

HbA1C

Enzymatic

مقادیر معرف ها :

R1		
Pipes Buffer	pH 6.8	97 mmol/l
Triton x		1 %
Proteases		4 ku/ml
R2		
Pipes Buffer	pH 6.6	99 mmol/l
FPO Enzyme		6 U/ml
Antibody Stabilizer		1 mmol/l
Chromagen		0.8 MM

هشدارها:

از بلعیدن و تماس مستقیم محلول ها با دهان و دست و چشم ها خودداری شود و در صورت تماس بلافاصله با آب فراوان شستشو داده شود.
 کلیه موارد ایمنی معمول در آزمایشگاه در هنگام کار با محلول ها رعایت گردد.

بهداشت و ایمنی دفع مواد زائد :

بر طبق قوانین تدوین شده وزارت بهداشت عمل شود.

لوازم و مواد مورد نیاز :

تجهیزات معمول آزمایشگاه پزشکی

نمونه ها :

خون تام جمع آوری شده در لوله های حاوی EDTA و هپارین
 از نمونه های همولیز شده استفاده نشود.
 از آلوده شدن نمونه ها جلوگیری شود.

شرایط نگهداری و پایداری محلولها :

محلول ها باید در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد نگهداری شوند و تا تاریخ مندرج بر روی ویال ها قابل مصرف می باشند.
 توجه : قبل از شروع به کار محلول ها را خوب مخلوط نمایید.
 توجه : از فریز نمودن و قرار دادن محلول ها در مجاورت نور خودداری شود.

مقایسه روشها :

در مقایسه انجام شده جهت ارزیابی کیت HbA1C شرکت پرشین تجهیز سیستم (Y) با یکی از متداول ترین کیت های HbA1C (X) بر روی 50 نمونه بیمار نتایج زیر بدست آمد.

$$Y = 0.9932 X + 0.042 \%$$

$$R^2 = 0.9917$$

محدوده اندازه گیری :

این کیت جهت اندازه گیری HbA1C در محدوده ۳.۵٪ تا ۱۴٪ طراحی شده است.

مقدمه :

هموگلوبین A1C یک هموگلوبین گلیکوزیله است که در طی یک واکنش غیرآنزیماتیک از اتصال گلوکز به مولکول هموگلوبین طبیعی ایجاد می شود. این پروسه در طول عمر گلبول قرمز در گردش خون اتفاق می افتد (متوسط عمر گلبول قرمز ۱۰۰ تا ۱۲۰ روز است). میزان گلیکوزیله شدن هموگلوبین با غلظت گلوکز خون نسبت مستقیم دارد.

اندازه گیری HbA1C شاخصی مناسب جهت کنترل درمان بیماران دیابتی است. افزایش HbA1C نشانگر بالا بودن میانگین غلظت گلوکز خون طی ۶ تا ۸ هفته قبل از انجام آزمایش است. از آنجاییکه عمر گلبول های قرمز ۱۲۰ روز است، حتی در صورتی که میزان قند خون در مقادیر نرمال باشد، بالا بودن HbA1C یک پیش آگهی دهنده مناسب برای دیابت ملیتوس است، مطالعات بالینی نشان داده است که پایین آوردن سطح HbA1C می تواند به پیشگیری یا به تاخیر انداختن عوارض دیابت کمک کند.

از آنجایی که مقدار HbA1C به مقدار هموگلوبین نیز بستگی دارد، مقادیر گزارش شده HbA1C به عنوان شاخصی از غلظت هموگلوبین توتال می باشد، مقادیر پایین کاذب (

پایین بودن HbA1C با وجود بالا بودن گلوکز خون) در هر شرایطی که طول عمر گلبول قرمز را کوتاه کند یا با افزایش گردش گلبول های قرمز همراه باشد، در کسانی که اخیراً خون از دست داده اند، در نارسایی کلیه، بیماری های شدید کبدی، بارداری، فیبروز کیستیک و یا افزایش گردش خون و تزریق خون و یا بالا رفتن تولید اریتروپوئیتین اتفاق می افتد. همچنین مصرف دوز بالای ویتامین های C و E نیز HbA1C را به طور کاذب کاهش میدهند.

مقادیر بالای کاذب (بالا بودن HbA1C با وجود طبیعی بودن گلوکز خون) در آنمی فقر آهن (بالا بودن نسبت گلبول های قرمز پیر)، هیپرتی گلیسیریدمی شدید، هایپر بیلیروبینمی و اورمی نیز دیده می شود. همچنین هر شرایطی که طول عمر گلبول قرمز را افزایش دهد یا با کاهش گردش گلبول های قرمز همراه باشد، سلول را برای مدت طولانی تری در معرض گلوکز قرار می دهد و در نتیجه سطح HbA1C بالاتری ایجاد می شود، مصرف داروهای ضد مالاریا و ضد HIV و مصرف بیش از اندازه ی ویتامین های B12 و اسید فولیک نیز باعث افزایش HbA1C به طور کاذب میگردد.

اساس آزمایش :

روش آنزیماتیک
 ابتدا نمونه های لیز شده تحت تاثیر پروتئاز قرار گرفته و اسید آمینه را از زنجیره ی بتا هموگلوبین آزاد می کند.
 اسید آمینه های آزاد شده بعنوان سوبسترای آنزیم فروکتوزیل (FPO) عمل کرده و پراکسید هیدروژن تشکیل می شود.
 سرعت و مقدار تشکیل پراکسید هیدروژن بصورت فتومتریک قابل اندازه گیری است.

کالیبراتور و کنترل ها :

جهت کالیبر و کنترل، می توانید از کالیبراتور و کنترل های HbA1C موجود در بازار منطبق با روش کیت استفاده نمایید.

HbA1C

Enzymatic

محاسبات :

$$A1C = \frac{\Delta A \text{ Sample}}{\Delta A \text{ Cal}} \times \text{Conc. Cal}$$

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

$$HbA1C\% = ((A1C / Hb) * 91.48) + 2.15$$

روش دستگاهی :

جهت دریافت روش انجام تست به صورت دستگاهی با شماره های شرکت تماس حاصل فرمایید.

دقت (در ۳۷ درجه سانتیگراد) :

<i>Intra-assay precision n=50</i>	<i>Mean (%)</i>	<i>SD (%)</i>	<i>CV (%)</i>
<i>Sample 1</i>	4.16	0.10	2.4
<i>Sample 2</i>	6.06	0.12	1.9
<i>Sample 3</i>	9.06	0.15	1.6
<i>Sample 4</i>	14.07	0.19	1.3

<i>Inter-assay precision n=50</i>	<i>Mean (%)</i>	<i>SD (%)</i>	<i>CV (%)</i>
<i>Sample 1</i>	4.16	0.11	2.6
<i>Sample 2</i>	6.06	0.13	2.0
<i>Sample 3</i>	9.05	0.17	1.8
<i>Sample 4</i>	14.06	0.19	1.3

عوامل مداخله گر :

بیلی روبین تا غلظت ۱۵ میلی گرم در دسی لیتر، آسکوربیک اسید تا غلظت ۱۰ میلی گرم در دسی باعث تداخل در آزمایش نمی شود.
الکل و مواد مخدر در تمامی مقادیر باعث تداخل در آزمایش می شود.

دامنه مرجع :

Non-diabetics	≤ 5.6 %
Pre-diabetics	5.7 – 6.4 %
Change of therapy	≥ 6.5 %

مآخذ :

1. Thomas L. Clinical Laboratory Diagnostics. 1st ed. Frankfurt: TH- Books Verlagsgesellschaft; 1998. p.142-48.
2. Sacks DB. Carbohydrates. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1999. p.790-6
3. Hoelzel W, Weykamp C et al. IFCC Reference System for measurement of Hemoglobin A1C in Human Blood and the National Standardization Schemes in the United States, Japan, and Sweden: A Method comparison Study. Clin Chem 2004; 50:1:166-74
4. Midema K. Standardization of HbA1C and Optimal Range of Monitoring. Scand J clin Lab Invest 2005/65 (suppl 240):61-72

آماده سازی نمونه ها :

مرحله آماده سازی نمونه ها به صورت دستی و طبق مراحل زیر انجام می شود
۱- 500µl از محلول لیزکننده را به یک لوله آزمایش اضافه کنید.
۲- نمونه خون وریدی را به مدت ۵ دقیقه در دور 1200RPM سانتریفیوژ کنید.
۳- 25µl از سلول های خونی (لایه پایینی) نمونه سانتریفیوژ شده را به لوله حاوی محلول لیزکننده اضافه کرده و به خوبی مخلوط کنید.
نمونه مخلوط شده، پس از ۳۰ دقیقه در دمای ۲-۸ درجه سانتی گراد آماده استفاده (در دستگاه اتوآنالایزر) می باشد.

روش انجام آزمایش به صورت دستی :

۱- تست Hb

طول موج : ۴۸۰ نانومتر
قطر کووت : یک سانتیمتر
دما : ۳۷ درجه سانتیگراد
اندازه گیری : فتومتر با هوا روی صفر تنظیم شود.

نمونه یا کالیبراتور	بلانک
آب مقطر	۲۰ میکرولیتر -
نمونه	- ۲۰ میکرولیتر
معرف شماره ۱	۳۰۰ میکرولیتر ۳۰۰ میکرولیتر
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.	

محاسبات :

$$Hb = \frac{\text{Abs Sample}}{\text{Abs Std/Cal}} \times \text{Conc. Std/Cal}$$

۲- تست A1C

طول موج : ۶۶۰ نانومتر
قطر کووت : یک سانتیمتر
دما : ۳۷ درجه سانتیگراد
اندازه گیری : فتومتر با هوا روی صفر تنظیم شود.

نمونه و کالیبراتور و کنترل	بلانک
آب مقطر	۲۰ میکرولیتر -
نمونه	- ۲۰ میکرولیتر
معرف شماره ۱	۳۰۰ میکرولیتر ۳۰۰ میکرولیتر
پس از مخلوط نمودن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه نموده و سپس معرف شماره دو را اضافه کنید.	
معرف شماره ۲	۱۰۰ میکرولیتر ۱۰۰ میکرولیتر
پس از مخلوط نمودن بلافاصله جذب نوری اولیه کالیبراتور و کنترل ها و نمونه ها 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.	