HbA1c

(Glycated Hemoglobin)
(Enzymatic)

REF	Contents	
PT-A1c-80	R1 2 × 30 ml, R2 2 × 10 ml, R3 2 × 70 ml	80 ml
PT-A1c-140	R1 4 × 30 ml, R2 2 × 10 ml, R3 2 × 70 ml	140 ml
PT-A1c-917	R1 2 × 30 ml, R2 2 × 10 ml, R3 2 × 85 ml	Hitachi-917 series

کاربرد:

ارزیابی کنترل بلند مدت غلظت گلوکز در افراد دیابتی، تشخیص دیابت و شناسایی افرادی که در معرض خطر ابتلا به دیابت هستند (Pre-diabetic).

اهمیت بالینی:

گلیکاسیون یا **گلایکیشن(Glycation)**، به افزوده شدن غیرآنزیماتیک واحدهای قندی به گروه‌های آمین در پروتئین‌ها گفته می‌شود. هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1c) از اضافه شدن گلوکز به آمینو اسید **والین** انتهای آمین (N- ترمینال) زنجیره β در هموگلوبین HbA تشکیل می‌شود.

HbA1c اولین بار در دهه 1960 به وسیلهٔ پزشک و ایمونولوژیست ایرانی، جناب آقای پروفسور **ساموئل رهبر** (2012 - 1929) شناسایی و معرفی شد.

تشکیل هموگلوبین گلایکه شده یا GHb(Glycated hemoglobin) یک واکنش برگشت‌ناپذیر است، به همین دلیل مقدار آن در خون به طول عمر گلوبول‌های قرمز (میانگین 120 روز) و غلظت گلوکز خون بستگی دارد. از آنجایی که سرعت تشکیل GHb مستقیما متناسب با غلظت گلوکز خون است در نتیجه مقدار GHb نشان‌دهندهٔ مقدار میانگین گلوکز در طی **8 تا 12 هفتهٔ** قبل از نمونه‌گیری خواهد بود. 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. علاوه‌براین، GHb به عنوان معیاری برای تشخیص دیابت و همچنین تعیین میزان خطر بروز مشکلات و عوارض میکرووواسکولار (رتینوپاتی، نفروپاتی و نوروپاتی) در بیماران دیابتی است.

عوامل مختلفی مانند شرایط موثر بر میزان مرگ و میر اریتروسیت‌ها (مانند آنمی همولیتیک) و نیز عواملی که باعث ایجاد تداخل در روش اندازه‌گیری می‌شوند، می‌توانند در نتایج مربوط به HbA_{1c} تداخل ایجاد نمایند. در چنین شرایطی اندازه‌گیری مقدار فروکتوزآمین (پروتئین‌های سرمی گلیکوزیله) یا آلبومین گلیکوزیله می‌تواند معیار دقیقی برای سنجش سطح گلوکز خون طی **3 – 2 هفته** قبل از نمونه‌گیری باشد.

بنابه پیشنهاد انجمن دیابت آمریکا (ADA)، افراد مبتلا به دیابت نوع 1 و همچنین افرادی که دیابت نوع 2 کنترل نشده دارند به طور معمول سالانه 3 تا 4 بار و افرادی که مبتلا دیابت نوع 2 کنترل شده هستند، 2 بار در سال باید تست HbA1c را انجام دهند.

اساس آزمایش:

در **مرحله اول**، غلظت هموگلوبین موجود در نمونه در طول موج مناسب اندازه‌گیری می‌شود و همچنین در این مرحله آنزیم پروتئاز، دی‌پپتید گلیکوزیله شدهٔ انتهای آمین زنجیره β هموگلوبین را برش می‌دهد. در **مرحله دوم** آنزیم FPOX(Fructosyl peptide oxidase) در حضور اکسیژن مولکولی بر روی دی‌پپتید گلیکوزیله جدا شده، اثر کرده و باعث تولید پروکسید هیدروژن (H_2O_2) می‌شود. پروکسید هیدروژن تولید شده در حضور آنزیم پروکسیداز (POD) با عامل رنگزا (کروموژن)* واکنش داده و باعث تشکیل رنگ می‌شود. با اندازه‌گیری میزان تغییرات جذب نوری، غلظت هموگلوبین و HbA1c موجود در نمونه تعیین می‌شود. در نهایت با جمع‌بندی نتایج حاصل از محاسبه غلظت هموگلوبین و HbA1c، میزان درصد HbA1c محاسبه می‌شود.

*[10-(Carboxymethylaminocarbonyl)-3,7-bis-(dimethylamino) phenothiazine sodium salt]

$$\text{HbA1c} \xrightarrow{\text{Protease}} \text{glycated dipeptide}$$

$$\text{Glycated dipeptide} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{FPOX}} \text{glucosone} + \text{dipeptide} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{coloring agent} \xrightarrow{\text{POD}} \text{color development}$$

محتویات کیت:

REF	PT-A1c		
PT-A1c-80	R1 2 × 30 ml	R2 2 × 10 ml	R3 2 × 70 ml
PT-A1c-140	R1 4 × 30 ml	R2 2 × 10 ml	R3 2 × 70 ml
PT-A1c-917	R1 2 × 30 ml	R2 2 × 10 ml	R3 2 × 85 ml

ترکیب معرف‌ها:

معرف	اجزاء
R1	10-(carboxymethylaminocarbonyl)-3,7-bis (dimethylamino) phenothiazine sodium salt
R2	Peroxidase (POD) Fructosyl peptide oxidase (FPOX)
R3	Pretreatment Solution (Lysis buffer)

نکات ایمنی و هشدارها:

1- از این کیت تنها برای مصرف در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی می‌توان استفاده نمود.

2- در معرف‌های این کیت از **سدیم آزاید** و **Proclin 300**به عنوان مادهٔ نگهدارنده (Preservative)استفاده شده است، لذا به هیچ عنوان از دهان برای کار با پیپت استفاده نشود و از تماس مستقیم محلول‌ها با دست و چشم‌ها خودداری شود و در صورت تماس بلافاصله با آب فراوان شسته شود.

3- منشاء کالیبراتورها و کنترل‌های HbA1c، سرم انسانی بوده و با اینکه نتایج تست‌های مربوط به HBsAg و آنتی‌بادی‌های ضد HIV-1، HIV-2 و HCV که با استفاده از روش‌های مورد تایید FDA بر روی این محصولات انجام شده است همگی منفی بوده‌اند، با این حال، لازم است تا هنگام کار، با این محصولات همانند یک نمونهٔ عفونی برخورد شود.

4- کلیه هشدارهای معمول آزمایشگاه، در هنگام کار با محلول‌ها رعایت گردد.

در صورت نیاز به راهنمایی‌های ایمنی در خصوص هر یک از مواد (MSDS)می‌توانید با شرکت تماس حاصل فرمایید.

شرایط نگهداری و پایداری معرف‌ها:

معرف‌ها در صورتی‌که در دمای 8 °C - 2 به دور از نور مستقیم نگهداری شوند تا پایان تاریخ انقضاء درج شده بر روی برچسب کیت پایدار و قابل استفاده خواهند ماند. از آلوده شدن معرف‌ها و نگهداری آنها در دمای انجماد یا در معرض نورمستقیم خودداری شود.

آماده‌سازی معرف‌ها:

معرف‌های R1، R2 و R3 به صورت مایع و آماده مصرف می‌باشند.

جمع‌آوری، آماده‌سازی و نگهداری نمونه‌ها:

نوع نمونه:

خون تام جمع‌آوری شده در لوله‌های حاوی EDTA، NaF-EDTA و هپارین.

نکته: از نمونه‌های خون تام همولیز شده نباید استفاده شود.

آماده‌سازی نمونه‌ها:

مرحله آماده‌سازی نمونه‌ها به صورت دستی و طبق مراحل زیر انجام می‌شود.

1- 500 µL از محلول لیزکننده (R3) را به یک لوله آزمایش اضافه کنید.

2- نمونه خون وریدی را به مدت 5 دقیقه در دور 1200 RPM سانتریفیوژ کنید.

3- 25 µL 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 اتوآنالایزر) می‌باشد.

نکته: کالیبراتورها و کنترل های شرکت پیشتازطب نیازی به این مرحله ندارند و تنها بعد از حل شدن آمادهٔ مصرف هستند.

شرکت پیشتاز طب زمان، آدرس: ایران، تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها ، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن ، پلاک 1، **تلفن**:021-42197000
کد پستی:1467613741،**فکس**:021-42197007، **پست الکترونیکی**:info@pishtazteb.com

اردیبهشت ماه 1397

نگهداری و پایداری نمونه‌ها:

1- نمونه‌های خون تام (قبل از آماده‌سازی)، در صورت نگهداری در یخچال تا 7 روز پایدار بوده و قابل استفاده می‌باشند.

2- نمونه‌هایی که عمل لیز (تیمار شدن با معرف R3) بر روی آنها انجام شده باشد (Pretreated samples)، تا 8 ساعت در دمای اتاق و تا 24 ساعت در یخچال قابل نگهداری و استفاده هستند. نمونه‌های لیز شده‌ای که بیش از 2 ساعت در دمای اتاق مانده‌اند قبل از استفاده باید به خوبی مخلوط شوند. قبل از انجام آزمایش باید دمای نمونه‌ها به دمای اتاق (30 - 15 °C) رسیده باشد.

روش کار:

مواد و لوازم مورد نیاز:

1 - محلول‌های کار (معرف‌ها)

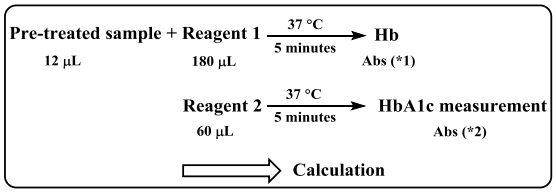
2 - تجهیزات معمول مورد استفاده در آزمایشگاه

3 – کالیبراتورها و کنترل‌های HbA1cشرکت پیشتاز طب به ترتیب با شماره کاتالوگ‌های PTCC6003 و PTC0005 جهت کالیبراسیون و کنترل.

روش انجام آزمایش:

این محصول بر روی انواع دستگاه‌های اتوآنالایزر قابل نصب و استفاده است. پارامترهای مورد نیاز برای استفاده در اتوآنالایزرهای مختلف موجود بوده، که در صورت نیاز می‌توانید آن را از بخش فروش شرکت پیشتازطب درخواست نمایید.

روش زیر به عنوان یک مثال کلی در اینجا آمده‌است:



محاسبات:

هموگلوبین: محاسبه غلظت هموگلوبین به صورت **خوانش تک‌نقطه‌ای** است، برای این منظور اختلاف جذب Abs (*1) را در طول موج 480 nm (طول موج اصلی) و 800 nm (طول موج جذب زمینه) محاسبه کنید.

$$Hb_{Abs} = Abs(^{*}1)_{480} - Abs(^{*}1)_{800}$$

HbA1c:

محاسبه غلظت HbA1cبه صورت **خوانش دو نقطه‌ای** است، برای این منظور، برای محاسبه A1 (**جذب اولیه**) اختلاف جذب Abs (*1) را در طول موج660 nm (طول موج اصلی) و 800 nm (طول موج جذب زمینه) محاسبه کنید.

$$HbA1c_{Abs1} = Abs(^{*}1)_{660} - Abs(^{*}1)_{800}$$

برای محاسبه A2 (**جذب ثانویه**) A1c،اختلاف جذب Abs (*2) را در طول موج 660 nm (طول موج اصلی) و 800 nm (طول موج جذب زمینه) محاسبه کنید.

$$HbA1c_{Abs2} = Abs(^{*}2)_{660} - Abs(^{*}2)_{800}$$

جذب نهایی HbA1c برابر است با:

$$\Delta A = A2 - A1$$

محاسبه:

$$\textbf{Sample Concen.}_{(\mu mol/L)} = \frac{\textbf{Abs}_{\textbf{Sample}}}{\textbf{Abs}_{\textbf{Cal}}} \times \textbf{Cal. Concen.}_{(\mu mol/L)}$$

به منظور تبدیل مقادیر اندازه‌گیری شده (که بر حسب µmol/L هستند) به مقادیر IFCC (mmol/mol) از رابطهٔ زیر استفاده می‌شود:

$$\mathbf{HbA_{1c}}\left(\frac{\mathbf{mmol}}{\mathbf{mol}}\right) = \frac{\mathbf{HbA_{1c}}\left(\frac{\mu mol}{L}\right)}{\mathbf{Hb}\left(\frac{\mu mol}{L}\right)} \times \mathbf{1000}$$

برای تبدیل مقادیر IFCC (mmol/mol) به NGSP (%) از رابطهٔ زیر استفاده می‌شود:

$$\mathbf{HbA_{1c}}(\%) = (\mathbf{IFCC} \times \mathbf{0.09148}) + \mathbf{2.152}$$

دامنه مرجع[3]:

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

بهتر این است که هر آزمایشگاه با توجه به اطلاعات آماری بیمارانش دامنه مرجعی مختص به خود را تعیین نماید. برای اهداف تشخیصی نتایج این تست باید با تاریخچه پزشکی بیمار، آزمایشات و دیگر یافته‌ها به‌طور همزمان بررسی شوند.

ویژگی و کارایی کیت:

1- دامنه اندازه‌گیری (Linearity):

هنگامی که غلظت هموگلوبین موجود در نمونه در محدودهٔ 310 µmol/L – 90 (5/8 – 20 g/dL) باشد، این کیت توانایی اندازه‌گیری مقدار HbA1c در محدودهٔ 14٪ - 3 را داراست.

2- حداقل میزان قابل اندازه‌گیری:

حداقل میزان HbA1c قابل اندازه‌گیری به وسیلهٔ این کیت 3٪ می‌باشد.

3- حساسیت:

1) **هموگلوبین (Hb):** جذب 0/3 – 0/1 به ازای 6/45 g/dL هموگلوبین (100 µmol/L).

2) **HbA1c:** جذب 0/1 – 0/05 به ازای غلظت10 µmol/L از HbA1c

4- صحت:

مقادیر مورد نظر در محدودهٔ 110٪ - 90 مقدار مورد نظر قرار می‌گیرند.

5- میزان دقت (Precision):

Intra-assay (n = 20)			
	Mean (%)	SD (%)	CV%
نمونه 1	5/09	0/043	0/85
نمونه 2	9/77	0/089	0/92

Inter-assay (n = 20)			
	Mean (%)	SD (%)	CV%
نمونه 1	5/07	0/045	0/89
نمونه 2	9/7	0/106	1/09

6- محدودیت‌ها و تداخلات:

بیلی‌روبین آزاد تا غلظت50mg/dL، بیلی‌روبین کونژوگه تا غلظت50mg/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 نتیجهٔ آزمایش نمی‌شوند.

7- مقایسه روش‌ها (Accuracy):

از مقایسه بین کیت HbA1cشرکت پیشتازطب (y) با روش مرجع HPLC، 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)

شرکت پیشتاز طب زمان، آدرس: ایران، تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها ، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن ، پلاک 1، **تلفن:**42197000-021

کد پستی:1467613741،**فکس:**42197007-021، **پست الکترونیکی:**info@pishtazteb.com

اردیبهشت ماه 1397