

کیت اندازه‌گیری مستقیم HbA1c به روش آنزیمی

Direct HbA1c Assay (Enzymatic, On-Board Lysis) Kit
Cat. No: 1255./ Rev.: 11 (1400/07/14)

مقدمه:

سطح HbA1c به‌منظور پایش طولانی مدت سطح گلوکز در خون افراد دیابتی مورد بررسی قرار می‌گیرد. HbA1c محصول اتصال غیر آنزیمی گلوکز به اسیدآمینه والین در انتهای آمین زنجیره بتای هموگلوبین است که به‌عنوان 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 بیمارانی که پروتکل درمان آن‌ها تغییر کرده است یا به اهداف درمانی ایده آل نرسیده‌اند، به‌عنوان بخشی از برنامه مدیریت درمان دیابت، اندازه‌گیری شود با توجه به عمر ۱۲۰ روزه گلبول‌های قرمز خون، HbA1c نشانگر مناسبی برای کنترل گلیسمیک در ۲ تا ۳ ماه اخیر بیمار است. این کیت به‌منظور اندازه‌گیری HbA1c در خون سیهارگی توسط دستگاه اتوآنالایزر طراحی شده 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 رها سازی آمینواسید والین گلیک به 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 آمینواسیدهای والین توسط آنزیم پراکسیداز (POD) و با استفاده از یک کروموزن مناسب اندازه‌گیری می‌شود. در این روش نیازی 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 (Lysis Buffer): یک ویال ۱۳/۱ میلی‌لیتری.
- ۲) محلول ۱ (Reagent 1): یک ویال ۱۳/۵ میلی‌لیتری.
- ۳) محلول ۲ (Reagent 2): یک 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.
- ۳) دستگاه اتوآنالایزر.

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) 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) 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 محلول‌ها تا زمان انقضای کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی 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.

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

جمع‌آوری 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 اربتروسیت‌های ته‌نشین شده، باید نمونه خون تام به آرامی و ۵ مرتبه با سر و ته کردن (با توسط اپلیکاتور) همگن گردد. در صورت عدم همگن شدن نمونه، صحت تست تحت تأثیر قرار می‌گیرد.

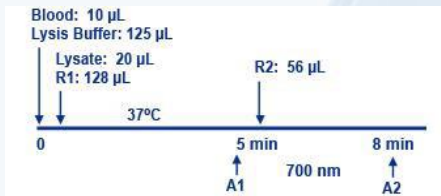
توجه: حداکثر تعداد نمونه در هر مرتبه کاری، باید به‌نحوی تعیین شود که نمونه‌برداری دستگاه اتوآنالایزر از کل نمونه‌ها حداکثر در طی مدت زمان ۲۰ دقیقه پس از مخلوط کردن نمونه‌ها انجام شود.

۲) حداقل ۲۵۰ میکرولیتر از هر نمونه خون تام در ویال مخصوص دستگاه اتوآنالایزر ریخته شود.

۳) کنترل‌ها و کالیبراتورها (در صورت لیوفیلیزه بودن) پس از آماده‌سازی، باید مانند نمونه‌های خون استفاده شوند.

شرح شماتیک:

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



مقادیر مورد انتظار برای تست HbA1c

شرکت تولید کننده 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 %
Prediabetes (increased risk for diabetes)	5.7%-6.4%
Diabetes	≥ 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 باشد، تا ۱۴ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد پایدار هستند.

کنترل کیفی:

۱) 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.

۲) در صورتی که کنترل‌ها به‌صورت لیوفیلیزه باشند باید ابتدا بر اساس بروشور مربوطه حل شده و به آرامی مخلوط گردند. در

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

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.

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

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

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

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) استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با ۰/۵۴ درصد تعیین گردید.

$$\text{LOD} = \text{LOB} + 1.645 \text{SD}_s$$

$$\text{LOB} = \text{Mean}_b + 1.645 \text{SD}_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

علائم استفاده شده در برچسب کالاها

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

بررسی دقت-آزمون دقت بین‌دور (Between-Run)

دقت بین دور با ارزیابی تجدید پذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت کاری) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean (%)	5.1	7.8	11.2
SD (%)	0.27	0.25	0.35
CV (%)	5.2	3.2	3.1

بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب و سطح HbA1c در ترکیب به دست آمده اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش، تغییر کمتر از ۱۰ درصد نسبت به نتیجه مورد انتظار 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

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 ۱۲-۴ درصد تست به صورت خطی عمل می‌کند. معیار پذیرش در این آزمایش $\text{Bias} < 10\%$ است.

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

جهت بررسی صحت نتایج این کیت، میزان HbA1c در ۴۰ نمونه سرم 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 ۰/۹۷۷ محاسبه گردید. معیار پذیرش برای این آزمایش به صورت زیر تعریف شده است:

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

صورتی که درب ویال کنترل‌ها محکم بسته باشد، تا ۱۴ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد پایدار هستند.

نتایج:

مقادیر HbA1c به صورت 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 IFCC (به صورت mmol/mol) بر اساس فرمول مشخص می‌گردد:

$$\text{NGSP} = (0.09148 \times \text{IFCC}) + 2.152$$

محدودیت‌ها:

- محدوده خطی تست تا ۱۲ درصد می‌باشد. نمونه‌های بالاتر از ۱۲ درصد نباید رقیق‌سازی و مجدداً تست شوند بلکه باید نتیجه تست بیمار، به صورت بالاتر از ۱۲ درصد گزارش گردد ($> 12\%$).
- 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.
- هموگلوبین‌وپاتی‌ها و مقادیر HbF بیش از ۱۰ درصد در نتایج تداخل ایجاد می‌کند.

خصوصیات انجام آزمایش:

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

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

دقت درون دور با ارزیابی تکرار پذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

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