

# اندازه گیری HbA2 با روش کروماتوگرافی میکروستون Beta-Thal HbA2-Quick MicroColumn

**جهت کسب نتیجه صحیح از این کیت، حتما به نکات اشاره شده در بروشور دقت نمائید.**

## دمای نگهداری کیت

کیت یا جعبه باید در دمای بین ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتیگراد نگهداری شود.

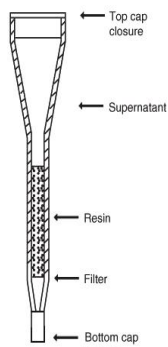
## روش انجام آزمایش

۱-همدمایی: محتویات کیت به همراه تعداد ستون مورد نیاز حداقل یک ساعت قبل از شروع آزمایش باید از جعبه خارج و در دمای آزمایش که بین ۲۲ تا ۲۸ درجه سانتیگراد می باشد، نگهداری شود تا به دمای انجام آزمایش برسد و پس از آن آزمایش شروع شود.

۲- تهیه همولیزیت: در یک لوله آزمایش ۵۰ میکرولیتر خون و ۲۵۰ میکرولیتر از محلول همولیزانت بریزید. لوله را تکان دهید تا خون کاملا لیز شود.

خون کامل باید با روش استاندارد جمع آوری شده باشد که تا یک هفته در دمای یخچال بین ۲+ تا ۸+ درجه سانتیگراد قابل نگهداری است. ماده ضد انعقاد در هنگام جمع آوری خون می تواند EDTA و یا هپارین باشد.

|                 |               |
|-----------------|---------------|
| خون             | ۵۰ میکرولیتر  |
| محلول همولیزانت | ۲۵۰ میکرولیتر |



۳- آماده سازی ستون: ابتدا درب ستون را باز نموده و سپس انتهای ستون را شکسته و بلافاصله به کمک پیپت پاستور پلاستیکی داخل کیت، رزین داخل ستون را ۴ تا ۵ بار به صورت پیوسته، سوسپانسیون و یکنواخت نمائید. با قرار دادن ستون در یک لوله آزمایش اجازه دهید تا بافر رزین کاملا خارج شود.

۴- افزودن همولیزیت: پس از خارج شدن بافر رزین، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از همولیزیت تهیه شده را با استفاده از سمپلر به آرامی بر روی سطح رزین اضافه کنید. مدت زمان جذب همولیزیت بر روی رزین حدود یک دقیقه می باشد.

|          |               |
|----------|---------------|
| همولیزیت | ۱۰۰ میکرولیتر |
|----------|---------------|

۵- تهیه هموگلوبین توتال: ۱۰۰ میکرولیتر از همولیزیت را در یک لوله آزمایش حاوی ۱۵ میلی لیتر آب دیونیزه بریزید.

|          |               |
|----------|---------------|
| آب مقطر  | ۱۵ میلی لیتر  |
| همولیزیت | ۱۰۰ میکرولیتر |

۶- بافر جداکننده (Developer): به آرامی ۱۰۰ میکرولیتر از بافر جداکننده (Developer) را با استفاده از سمپلر بر روی سطح رزین بریزید. منتظر بمانید تا حجم ریخته شده خارج گردد.

|                         |               |
|-------------------------|---------------|
| بافر جداکننده مرحله اول | ۱۰۰ میکرولیتر |
|-------------------------|---------------|

۷- افزودن بافر جداکننده و جمع آوری Hb A2 در لوله آزمایش تمیز:

- جهت جمع آوری HbA2 ستون را بر روی یک لوله آزمایش جدید و تمیز قرار دهید.

## معرفی محصول و کاربرد آن

خون برای حمل اکسیژن در بدن از هموگلوبین A یا A1 (HbA) که متشکل از زنجیره های آلفا و بتا می باشد، بهره می برد. اما هموگلوبین A2 (HbA2) که دارای زنجیره های آلفا و دلتا می باشد، مقدار کمی از هموگلوبین خون را تشکیل داده است که این هموگلوبین توانائی مناسب برای حمل اکسیژن خون را ندارد زیرا زنجیره بتا ندارد. در صورتیکه میزان هموگلوبین A2 بیش از مقدار طبیعی باشد، آنگاه فرد از نظر خونی مبتلا به بتا تالاسمی مینور است لذا دانستن مقدار HbA2 برای تشخیص وضعیت کم خونی افراد اهمیت دارد. برای ارزیابی میزان هموگلوبین A2 می توان از روش های مختلفی از جمله تکنیک کروماتوگرافی و یا الکتروفورز استفاده نمود.

## اصول آزمایش

در آزمایش پیش روی از تکنیک کروماتوگرافی از نوع تعویض آنیونی و با شرایط کنترل pH برای ارزیابی هموگلوبین A2 استفاده می شود بطوریکه هموگلوبین با بار الکتریکی منفی در هنگام عبور از میکروستون که حاوی ذرات رزین با بار الکتریکی مثبت است، بدان جذب می شود. با افزودن بافر جداکننده، هموگلوبین A2 (HbA2) از سطح ذرات رزین جدا و از انتهای ستون خارج و با روش فوتومتری اندازه گیری می شود.

## محتویات کیت

|                                   |           |
|-----------------------------------|-----------|
| ستون کروماتوگرافی حاوی رزین       | 20 pieces |
| بافر جدا کننده HbA2               | 100 ml    |
| محلول همولیزانت و یا همولیز کننده | 20 ml     |
| پیپت پاستور پلاستیکی              | 1 piece   |

- ابزارهای مهم مورد نیاز که در کیت وجود ندارند :  
دستگاه اسپکتروفوتومتر و سمپلر

## موارد احتیاط

- در هنگام کار از دستکش و لباس محافظ آزمایشگاهی استفاده کنید.
- نگهداری کیت در محدوده غیر از دمای ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتیگراد ممکن است موجب نتیجه غیر صحیح شود.
- محصول را دور از حرارت و نور مستقیم آفتاب نگهداری کنید.
- از خوردن و آشامیدن و سیگار کشیدن در حین کار پرهیز کنید.
- کیت مصرف شده را بر طبق قوانین دفع پسماند، دفع کنید.
- در صورت وجود هرگونه آسیب به محصول، از به کار بردن آن خودداری نمائید.
- از به کار بردن کیت با تاریخ منقضی خودداری گردد.
- تمامی نمونه های مورد آزمایش را پاتوژن تلقی نمائید.
- از هر ستون فقط برای یکبار تست استفاده شود.

## مشخصه های عملکردی

|                      | In 405nm | In 415nm |
|----------------------|----------|----------|
| CV for normal sample | 3.00     | 2.90     |
| CV for high sample   | 2.95     | 2.85     |

در ارزیابی مقدار HbA<sub>2</sub>، نتایج حاصل از این کیت رابطه خطی ذیل را در مقایسه با تکنیک الکتروفورز capillary (CE) نشان داد.

$$Y (\%Hb Padtanteb) = 0.97 \times (\%Hb CE) - 0.03$$

خطای سیستماتیک بصورت Bias منفی یا مثبت مربوط به عدم رعایت نکات اشاره شده در کیت در خصوص نحوه ریختن بافر و یا عدم رعایت دمای انجام آزمایش می باشد.

انحراف معیار (SD) در صورت رعایت نکات لازم برای این کیت ۰,۰۷۱ می باشد.

## کنترل کیفیت

جهت کنترل کیفی کیت، میتوانید از کنترل های تجاری موجود در بازار استفاده نمایید.

## موارد و مواد مداخله گر

- اندازه گیری هموگلوبین A<sub>2</sub> به روش کروماتوگرافی و یا الکتروفورز، نباید در بیمارانی که اخیراً خون دریافت کرده اند صورت پذیرد.
- خون با بیلی روبین تا 0.02g% و لیپمیک بصورت تری گلیسرید تا 1g% تداخلی در نتایج آزمایش ندارد.

## References

Ali.M.A.M.& Schwertner, E., AJCP, -63: 549, 1975  
Rowley, P.T., Am J Hem 1:129-137, 1976  
Abraham EC et al. Hemoglobin 1976-77; 1:27-44.  
Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. WB Saunders Co, 2005.  
Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACC Press, 2000.

در صورت بروز هرگونه مشکل با این محصول، لطفاً با تلفن های پشتیبانی تماس حاصل بفرمایید.

شرکت پادتن طب

تهران، شهر قدس، میدان مادر، بلوار کیمیاپژوهان،

کوچه پارس، پلاک ۸

۰۲۱ ۴۶۸۴۵۸۸۰

تلفن سرویس پشتیبانی: ۰۲۱ ۴۶۸۸۴۶۲۸ داخلی ۱۰۳

www.padtanteb.ir

info@padtanteb.ir

| SYMBOLS        | REF         | LOT       | IVD                     | Temperature | Use By | Consult Instructions | Manufacturer |
|----------------|-------------|-----------|-------------------------|-------------|--------|----------------------|--------------|
| EN ISO 13228-1 | Catalog No. | Batch No. | In Vitro Diagnostic Use | Range       |        | for Use              |              |



Rev 01



- با استفاده از پیپت شیشه ای مناسب، دقیقاً مقدار ۳ میلی لیتر از بافر جدا کننده را به آرامی و با کمی زاویه در تماس با دیواره داخلی ستون بدان بیافزایید بطوریکه سطح رزین صدمه نبیند.

- منتظر بمانید تا تمامی بافر افزوده شده از انتهای ستون کاملاً خارج گردد. حجم خارج شده باید ۳ میلی لیتر باشد و حاوی HbA<sub>2</sub> است.

| بافر جداکننده | ۳ میلی لیتر | محلول خارج شده را جمع آوری کنید. |
|---------------|-------------|----------------------------------|
|---------------|-------------|----------------------------------|

۸- سنجش مقدار HbA<sub>2</sub>: قبل از خواندن جذب نوری، محلول را هموژن نمائید و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر جذب نوری لوله های حاوی HbA<sub>2</sub> و هموگلوبین توتال را حداکثر تا ۹۰ دقیقه پس از جمع آوری در طول موج ۴۱۵ نانومتر بخوانید. از آب دیونیزه به عنوان بلانک استفاده شود. (در صورت عدم دسترسی به طول موج ۴۱۵ نانومتر، از طول موج ۴۰۵ نانومتر نیز می توان استفاده نمود).

توجه: پس از اتمام آزمایش جهت بهبود عملکرد کیت تا پایان تاریخ مصرف، محتویات آن را مجدداً داخل جعبه قرار دهید (دور از نور).

## محاسبه نتایج

از فرمول زیر برای محاسبه نتایج استفاده نمائید:

$$\frac{OD\ Hb\ A_2\ (OD\ Test)}{OD\ Hb\ Total} \times 20 = \%HbA_2$$

## محدوده مرجع

HbA<sub>2</sub> در اشخاص نرمال در محدوده 3.5 - 1.5 % و در افراد بتا تالاسمی 8 - 3.5 % می باشد. مقادیر غیر نرمال HbA<sub>2</sub> باید با سابقه بیماری، مقدار MCV، هموگلوبین، هماتوکریت و دیگر یافته های آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار بگیرد. این کیت با Hb F هیچگونه تداخلی ندارد.

|                |           |
|----------------|-----------|
| در اشخاص نرمال | 1.5-3.5 % |
| در بتا تالاسمی | 3.5-8 %   |

برای مقادیر غیرنرمال آزمایش الکتروفورز Capillary و یا HPLC انجام گردد.

## نکات مهم

- در موارد زیر ممکن است که جواب بدست آمده صحیح نباشد:
- انجام آزمایش در دمایی غیر از دمای ۲۲ تا ۲۸ درجه سانتیگراد.
- استفاده از خون غیر تازه (در صورت لزوم نمونه تا یک هفته در دمای یخچال قابل نگهداری است).
- سوسپانسیون نامناسب رزین ستون
- تخلیه ناقص بافر از انتهای ستون در هر مرحله
- عدم رعایت دمای نگهداری کیت
- کالیبره نبودن سمپلر و اسپکتروفتومتر
- پس از تخلیه بافر ستونها و برای اجتناب از خشک شدن سطح رزین، حداکثر ۵ دقیقه فرصت دارید تا همولیزیت را به سطح رزین اضافه کنید.
- این کیت برای تمامی سنین قابل استفاده می باشد.

توجه: بدیهی است صحت و دقت نتایج بدست آمده در گرو رعایت دقیق دستورالعمل کیت می باشد.