یا کالیبراتور | بلانک  | آب مقطر |
|---------------------|--------|---------|
| ---                 | 20 µL  | نمونه   |
| 20 µL               | ---    | R1      |
| 300 µL              | 300 µL |         |

پس از مخلوط نمودن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه نموده و سپس معرف ۲ را اضافه کنید.

| 300 µL | 300 µL | R2 |
|--------|--------|----|
|--------|--------|----|

پس از مخلوط نمودن بلافاصله جذب نوری اولیه کالیبراتور و کنترل ها و نمونه را اندازه گیری نمایید سپس دقیقاً پس از ۵ دقیقه انکوباسیون مجدد در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد جذب نوری ثانویه را در برابر شاهد اندازه گیری نمایید

$$\text{محاسبات: } \text{A1C} = \frac{\Delta A_{\text{Sample}}}{\Delta A_{\text{Cal}}} \times \text{Cal. Concen.} (\mu\text{mol/L})$$

جهت محاسبه HbA1C نتایج فوق را در فرمول زیر قرار دهید:

$$\text{HbA1}(\%) = (\text{A1C} / \text{Hb} \times 0.09148) + 2.152$$

| دامنه مرجع                             |            |
|----------------------------------------|------------|
| Normal Glucose Tolerance               | ≥ %5/6     |
| Pre-diabetics (High risk for diabetes) | 5/7 – %6/4 |
| Diabetes                               | ≤ 6/5      |

**میزان دقت:**

| Intra assay Precision n=50 | Mean(%) | SD(%) | CV(%) |
|----------------------------|---------|-------|-------|
| نمونه ۱                    | 3.17    | 0.05  | 1.81  |
| نمونه ۲                    | 5.98    | 0.07  | 1.63  |
| نمونه ۳                    | 11.88   | 0.11  | 1.03  |