Original Article

ปริมาณฮีโมโกลบิน เอ วัน ซี ในตัวอย่างเลือดที่เก็บโดยใช้สารกันเลือดแข็งชนิด อีดีทีเอ ลิเทียมเฮปาริน ลิเทียมเฮปารินผสมกลีเซอราลดีไฮด์ และโซเดียมฟลูออไรด์

Hemoglobin A_{1c} levels obtained from EDTA, lithium heparin, lithium eeparin plus glyceraldehydes, and sodium fluoride blood samples

วันวิสาข์ บุญเลิศ[1]
พิทยา นาระกันทา[1]
สุรเชษฎ์ อ่อนเส็ง[1]
สิริอร แย้มโพธิ์ใช้[1]
ณรงค์ นวลเมือง[1]
กนกวรรณ เหมาะประสิทธิ์[2]

Wanvisa Boonlert[1]
Phitaya Narakantha[1]
Surachedt Onseng[1]
Sirion Yamphochai[1]
Narong Nuanmuang[1]
Kanokwan Mohprasit[2]

[1]ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร [2]ห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลพุทธชินราช อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000

[1]Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University
[2]Clinical Chemistry Laboratory, Clinical Pathology Consortiums, Bhudhachinaraj Hospital, Phitsanulok, 65000, Thailand
E-mail: wanvisaboon@yahoo.com
Songkla Med J 2010;28(3):107-116

บทคัดย่อ:
วัตถุประสงค์: เพื่อเปรียบเทียบปริมาณฮีโมโกลบินเอวันซี (hemoglobin A_{1c}: HbA_{1c}) ในตัวอย่างเลือดที่เก็บโดยใช้สารกันเลือดแข็งชนิดต่างๆ
วัสดุและวิธีการ: ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยเบาหวาน จำนวน 30 ราย และอาสาสมัครผู้มีสุขภาพดี จำนวน 5 ราย เจาะเก็บโดยเติมสารกันเลือดแข็งชนิด อีดีทีเอ ลิเทียม-เฮปาริน ลิเทียมเฮปารินผสมกับกลีเซอราลดีไฮด์ และโซเดียมฟลูออไรด์ นำมาเก็บที่อุณหภูมิห้อง (26-28 °ซ) เป็นเวลา 1-8 ชั่วโมง และที่ตู้เย็น (2-8 °ซ) เป็นเวลา 0-5 วัน ก่อนนำเลือดดังกล่าวมาตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c} ด้วยหลักการ Turbidimetric inhibition immunoassay (TI) และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และนำปริมาณ HbA_{1c} ในตัวอย่างเลือดที่เก็บโดยใช้สารกันเลือดแข็งชนิดต่างๆ ณ เวลาต่างๆ ที่วิเคราะห์ได้ มาเปรียบเทียบด้วยวิธีทางสถิติ
ผลการศึกษา: ค่าเฉลี่ยของระดับ HbA_{1c} ในตัวอย่างเลือดที่เก็บโดยใช้สารกันเลือดแข็งชนิดต่างๆ มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) เมื่อตรวจวัดด้วยหลักการ TI และ HPLC และพบว่าปริมาณ HbA_{1c} ในชั่วโมงที่ 1, 4, 8 (อุณหภูมิห้อง) และวันที่ 0, 1, 3, 5 (อุณหภูมิตู้เย็น) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)
สรุป: ลิเทียมเฮปาริน ลิเทียมเฮปารินผสมกับกลีเซอราลดีไฮด์ และโซเดียมฟลูออไรด์ สามารถใช้เป็นสารกันเลือดแข็งในการตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c} ด้วยหลักการ TI และ HPLC แทนสารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอได้ โดย HbA_{1c} สามารถคงสภาพได้อย่างน้อย 8 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และอย่างน้อย 5 วัน ที่อุณหภูมิตู้เย็น

คำสำคัญ: ไกลเคทฮีโมโกลบิน, ไกลโคไลซีส, เบาหวาน, สารต้านการแข็งตัวของเลือด, ฮีโมโกลบินเอวันซี

รับต้นฉบับวันที่ 30 ธันวาคม 2552 รับลงตีพิมพ์วันที่ 26 มีนาคม 2553

Abstract:

Objectives: To compare hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) levels in blood samples which were collected using various types of anticoagulant.

Materials and methods: Blood samples were collected from 30 diabetices patients and 5 healthy volunteers using tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), lithium heparin (LH), lithium heparin plus glyceraldehydes (LH+GA), and sodium fluoride (NaF). All blood samples were kept at room temperature (26-28 °C) for one to eight hours and then in a refrigerator at 2-8 °C for zero to five days before measuring the HbA_{1c} levels. HbA_{1c} levels using Turbidimertic Inhibition immunoassay (TI) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC). HbA_{1c} levels obtained from various types of anticoagulants and at various time points were analyzed and compared using standard statistical methods.

Results: The Mean of HbA_{1c} levels obtained from EDTA, LH, LH+GA, and NaF blood samples were not significantly different ($p>0.05$) as measured with either the TI or HPLC methods. The levels of HbA_{1c} samples prepared with various types of anticoagulants at 1^{st}, 4^{th},8^{th} hours (room temperature) and 0, 1^{st}, 3^{th}, 5^{th} days (refrigerator temperature) were not significantly different ($p>0.05$).

Conclusions: LH, LH plus GA, and NaF anticoagulants did not influence HbA_{1c} levels in blood samples and can be used instead of EDTA for collecting blood for HbA_{1c} measurements both TI and HPLC methods. The level of HbA_{1c} remains stable for at least 8 hours at room temperature and at least 5 days at refrigerator temperature (2-8 °C).

Key words: anticoagulants, diabetes mellitus, glycated hemoglobin, glycolysis, HbA_{1C}

บทนำ

โรคเบาหวานเป็นโรคทางเมตาบอลิสม (metabolism) ที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูง ความผิดปกติดังกล่าวมีส่วนเกี่ยวข้องกับความเสียหายในระยะยาว การสูญเสียหน้าที่และความล้มเหลวของอวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะ ตา ไต ระบบประสาท หัวใจ และหลอดเลือด ถือว่าเป็นโรคหนึ่งที่สร้างปัญหาทางการแพทย์ในปัจจุบัน[1,2]

การตรวจระดับน้ำตาลในเลือดในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นเบาหวานอาจไม่เพียงพอสำหรับการติดตามการดำเนินโรคและการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด เนื่องจากไม่สามารถบ่งบอกสภาวะการควบคุมโรคเบาหวานในช่วงระยะเวลาที่ผ่านมา และระดับน้ำตาลในเลือดของแต่ละวันจะแปรเปลี่ยนไปตามปัจจัยต่างๆ[3] การวัดระดับฮีโมโกลบินเอวันซี (Glycosylated hemoglobin หรือ Hemoglobin A_{1c} หรือ HbA_{1c}) ซึ่งเป็นฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) ที่มีโมเลกุลของกลูโคสเกาะติดอยู่ สามารถบอกถึงภาวะน้ำตาลในเลือดสะสมย้อนหลังได้ประมาณ 2-3 เดือน จึงมีประโยชน์สำหรับใช้ติดตามผลการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวานระหว่างการรักษา และยังช่วยประเมินความเสี่ยงในการเกิดโรคแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวานได้[4-6]

หลักการ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ระดับ HbA_{1c} และในปัจจุบันหลักการ Turbidimetric inhibition immunoassay (TI) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีความจำเพาะสูงและนิยมใช้ในห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาล เช่นกัน โดยการตรวจจะใช้ตัวอย่างเลือดที่เก็บโดยใช้ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) เป็นสารกันเลือดแข็ง[7] และส่วนใหญ่แพทย์จะสั่งตรวจควบคู่กับระดับกลูโคสและสารชีวเคมีอื่น ทำให้ในการเจาะเลือดเพื่อตรวจติดตามการรักษาเบาหวานจำเป็นต้องเจาะเลือดอย่างน้อย 2 หลอด คือ sodium fluoride blood (NaF blood) เพื่อตรวจระดับน้ำตาลในเลือด และ EDTA blood เพื่อตรวจ HbA_{1c} หรืออาจต้องเจาะ clot blood เพื่อตรวจสารชีวเคมีอื่นๆ เพื่อประเมินไขมันในเลือดและการทำงานของไต เป็นต้น ทำให้ต้องเก็บตัวอย่าง

เลือดจากผู้ป่วยเป็นจำนวนมาก และใช้หลอดเก็บตัวอย่างเลือดหลายชนิด นอกจากนั้นยังพบว่าผู้เจาะเลือดมักไม่ส่ง EDTA blood มาด้วย จึงไม่สามารถรายงานผลการตรวจวัด HbA_{1c} ควบคู่กับระดับน้ำตาลได้[5]

งานวิจัยของ เพ็ญศิริ ชูส่งแสง และคณะ[6] ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c} โดยใช้ EDTA blood กับ NaF blood โดยเก็บตัวอย่างเลือดที่เป็น EDTA blood และ NaF blood จากผู้ป่วยรายเดียวกัน จำนวน 212 ราย นำมาวิเคราะห์ปริมาณ HbA_{1c} โดยวิธี Turbidimetric inhibition immunoassay ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Hitachi 717 พบว่า HbA_{1c} ใน EDTA blood และ NaF blood ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ สรุปได้ว่าสามารถใช้ NaF blood มาตรวจวิเคราะห์ปริมาณ HbA_{1c} ได้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการเปรียบเทียบในสารกันเลือดแข็งอื่น เช่น เฮปาริน ซึ่งเป็นสารกันเลือดแข็งที่นำมาใช้ตรวจทางห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก โดยเฉพาะในงานเร่งด่วนที่ต้องการลดเวลาในการเตรียมซีรั่ม[7] จากการศึกษาที่ผ่านมา ได้นำโซเดียมเฮปาริน (Sodium heparin) มาผสมกับกลีเซอราลดีไฮด์ (Glyceraldehydes) ซึ่งเป็นสารตัวหนึ่งที่มีฤทธิ์ต้านการสลายกลูโคส และสามารถใช้ตรวจปริมาณสารชีวเคมีในเลือดอื่นๆ ได้ โดยสามารถรักษาระดับกลูโคสได้นานถึง 8 ชั่วโมง[7]

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบระดับ HbA_{1c} ในตัวอย่างเลือดที่เก็บโดยใช้สารกันเลือดแข็ง ได้แก่ อีดีทีอี (EDTA) ลิเทียมเฮปาริน (LH) ลิเทียม-เฮปารินผสมกับกลีเซอราลดีไฮด์ (LH+GA) และโซเดียมฟลูออไรด์ (NaF) ด้วยหลักการ Turbidimetric inhibition immunoassay และ HPLC รวมทั้งศึกษาความคงตัว (stability) ของ HbA_{1c} ในตัวอย่างเลือดที่เก็บโดยใช้สารกันเลือดแข็งแต่ละชนิดที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิตู้เย็น

วัสดุและวิธีการ

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 หลอดเก็บตัวอย่างเลือดสำเร็จรูป (Greiner bio-one, Austria) ชนิด EDTA, LH และ NaF tube

1.2 เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Cobas c 111 (Roche, Switzerland)

1.3 เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ HPLC BIO-RAD D-10 (Laboratories, Munich, Germany)

2. กลุ่มตัวอย่าง

เป็นผู้ป่วยเบาหวานที่ได้รับการวินิจฉัยโดยแพทย์ว่าเป็นเบาหวาน และอยู่ในการดูแลของสถานีอนามัยท่าโพธิ์ ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พิษณุโลก จำนวน 30 ราย และคนสุขภาพดีจำนวน 5 ราย การศึกษานี้ได้ผ่านการรับรองการทำวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก

3. การควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์

ก่อนทำการตรวจวิเคราะห์คณะผู้วิจัยได้ทำการควบคุมคุณภาพของการตรวจวิเคราะห์ HbA_{1c} ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Cobas c 111 เป็นเวลา 20 วัน และเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ HPLC BIO-RAD D-10 เป็นเวลา 7 วัน ผลการควบคุมคุณภาพแสดงในตารางที่ 1 โดยใช้สารควบคุมคุณภาพ 2 ระดับ ดังนี้

เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Cobas c 111 ระดับปกติ มีค่า HbA_{1c} ร้อยละ 4.62-6.66 และระดับสูงกว่าปกติ มีค่า HbA_{1c} ร้อยละ 8.07-11.61

เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ HPLC BIO-RAD D-10

Biorad-1 ระดับปกติ มีค่า HbA_{1c} ร้อยละ 5.20-6.40 และระดับสูงกว่าปกติมีค่า HbA_{1c} ร้อยละ 8.80-11.20

4. หลักการตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c}

4.1 หลักการ Turbidimetric inhibition immunoassay (TI)

คือ HbA_{1c} จะทำปฏิกิริยากับ anti-HbA_{1c} antibody อยู่ในรูป antigen-antibody complex ส่วนที่เหลือของ anti-HbA_{1c} antibody จะทำปฏิกิริยากับ polyhapten อยู่ในรูปของ antibody-polyhapten complex ซึ่งไม่ละลาย วัดความขุ่นของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

ตารางที่ 1 แสดงผลการควบคุมคุณภาพ 2 ระดับ ของเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Cobas c 111 และ HPLC BIO-RAD D-10 (n=20)

เครื่องวิเคราะห์	สารควบคุมคุณภาพ	ช่วงการวิเคราะห์ปริมาณ HbA_{1c} (ร้อยละ)	Within-run			Between-day run		
			ค่าเฉลี่ย (ร้อยละ)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ร้อยละ)	สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (ร้อยละ)	ค่าเฉลี่ย (ร้อยละ)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ร้อยละ)	สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (ร้อยละ)
Cobas c 111	I	4.62-6.66	5.90	0.10	0.40	5.40	0.10	1.10
	II	8.07-11.61	10.00	0.10	0.20	9.80	0.10	1.30
HPLC	I	5.20-6.40	5.70	0.10	1.20	5.84	0.16	2.77
BIO-RAD D-10	II	8.80-11.20	9.90	0.08	0.89	10.01	0.09	0.90

เทียบเป็นความเข้มข้น HbA_{1c} (กรัม/เดซิลิตร) สำหรับการตรวจวัดปริมาณ hemoglobin จากความเข้มของสีที่เกิดขึ้น โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบเป็นปริมาณ Total hemoglobin[4]

4.2 หลักการ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

แยก HbA_{1c} ออกจากฮีโมโกลบินชนิดอื่นๆ โดยอาศัยคุณสมบัติ Cation exchange HPLC และรายงานความเข้มข้น HbA_{1c} เป็นร้อยละต่อปริมาณฮีโมโกลบินรวม[3]

5. ขั้นตอนการศึกษา

5.1 เปรียบเทียบและการหาความสัมพันธ์ของระดับ HbA_{1c} ในตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดดำที่เก็บโดยใช้สารกันเลือดแข็งชนิดต่าง ๆ

เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยเบาหวาน จำนวน 30 ราย แบ่งใส่หลอดเก็บตัวอย่างเลือดสำเร็จรูป EDTA, LH, และ NaF ตามสัดส่วนที่บริษัทผู้ผลิตได้กำหนดไว้ นำตัวอย่าง LH blood จำนวน 2 มล. มาเติมลงในหลอดทดลองที่มี glyceraldehydes ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล/ล. ในสัดส่วน 40 ไมโครลิตรต่อเลือด 960 ไมโครลิตร[5] นำตัวอย่างเลือดที่ได้ คือ EDTA blood, LH blood, LH+GA blood และ NaF blood ไปตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c} ด้วยหลักการ TI โดยเครื่อง Cobas c 111 ภายในเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากเจาะเก็บและนำตัวอย่างเลือดที่เหลือไปตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c} ด้วยหลักการ HPLC (BIO-RAD D10) ภายใน 8 ชั่วโมงหลังเจาะเก็บเลือด

5.2 การศึกษาความคงตัว (Stability) ของ HbA_{1c} ในตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดดำที่เก็บโดยใช้สารกันเลือดแข็งชนิดต่าง ๆ

เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยเบาหวาน 5 ราย (สุ่มเลือกมาจาก 30 ราย) และคนปกติ 5 ราย แบ่งใส่หลอดเก็บตัวอย่างเลือดสำเร็จรูป EDTA tube, LH tube และ NaF tube ตามสัดส่วนที่กำหนด และเตรียมเป็น LH+GA blood นำตัวอย่างเลือดแต่ละหลอด คือ EDTA blood, LH blood, LH+GA blood และ NaF blood แบ่งใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 350 ไมโครลิตร ในแต่ละตัวอย่างเลือด นำตัวอย่างเลือดที่แบ่งไว้ไปตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c} ด้วยหลักการ TI ในวันที่เจาะเก็บเลือด ชั่วโมงที่ 1, 4, 8 ที่อุณหภูมิห้องและวันที่ 0, 1, 3 , 5 หลังเจาะเก็บเลือด โดยเก็บที่อุณหภูมิตู้เย็น (2-8 °ซ)

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การเปรียบเทียบระดับ HbA_{1c} ที่ได้จากสารกันเลือดแข็งแต่ละชนิด ด้วยวิธี TI กับ HPLC และการศึกษาความคงตัว (Stability) ของ HbA_{1c} ที่ได้จากสารกันเลือดแข็งแต่ละชนิดต่างๆ ด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติ ได้แก่ ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (r), One-way ANOVA, Pair-t test และ Bland and Altman Analysis โดยใช้ระดับนัยสำคัญ = 0.05

การวิเคราะห์สถิติทั้งหมดใช้โปรแกรม SPSS version 11.5

ผลการศึกษา

ผลการควบคุมคุณภาพของการตรวจวิเคราะห์ HbA_{1c} ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Cobas c 111 และเครื่อง HPLC (BIO-Rad D10)

พบว่า ความแปรปรวนระหว่างวัน (between day variation) มีค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย (coefficient of variation, CV) ต่ำกว่า ร้อยละ 1.4 และ 3.0 ตามลำดับ ผลการควบคุมคุณภาพของการตรวจวิเคราะห์ HbA_{1c} (ตารางที่ 1)

ปริมาณ HbA_{1c} ที่ตรวจวัดด้วยหลักการ Turbidimetric inhibition immunoassay และ HPLC ณ เวลาที่ 0 ชั่วโมง

เมื่อนำค่าการตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c} ที่ตรวจวัดด้วยหลักการ TI กับ HPLC ในตัวอย่างเลือดชนิดต่างๆ จากผู้ป่วยเบาหวานมาหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และพิสัย พบว่าค่าที่ได้ใกล้เคียงกัน เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณ HbA_{1c} ในตัวอย่างเลือด EDTA blood, LH blood, LH+GA blood และ NaF blood (n=30) ที่ตรวจวัดด้วยหลักการ TI และ HPLC ณ เวลาที่ 0 ชั่วโมง พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) (ตารางที่ 2)

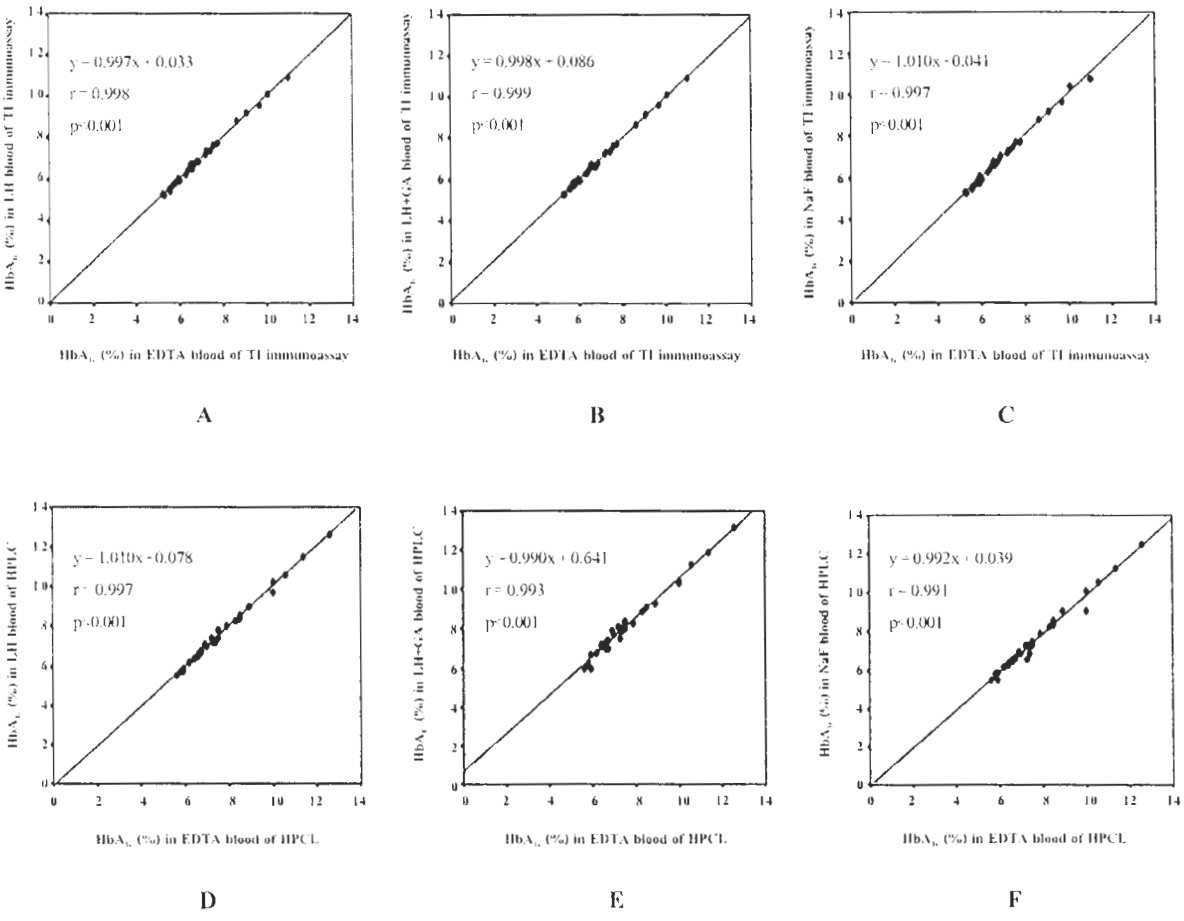
ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และเปรียบเทียบของปริมาณ HbA_{1c} ในตัวอย่างเลือด EDTA blood, LH blood, LH+GA blood และ NaF blood ที่ตรวจวัดด้วยหลักการ TI และ HPLC (n=30) ณ 0 ชั่วโมง

ตัวอย่างตรวจ	ค่าเฉลี่ย (ร้อยละ)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	p-value
TI					
EDTA blood	6.906	1.48	5.24	11.04	1.000
LH blood	6.919	1.47	5.21	10.95	
LH+GA blood	6.907	1.46	5.25	10.94	
NaF blood	6.933	1.50	5.25	10.80	
HPLC					
EDTA blood	7.700	1.73	5.60	12.60	0.429
LH blood	7.700	1.75	5.50	12.60	
LH+GA blood	8.267	1.72	6.00	13.21	
NaF blood	7.597	1.73	5.50	12.50	

EDTA = Ethylenediaminetetraacetic acid, TI = Turbidimetric inhibition immunoassay, HPLC = High Performance Liquid Chromatography, LH = Lithium heparin, LH+GA = Lithium heparin plus glyceraldehydes, NaF = Sodium fluoride

ความสัมพันธ์ของระดับ HbA_{1c} ในตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดดำที่เก็บโดยใช้สารกันเลือดแข็งชนิดต่าง ๆ

เมื่อทดสอบหาความสัมพันธ์ของปริมาณ HbA_{1c} ในตัวอย่าง LH blood กับ EDTA blood (A) ในตัวอย่าง LH+GA blood กับ EDTA blood (B) และในตัวอย่าง NaF blood กับ EDTA blood (C) ที่ตรวจวัดด้วยหลักการ TI พบว่ามีความสัมพันธ์กันดี โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.998, 0.999 และ 0.997 ตามลำดับ ความสัมพันธ์ของปริมาณ HbA_{1c} ในตัวอย่าง LH blood กับ EDTA blood (D), ในตัวอย่าง LH+GA blood กับ EDTA blood (E) และในตัวอย่าง NaF blood กับ EDTA blood (F) ที่ตรวจวัดด้วยหลักการ HPLC พบว่า มีความสัมพันธ์กันดี และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.997, 0.993 และ 0.991 ตามลำดับ (รูปที่ 1)



(A) ในตัวอย่าง LH blood กับ EDTA blood (B) ในตัวอย่าง LH+GA blood กับ EDTA blood และ (C) ในตัวอย่าง NaF blood กับ EDTA blood และตรวจวัดด้วยหลักการ HPLC (D) ในตัวอย่าง LH+GA blood กับ EDTA blood (E) ในตัวอย่าง LH blood กับ EDTA blood และ (F) ในตัวอย่าง NaF blood กับ EDTA blood

รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ HbA_{1c} (ร้อยละ) ที่ตรวจวัดด้วยหลักการ TI (n=30)

ความคงตัว (Stability) ของ HbA_{1c} ในตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดดำที่เก็บโดยใช้สารกันเลือดแข็งชนิดต่าง ๆ

เมื่อนำค่า HbA_{1c} ที่ตรวจวัดได้ด้วยหลักการ TI ในตัวอย่าง EDTA blood, LH blood, LH+GA blood และ NaF blood ในชั่วโมงที่ 1, 4, 8 หลังเจาะและเก็บตัวอย่างเลือดไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทั้งหมดจำนวน 10 ราย มาหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน พบว่า ค่าที่ได้ใกล้เคียงกันมาก และเมื่อทดสอบหาความแตกต่างของปริมาณ HbA_{1c} ในตัวอย่างตรวจดังกล่าว โดยใช้ ANOVA test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่า ปริมาณ HbA_{1c} ในสารกันเลือดแข็งชนิดเดียวกันที่ตรวจในชั่วโมงที่ 1, 4, 8 มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (ตารางที่ 3)

เมื่อนำค่าการตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c} ที่ตรวจวัดด้วยหลักการ TI ในตัวอย่าง EDTA blood, LH blood, LH+GA blood และ NaF blood ในวันที่ 0, 1, 3, 5 หลังเก็บตัวอย่างเลือดที่อุณหภูมิตู้เย็นทั้งหมดจำนวน 10 ราย มาหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน พบว่า ค่าที่ได้ใกล้เคียงกันมาก และเมื่อทดสอบหาความแตกต่างของปริมาณ HbA_{1c} ในตัวอย่างดังกล่าว โดยใช้ ANOVA test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าปริมาณ HbA_{1c} ในสารกันเลือดแข็งชนิดเดียวกันที่ตรวจในวันที่ 0, 1, 3, 5 มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (ตารางที่ 4)

วิจารณ์

จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า EDTA blood สามารถคงระดับ HbA_{1c} ได้นาน 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง[7] ซึ่งต่างจากผลการวิจัยครั้งนี้ซึ่งพบว่า EDTA blood, LH blood, LH+GA blood และ NaF blood สามารถคงสภาพ HbA_{1c} ได้นานถึงอย่างน้อย 8 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง โดยปริมาณไม่แตกต่างจากการตรวจทันทีหลังเจาะเก็บเลือด (0 ชั่วโมง) ซึ่งจะช่วยลดความกังวลของห้องปฏิบัติการและแพทย์จากปัญหาความล่าช้าจากการขนส่งตัวอย่างเลือดเพื่อวัดปริมาณ HbA_{1c} ที่ห้องปฏิบัติการอื่นๆ หรือในการออกหน่วยตรวจสุขภาพเคลื่อนที่[11] และในการศึกษานี้มีข้อจำกัดเรื่องเงินทุนสนับสนุนน้ำยาจึงได้ศึกษาความคงตัวของ HbA_{1c} ได้เพียง 5 วัน ซึ่งจากงานวิจัยอื่นๆ พบว่า HbA_{1c} สามารถคงตัวใน EDTA blood ได้นานอย่างน้อย 1 สัปดาห์[7]

ในตัวอย่างเลือด EDTA blood, LH blood, LH+GA blood และ NaF blood ที่ตรวจวัดด้วยหลักการ TI หลังเก็บที่อุณหภูมิห้อง พบว่าปริมาณ HbA_{1c} ใน

ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และเปรียบเทียบปริมาณ HbA_{1c} ในตัวอย่างเลือด EDTA blood, LH blood, LH+GA blood, และ NaF blood ที่ตรวจวัดด้วยหลักการ TI หลังเก็บที่อุณหภูมิห้องชั่วโมงที่ 1, 4, 8 (n=10)

ตัวอย่างตรวจ	ค่าเฉลี่ย HbA_{1c} (ร้อยละ) (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)			p-value
	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 4	ชั่วโมงที่ 8	
EDTA blood	6.143 (1.23)	6.181 (1.28)	6.018 (1.24)	0.955
LH blood	6.169 (1.27)	6.190 (1.29)	6.273 (1.32)	0.982
LH+GA blood	6.136 (1.24)	6.193 (1.29)	6.229 (1.33)	0.987
NaF blood	6.193 (1.26)	6.242 (1.29)	6.192 (1.18)	1.000

EDTA = Ethylenediaminetetraacetic acid, LH = Lithium heparin, LH+GA = Lithium heparin plus glyceraldehydes, NaF = Sodium fluoride

ตารางที่ 4 แสดงค่าเฉลี่ยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และเปรียบเทียบปริมาณ HbA_{1c} ในตัวอย่างเลือด EDTA blood, LH blood, LH+GA blood, และ NaF blood ที่ตรวจวัดด้วยหลักการ TI หลังเก็บที่อุณหภูมิตู้เย็นวันที่ 0, 1, 3, 5 (n=10)

ตัวอย่างตรวจ	ค่าเฉลี่ย HbA_{1c} (ร้อยละ) (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)				p-value
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	
EDTA blood	6.143 (1.23)	6.028 (1.21)	6.265 (1.29)	6.207 (1.25)	0.977
LH blood	6.169 (1.27)	6.063 (1.21)	6.245 (1.21)	6.233 (1.25)	0.987
LH+GA blood	6.136 (1.24)	6.091 (1.25)	6.301 (1.27)	6.244 (1.18)	0.980
NaF blood	6.193 (1.26)	6.111 (1.21)	6.353 (1.26)	6.319 (1.25)	0.970

EDTA = Ethylenediaminetetraacetic acid, LH = Lithium heparin, LH+GA = Lithium heparin plus glyceraldehydes, NaF = Sodium fluoride

ตัวอย่างเลือดที่ใช้สารกันเลือดแข็งแต่ละชนิด ณ ชั่วโมงที่ 1, 4 และ 8 มีการเพิ่มขึ้นและลดลง ไม่เป็นรูปแบบเดียวกันจาก ณ ชั่วโมงที่ 1 ในรูปแบบที่แตกต่างกัน แต่มีข้อสังเกตในการใช้ EDTA blood พบว่าในชั่วโมงที่ 8 มีตัวอย่างเลือดทุกหลอดมีปริมาณ HbA_{1c} ลดลงมากเมื่อเทียบกับปริมาณ ณ ชั่วโมงที่ 1 และ 4 ส่งผลทำให้ค่าเฉลี่ยลดลงด้วย เมื่อพิจารณาการตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c} ในตัวอย่างเลือด EDTA blood, LH blood, LH+GA blood, และ NaF blood ที่ตรวจวัดด้วยหลักการ TI หลังเก็บที่อุณหภูมิตู้เย็นวันที่ 0, 1, 3 และ 5 มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นและลดลงแบบเดียวกันทั้งหมด อาจเกิดได้จาก variation ของวิธีซึ่งมีค่าต่ำสอดคล้องกับค่า CV ที่ศึกษาไว้ในตารางที่ 1 แต่การเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

The College of American Pathologists[12] ได้สำรวจวิธีการตรวจวัด HbA_{1c} ในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าประมาณร้อยละ 95 ของผู้เข้าร่วมโครงการใช้วิธีตรวจวัดความเข้มข้นของ HbA_{1c} ที่มี CVs ไม่เกินร้อยละ 5 และมีความถูกต้องอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ เพื่อป้องกันความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นได้จาก hemoglobin variants เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Cobas c 111 และเครื่อง HPLC BIO-Rad D10 ที่ใช้ในการศึกษานี้มีค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย (CV) น้อยกว่าร้อยละ 5 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ จากการศึกษานี้ไม่ได้แสดงผลการควบคุมคุณภาพ External Quality Control (EQC) ของเครื่อง Cobas c 111 เนื่องจากเป็นเครื่องวิเคราะห์รุ่นใหม่ที่นำมาประเมินสมรรถนะ ณ หน่วยวิจัยทางเคมีคลินิกของภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และยังไม่ได้ทำ EQC แต่จากการประเมินสมรรถนะของเครื่องนี้พบว่ามี precision และ recovery อยู่ในเกณฑ์ดี สำหรับเครื่อง HPLC BIO-Rad D10 ของห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก ฝ่ายพยาธิวิทยา โรงพยาบาลพุทธชินราช ได้ทำ EQC กับ EQA Center ของบริษัท ไบโอราด (ประเทศไทย) ที่ความเข้มข้นของ HbA_{1c} จำนวน 2 ระดับ ได้แก่ ระดับสูงกว่าปกติและระดับปกติ ได้ค่า Bias index score อยู่ในช่วงน้อยกว่า -45 ถึง -63.6 ซึ่งอยู่ในเกรด A และ เกรด B ตามลำดับ

ปัจจุบันหลักการ TI[13] นิยมนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ HbA_{1c} ในห้องปฏิบัติการเคมีคลินิกเนื่องจากสะดวก ไม่ต้องทำให้เม็ดเลือดแดงแตกก่อนวัดด้วยวิธี manual เนื่องจากเครื่องวิเคราะห์สามารถทำได้โดยอัตโนมัติ และเครื่องวิเคราะห์ยังสามารถตรวจวิเคราะห์สารชีวเคมีชนิดอื่นๆ ได้อีกด้วย จากผลการศึกษาที่ได้ พบว่าปริมาณ HbA_{1c} ที่ตรวจวัดด้วยหลักการ TI (ตรวจภายใน

หลักการ HPLC สามารถใช้แทนกันได้ นอกจากนั้น สารกันเลือดแข็งทั้ง 4 ชนิด ดังกล่าว สามารถคงสภาพ HbA_{1c} ได้อย่างน้อย 8 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และอย่างน้อย 5 วัน ที่อุณหภูมิตู้เย็น (2-8 °ซ)

เอกสารอ้างอิง

1. ชิตี สนับบุญ, วราภณ วงศ์ภาวราวัฒน์. การดูแลรักษาเบาหวานแบบองค์รวม. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย; 2549.
2. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes 2009. Diabetes Care 2009;32(Suppl 1):S13-61.
3. Rohlfing C, Wiedmeyer HM, Little R, et al. Biological variation of glycohemoglobin. Clin Chem 2002;48:1116-8.
4. Krishnamurti U, Steffes MW. Glycohemoglobin: a primary predictor of the development or reversal of complications of diabetes mellitus. Clin Chem 2001; 47:1157-65.
5. International Expert Committee. International Expert Committee report on the role of the A_{1c} assay in the diagnosis of diabetes. Diabetes Care 2009;32: 1327-34.
6. Davidson JK. Clinical diabetes mellitus: a problem-oriented approach. JAMA 1992;267:1842-3.
7. พรทิพย์ โล่ห์เลขา. การตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกเพื่อการวินิจฉัย ติดตาม ควบคุม และรักษาโรคเบาหวาน. J Med Tech Assoc Thai 1990;18:99-104.
8. เพ็ญศิริ ชูส่งแสง, ปนัดดา มุสิกวัณณ, นุชรัตน์ วรรณพงศ์ และคณะ. การเปรียบเทียบผลการตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c} โดยใช้ EDTA blood กับ NaF blood. สงขลานครินทร์เวชสาร 2548;23:73-9.
9. Landt M. Glyceraldehyde preserves glucose concentrations in whole blood specimens. Clin Chem 2000;46:1144-9.
10. Lolekha PH, Boonlert W, Kost GJ, et al. Comparative study of values of calculated bicarbonate and measured total carbon dioxide content. J Near-Patient Test Technol 2003;2:135-43.
11. Boonlert W, Kost GJ, Jiraviriyakul A, et al. Point of care testing on a mobile medical unit in northern Thailand: screening for hyperglycemia, hyperlipidemia, and thalassemia trait. J Near-Patient Test Technol 2006;5:164-7.
12. Sack DB. The diagnosis of diabetes is changing: how implementation of hemoglobin A_{1c} will impact clinical laboratories. Clin Chem 2009;55;1612-4.
13. Nowatzke WL, Parvin CA, Scott MG, et al. Correction of positive bias of the Roche Tina-quant II hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) assay at low HbA_{1c} percentages. Clin Chem 2001;47:976-8.
14. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Fundamentals of clinical chemistry. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2001.
15. Landt M. Methods and compositions for preserving glucose level in blood specimens [homepage on the Internet] United States Patent 2003: US Patent # 6632844. [cite 2003 Oct 14]. Availabe from: http://www.patentstorm.us/patents/6632844/description.html.

เวลา 4 ชั่วโมง หลังจากเก็บสิ่งส่งตรวจ) มีระดับต่ำกว่าตรวจวัดด้วยหลักการ HPLC (ตรวจภายใน 8 ชั่วโมงหลังเก็บสิ่งส่งตรวจ) ประมาณร้อยละ 1.0 แม้จะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ผู้ใช้งานจะต้องเลือกใช้ช่วงอ้างอิงของแต่ละหลักการในการแปลผลปริมาณ HbA_{1c} ที่ได้

โซเดียมฟลูออไรด์ เป็นสารกันเลือดแข็งที่มีฤทธิ์อ่อน จึงมักผสมกับสารกันเลือดแข็งชนิดอื่นๆ จากการศึกษานี้ใช้หลอดเก็บเลือดสำเร็จรูปชนิดโซเดียมฟลูออไรด์ผสมกับไตรโพแทสเซียมอีดีทีเอ (K_3EDTA) g เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้สูงขึ้น แต่โซเดียมฟลูออไรด์เป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการด้านการสลายกลูโคส จากผลการศึกษาที่ได้ พบว่าปริมาณ HbA_{1c} ที่วัดได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง ซึ่งสอดคล้องกับกับงานวิจัยอื่นได้ศึกษาก่อนหน้า[8] ดังนั้นตัวอย่างเลือดที่เติมโซเดียม-ฟลูออไรด์ จึงใช้สำหรับตรวจวัดกลูโคสทางห้องปฏิบัติการสามารถนำมาวัดปริมาณ HbA_{1c} ได้ แต่ไม่สามารถนำไปตรวจวัดสารชีวเคมีอื่นๆ ได้ เนื่องจากฟลูออไรด์ไอออน (F) รบกวนหลักการวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกหลายหลักการ[14] โดยเฉพาะวิธีการที่อาศัยปฏิกิริยาจากเอนไซม์

กลีเซอราลดีไฮด์ มีฤทธิ์เป็นสารต้านการสลายกลูโคส เนื่องจากสามารถยับยั้งเอนไซม์ Hexokinase ในกระบวนการ glycolysis pathway[9,15] การนำกลีเซอราลดีไฮด์มาผสมกับลิเทียมเฮปารินเพื่อใช้เก็บเลือดสำหรับนำมาตรวจวัดความเข้มข้นของกลูโคสและสารชีวเคมีในพลาสมา พบว่าระดับกลูโคสคงอยู่ได้ในเมื่อเก็บเลือดไว้นานถึง 8 ชั่วโมง โดยไม่แตกต่างจากการใช้พลาสมาที่ปั่นแยกหลังเจาะเลือดทันที และยังสามารถใช้พลาสมาชนิดนี้ในการตรวจวัดสารชีวเคมีอื่นๆ ได้อีกด้วย[9,15] งานวิจัยนี้เป็นการนำเสนอผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ HbA_{1c} ที่ใช้ลิเทียมเฮปารินผสมกับกลีเซอราล-ดีไฮด์เป็นสารกันเลือดแข็ง ซึ่งพบว่าปริมาณ HbA_{1c} ที่ได้ไม่แตกต่างจากการใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง จึงเป็นทางเลือกใหม่อีกทางหนึ่งสำหรับห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ในการนำลิเทียมเฮปารินผสมกับกลีเซอราล-ดีไฮด์มาใช้เป็นสารกันเลือดแข็งสำหรับตรวจน้ำตาลและสารชีวเคมี รวมทั้งปริมาณ HbA_{1c} ได้ในคราวเดียวกัน

จากการศึกษานี้พบว่าตัวอย่างเลือดที่เก็บโดยใช้สารกันเลือดแข็ง ลิเธียมเฮปาริน ลิเธียมเฮปารินผสมกับกลีเซอราลดีไฮด์ และโซเดียมฟลูออไรด์ สามารถคงสภาพ HbA_{1c} ไว้ได้นานอย่างน้อย 8 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องและอย่างน้อย 5 วันที่อุณหภูมิตู้เย็น โดยให้ผลไม่แตกต่างกับ EDTA blood โดยการเก็บตัวอย่างเลือดที่ใช้สารกันเลือดแข็งทั้ง 4 ชนิดที่อุณหภูมิห้อง มีค่าไม่แตกต่างกันถึง 8 ชั่วโมง และในการเก็บตัวอย่างเลือดที่อุณหภูมิตู้เย็น พบว่าสามารถเก็บได้อย่างน้อย 5 วัน ซึ่งเป็นประโยชน์กับห้องปฏิบัติการขนาดเล็กที่จำเป็นต้องรอให้มีจำนวนรายที่จะวัดมากขึ้น หรือกรณีส่งตัวอย่างไปตรวจที่ห้องปฏิบัติการอื่น ซึ่งอาจจะเสียเวลาอย่างน้อย 2-3 วัน สามารถเก็บตัวอย่างเลือดไว้ในตู้เย็นได้นาน 3-5 วัน

ผลจากการศึกษานี้สามารถใช้เพื่อเสนอทางเลือกใหม่ในการเลือกใช้สารกันเลือดแข็งสำหรับตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c} ในกลุ่มผู้ป่วยเบาหวาน ทำให้ใช้เลือดจากผู้ป่วยน้อยลง อีกทั้งเป็นการประหยัดต้นทุนค่าใช้จ่ายในการซื้อหลอดเก็บเลือดอีกด้วย

ในกรณีที่ผู้เจาะเลือดลืมส่ง EDTA blood มาทำให้สามารถรายงานผลการตรวจวัดระดับ HbA_{1c} จากตัวอย่างเลือดที่เก็บโดยโซเดียมฟลูออไรด์ทดแทนได้เป็นต้น ในกรณีของหน่วยแพทย์เคลื่อนที่สามารถใช้ประโยชน์จากผลงานวิจัยนี้ ทำให้เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยเป็นจำนวนน้อยลง สามารถลดจำนวนหลอดเก็บตัวอย่างเลือด ลดปริมาณตัวอย่างเลือดที่ต้องเจาะเก็บจากผู้ป่วยได้ และช่วยลดความผิดพลาดจากการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดหลายๆ หลอดได้

สรุป

ปริมาณ HbA_{1c} ในตัวอย่างเลือดที่เก็บโดยใช้สารกันเลือดแข็งชนิด อีดีทีเอ ลิเทียมเฮปาริน ลิเทียมเฮปารินผสมกับกลีเซอราลดีไฮด์ หรือโซเดียมฟลูออไรด์ มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งที่ตรวจวัดด้วยหลักการ TI และ