นิพนธ์ต้นฉบับ

การเปรียบเทียบผลการตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c} โดยใช้ EDTA blood กับ NaF blood@

เพ็ญศิริ ชูส่งแสง[1]
ปนัดดา มุสิกวัณณ์[2]
นุชรัตน์ วรรณพงศ์[2]
อภิชาติ มูซอ[1]
พิพัฒน์ชัย อภิรักษ์ธัญกร[1]

Abstract:

Comparative study of HbA_{1c} measurement using EDTA blood vs. NaF blood

Chusongsang P, Musigawan P, Wannapong N, Musow A, Apirakthunyakorn P.

Chemistry Unit, Department of Pathology, Faculty of Medicine,

Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90110, Thailand

Songkla Med J 2005;23(2):73-79

HbA_{1c} is a glycated hemoglobin which was used to assess the glucose level of diabetes mellitus patients for the previous 1-2 month. The standard method for the measurement of HbA_{1c} requires EDTA blood. Almost all physicians requesting HbA_{1c} also include a blood glucose test in the same requisition test panels that requires a NaF blood sample. From these requisition test panels, an absence of either an EDTA blood or NaF blood sample to complete the requirement for the determination of both HbA_{1c} and blood glucose is common. Thus, the main aim of this research is to attempt to introduce the use of NaF blood in

---

@นำเสนอในงานประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 19 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วันที่ 13-15 สิงหาคม 2546
[1]วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) [2]วท.บ. (เทคนิคการแพทย์), วท.ม. (ชีวเคมี) หน่วยเคมีคลินิก ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110
รับต้นฉบับวันที่ 24 มิถุนายน 2547 รับลงตีพิมพ์วันที่ 21 กุมภาพันธ์ 2548

order to determine the amount of both HbA_{1c} and glucose. A comparison of the HbA_{1c} values obtained from using the EDTA blood and the NaF blood was established. A total of 212 patient blood samples was collected and both EDTA blood and NaF blood were analyzed by the Hitachi 717 automatic analyzer using the Turbid metric Inhibition Immunoassay method (Kit reagent from Roche Diagnostic, Thailand).

The results from this study, the mean value of HbA_{1c} obtained from EDTA blood and NaF blood samples were 8.293 ± 2.076 and 8.265 ± 2.086 respectively. There was no significant difference between the HbA_{1c} value obtained from EDTA blood and NaF blood ($p > 0.05$), mean difference 0.028 and regression equation $y = 0.999x-0.019$, $r = 0.994$. In conclusion, the value of HbA_{1c} measured from NaF blood samples was almost equal value with that of the EDTA blood sample. Therefore, at Songklanagarind Hospital, the NaF blood sample can be used to determine HbA_{1c} as well as EDTA blood.

Key words: *HbA_{1c}, diabetes mellitus, EDTA blood, NaF blood, immunoassay*

บทคัดย่อ:

HbA_{1c} หรือ Glycated hemoglobin ใช้ในการประเมินระดับ glucose ย้อนหลัง 1-2 เดือน สำหรับควบคุมและติดตามการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน ปัจจุบันการตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c} ของห้องปฏิบัติการเคมีคลินิกโดยทั่วไปจะใช้ EDTA blood และส่วนใหญ่แพทย์จะสั่งตรวจ HbA_{1c} ควบคู่กับ glucose ซึ่งใช้ NaF blood แต่ปัญหาที่พบบ่อยคือไม่ได้เจาะ EDTA blood ส่งมา คณะผู้วิจัยจึงได้ทดลองตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c} ใน NaF blood โดยเก็บตัวอย่างเลือดที่เป็น EDTA blood และ NaF blood จากผู้ป่วยรายเดียวกัน จำนวน 212 ราย นำมาวิเคราะห์ปริมาณ HbA_{1c} โดยวิธี Turbid metric Inhibition Immunoassay ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Hitachi 717 แล้วนำผลที่ได้ไปทดสอบความแตกต่างโดยใช้ paired t-test และทดสอบหาความสัมพันธ์โดยใช้ regression analysis ผลการศึกษาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ HbA_{1c} ที่ใช้ EDTA blood และ NaF blood มีค่าเท่ากับร้อยละ 8.293 ± 2.076 และ 8.265 ± 2.086 ตามลำดับ และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ค่าที่ได้จากทั้ง 2 วิธี มีความสัมพันธ์กันดี ($r = 0.994$) สมการถดถอยเชิงเส้นตรง $y = 0.999x-0.019$ ดังนั้นสรุปได้ว่าสามารถใช้ NaF blood มาตรวจวิเคราะห์ปริมาณ HbA_{1c} ได้

คำสำคัญ: *ฮีโมโกลบินเอวันซี, โรคเบาหวาน, เลือดที่มีสารกันเลือดแข็ง EDTA, เลือดที่ส่วนประกอบของสาร NaF, การตรวจวิเคราะห์โดยใช้หลักการอิมโมโนวิทยา*

บทนำ

โรคเบาหวานเป็นโรคหนึ่งที่สร้างปัญหาสำคัญทางการแพทย์ ปัจจุบันมีอัตราผู้ป่วยเบาหวานเพิ่มขึ้น[1, 2] โรคนี้เป็นผลมาจากการที่ร่างกายมีจำนวนอินสุลินไม่เพียงพอ[3] หรือมีอินสุลินที่หย่อนสมรรถภาพทำให้มีผลต่อระดับน้ำตาลในร่างกายผิดปกติ ปัจจัยที่ทำให้เสี่ยงต่อการเป็นเบาหวาน[3] ได้แก่ ผู้ที่มีประวัติเบาหวานในครอบครัว มีรูปร่างอ้วน มีกลูโคสในเลือดต่ำกว่าปกติ (hypoglycemia) ที่ไม่สามารถอธิบายสาเหตุได้ เป็นต้น โดยอันตรายที่เกิดขึ้นจากโรคเบาหวาน[3, 4] ได้แก่ hypoglycemic shock, diabetic ketoacidosis, hyperglycemic, hyperosmolar nonketotic coma เหล่านี้และยังเป็นผลให้เกิดภาวะแทรกซ้อน[1, 5] (secondary complication) ที่พบบ่อย ๆ คือ การมีหลอดเลือดแข็งตัวและตีบตันขึ้น ซึ่งเกิดได้ทั้งหลอดเลือดใหญ่และหลอดเลือดฝอยที่เรียกกันว่า diabetic macroangiopathy และ diabetic microangiopathy เช่น การมีเลือดออกในตาทำให้ตามัว หรือตาบอด หลอดเลือดในไตตีบตันทำให้ไตเสีย หลอดเลือดในสมอง หัวใจ และขาตีบตันได้ เป็นต้น การมีระดับกลูโคสสูงกว่าปกติในเลือด (hyperglycemia) เป็นเครื่องบ่งชี้โรคเบาหวาน[3] แต่อย่างไรก็ตามการตรวจระดับกลูโคสในเลือดอาจไม่เพียงพอ เนื่องจากไม่สามารถบ่งบอกภาวะการควบคุมโรคเบาหวานระหว่างวันหลาย ๆ วันหรือระหว่างสัปดาห์ได้ และระดับน้ำตาลในเลือดของแต่ละวันแปรเปลี่ยนไปตามปัจจัยต่าง ๆ มากมาย[6] เช่น ปริมาณและชนิดของอาหาร การออกกำลังกาย กิจวัตรประจำวัน ฮอร์โมน ยา ตลอดจนความรุนแรงของโรคเบาหวาน จึงมีผู้นำการตรวจ HbA_{1c} หรือ glycated hemoglobin มาใช้ประโยชน์เพื่อช่วยในการวินิจฉัย ติดตามผลการรักษา หรือประเมินผลการควบคุมระดับกลูโคสในผู้ป่วยเบาหวาน[3, 6]

ปกติฮีโมโกลบินของผู้ใหญ่ประกอบด้วย[7] HbA ร้อยละ 96, HbA_2 ร้อยละ 3 และ HbF ร้อยละ 1 จากการวิเคราะห์ HbA ประกอบด้วย[1, 4] HbA_{1a}, HbA_{1b} และ HbA_{1c} (ร้อยละ 80 ของ HbA) หรือองค์ประกอบทั้งหมดรวมเรียกว่า HbA หรือ fast hemoglobins หรือ glycosylated hemoglobin หรือ glycohemoglobin หรือ glycated hemoglobin ระดับของ HbA_{1c} ทุก fractions จะสูงในผู้ป่วยเบาหวาน[3] แต่ส่วนใหญ่จะเป็นชนิด HbA_{1c} ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาไร้เอนไซม์[3, 5] (nonenzymatic reaction) เรียกว่า glycation ระหว่าง glucose กับส่วน N-terminal valine amino acid ของแต่ละ β-chain ของ HbA ซึ่งมีความเสถียรมาก กระบวนการดังกล่าวจะเกิดขึ้นตราบเท่าที่เม็ดเลือดแดงยังคงมีอายุอยู่ (120 วัน)[4, 5] การเกิด HbA_{1c} จะมีมากน้อยขึ้นกับความเข้มข้นของ glucose ในเลือดกับเวลา ดังนั้นการวัดระดับของ HbA_{1c} ในเลือดของผู้ป่วยสามารถสะท้อนให้เห็นสถานภาพการควบคุมโรคเบาหวานของผู้ป่วยตลอดช่วงระยะเวลา 2-3 เดือนที่ผ่านมา[3] และนิยมใช้ระดับ HbA_{1c} ในการควบคุมโรคเบาหวานกรณีที่[3] 1) การตรวจกลูโคสในปัสสาวะให้ข้อมูลไม่เพียงพอ 2) ระดับพลาสมากลูโคสของผู้ป่วยในแต่ละวัน และระหว่างวันมีความแปรปรวนมาก 3) ผู้ป่วยแรกเริ่มเป็นโรคเบาหวานและต้องการคำแนะนำในการควบคุม 4) ต้องการยืนยันให้ผู้ป่วยเห็นว่าสามารถควบคุมตัวเองได้ดี โดยยืนยันระดับของ HbA_{1c} กับอาการทางคลินิกที่ปรากฏว่าดี 5) ผู้ป่วยละเลยการควบคุมและต้องการเตือนผู้ป่วยให้เคร่งครัดเรื่องการควบคุมมากขึ้น 6) ผู้ป่วยตั้งครรภ์และจำเป็นต้องมีการควบคุมโรคเบาหวานอย่างใกล้ชิด เป็นต้น ปัจจัยที่จะทำให้ค่าของ HbA_{1c} เปลี่ยนแปลงไปได้[4] คือในกรณีที่ผู้ป่วยเป็นโรคเบาหวานร่วมกับโรค hemolytic ที่เม็ดเลือดแดงมีอายุสั้นกว่าปกติหรือมีการทำลายเม็ดเลือดแดงมากกว่าปกติ เช่น ธาลัสซีเมีย ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดต่างๆ จะทำให้การวิเคราะห์ระดับ HbA_{1c} ผิดพลาดไป คนปกติจะมี HbA_{1c} ประมาณร้อยละ 4.8-6[8] ค่า HbA_{1c} ที่ระดับร้อยละ 6.5 HbA_{1c}-8.5 บ่งว่าผู้ป่วยควบคุมโรคเบาหวานได้ดี แต่ถ้าระดับสูงกว่าร้อยละ 12 แสดงว่าการควบคุมโรคเบาหวานของผู้ป่วยไม่ดี ระดับของ HbA_{1c} อาจสูงถึงร้อยละ 30 ได้ ถ้าไม่มีการควบคุมโรค[3]

จากความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีในปัจจุบันทำให้มีความพยายามที่จะสร้างเครื่องมือใหม่ๆ และวิธีการต่างๆ มาดัดแปลงให้เหมาะสมเพื่อให้ได้ผลรวดเร็วและเป็นที่น่าเชื่อถือ ในขณะเดียวกันห้องปฏิบัติการก็จะนำเอาเครื่องมือใหม่ๆ เข้ามาใช้ ทำให้การทดสอบมีวิธีการและเครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบมากมายต่างๆ กันไป ขึ้นอยู่กับข้อจำกัดต่างๆ[9] ในแต่ละห้องปฏิบัติการ เช่น งบประมาณ ค่าใช้จ่าย เครื่องมือ ปริมาณการส่งตรวจ การต้องการความรวดเร็วของผลการตรวจวิเคราะห์ เป็นต้น คณะผู้วิจัยได้รวบรวมวิธีวิเคราะห์ปริมาณ HbA_{1c} ดังนี้ 1) High Performance Liquid Chromatography[10-13] เป็นวิธีมาตรฐานและเป็นที่นิยม วิธีนี้ใช้ตัวอย่างขนาดน้อยมาก ระดับไมโครลิตรเท่านั้น และจะแยก HbA_{1a}, HbA_{1b} ออกจาก HbA_{1c} หรืออาจดัดแปลงให้วัดทั้งสามชนิดเลยก็ได้ แต่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษราคาแพง เป็นการวัด total HbA_1 หรือ HbA_{1c} การใช้วิธีนี้ HbF อาจรบกวนทำให้ HbA_{1c} ได้ค่าสูงกว่าปกติ[3, 14] ขณะที่ HbC, HbS และ HbE อาจรบกวนทำให้ HbA_{1c} ได้ค่าต่ำกว่าปกติ[3, 4] 2) Immunoassay[7, 11, 15] เป็นวิธีที่ไวและใช้ตัวอย่างจำนวนน้อย และค่อนข้างจำเพาะต่อ HbA_{1c} เป็นที่นิยม เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวกและรวดเร็ว 3) Isoelectric Focussing[3, 12] ข้อดีคือสามารถแยก HbF ออกจาก HbA_{1c}ได้ ส่วน HbA_{1a} และ HbA_{1b} วัดไม่ได้ วิธีนี้ใช้ตัวอย่างจำนวนน้อย แต่ต้องใช้อุปกรณ์พิเศษในการแยก 4) Colorimetric[3] โดยทำ partial acid hydrolysis glycosylated hemoglobin ซึ่งจะทำให้เกิด 5-hydroxymethy furfural ที่ทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid (TBA) ทำให้เกิดสี 5) Electrophoresis[3, 12] เป็นวิธีแยกและหาระดับ glycosylated hemoglobin เหมาะสำหรับงานวิจัยมากกว่างานประจำวัน เพราะเสียเวลาและช้า 6) Enzymatic assay[10, 16] เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และไม่แพง เป็นต้น สำหรับหน่วยเคมีคลินิกของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์เลือกใช้วิธี Turbidimetric Inhibition Immunoassay ซึ่งใช้หลักการทางอิมโมโนวิทยา ซึ่งมีความจำเพาะสูง เป็นวิธีที่สะดวก ง่ายและรวดเร็ว ใช้เลือดน้อย ด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ Hitachi 717 ซึ่งใช้ในงานประจำอยู่แล้ว อีกทั้งยังสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณ HbA_{1c} ร่วมกับการตรวจวิเคราะห์งานประจำหรือการทดสอบพิเศษอื่นๆ ด้วย

โดยทั่วไปการตรวจปริมาณ HbA_{1c} ใช้เลือดที่มีส่วนผสมของ ethylenediaminetetraacetic acid หรือ EDTA blood และส่วนใหญ่แพทย์จะสั่งตรวจควบคู่กับระดับกลูโคสในเลือด ซึ่งห้องปฏิบัติการเคมีคลินิกของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ใช้เลือดที่มีส่วนผสมของ sodium fluoride หรือ NaF blood ซึ่งเป็นสูตรเฉพาะที่เตรียมขึ้นใช้เองเฉพาะภายในโรงพยาบาลเท่านั้น โดยมีส่วนผสมของ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งร่วมด้วย แต่ปัญหาที่พบบ่อยของการตรวจวิเคราะห์ HbA_{1c} คือไม่ได้ส่ง EDTA blood สาเหตุอาจเป็นเพราะผู้ที่ทำการเจาะเลือดลืมเจาะ ไม่เห็นว่าแพทย์สั่งตรวจ HbA_{1c} เป็นต้น และจากผลการศึกษาในต่างประเทศ ปี พ.ศ. 2526 Sinclair FM และ MacDonald DJ[17] ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณ HbA_{1c} ระหว่างสิ่งส่งตรวจ EDTA blood และ NaF/oxalate ด้วยวิธี electrophoresis พบว่ามีความสัมพันธ์กันดี ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณ HbA_{1c} ระหว่าง EDTA blood กับ NaF/EDTA blood ด้วยวิธี

Turbid metric inhibition immunoassay เพื่อที่สามารถใช้ NaF blood ตรวจวัดปริมาณ glucose และ HbA_{1c} ได้

วัสดุและวิธีการ

คณะผู้วิจัยจัดเก็บตัวอย่าง EDTA blood ที่แพทย์สั่งตรวจ HbA_{1c} และ NaF blood สำหรับตรวจหาระดับน้ำตาลในเลือดจากผู้ป่วยรายเดียวกันจำนวน 212 ราย มาตรวจหาปริมาณ HbA_{1c} ซึ่งจะทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ HbA_{1c} สัปดาห์ละครั้ง โดยจัดเก็บสิ่งส่งตรวจทั้ง EDTA blood และ NaF blood ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งทำการตรวจด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Hitachi 717 วิธี Turbidimetric Inhibition Immunoassay ใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท โรช ไดแอกโนสติกส์ ประเทศไทยจำกัด แบ่งเป็น

1. Hemolyzing reagent: Hemolysate derived from human blood and ovine blood; TTAB* ใช้เตรียมตัวอย่างก่อนวิเคราะห์หาค่า HbA_{1c} และ Hemoglobin

2. ชุดตรวจ HbA_{1c}

- Reagent 1 ประกอบด้วย MES** buffer: 0.025 mol/l; Tris*** buffer: 0.015 mol/l, pH 6.2; HbA_{1c} antibody (ovine serum) ≥ 0.5 mg/ml; stabilizers

- Reagent 2 ประกอบด้วย MES** buffer: 0.025 mol/l; Tris*** buffer: 0.015 mol/l, pH 6.2; HbA_{1c} polyhapten ≥ 8 g/ml; stabilizers

3. ชุดตรวจ Hemoglobin

- Reagent 1 ประกอบด้วย Phosphate buffer : 0.02 mol/l, pH 7.4; stabilizers

TTAB* = Tetradecyltrimethylammonium bromide

MES** = 2 - morpholinoethane sulfuric acid

Tris*** = tris (hydroxymethyl) - aminomethane

4. ชุด calibrator และชุดควบคุมคุณภาพ Pricinorm HbA_{1c} หรือ Precipath HbA_{1c} ของบริษัท โรช ไดแอกโนสติกส์

หลักการการตรวจวัด[18] HbA_{1c} คือ HbA_{1c} จะทำปฏิกิริยากับ anti-HbA_{1c} antibody อยู่ในรูป antigen-antibody complex ส่วนที่เหลือของ anti-HbA_{1c} antibody จะทำปฏิกริยากับ polyhapten อยู่ในรูปของ antibody-polyhapten complex ซึ่งไม่ละลาย วัดความขุ่นของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเทียบเป็นความเข้มข้น HbA_{1c} (g/dL) สำหรับการตรวจวัดปริมาณ hemoglobin จากความเข้มของสีที่เกิดขึ้น โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบเป็นปริมาณ total hemoglobin (g/dL)

รายละเอียดของพารามิเตอร์โปรแกรมการตรวจวิเคราะห์ค่าปริมาณ HbA_{1c} ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Hitachi 717 ตั้งตามที่ระบุไว้ในเอกสารที่แนบมากับชุดน้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท เช่นเดียวกับโปรแกรมคำนวณหาร้อยละของ HbA_{1c}

ก่อนทำการตรวจวิเคราะห์หาค่าปริมาณ HbA_{1c} ในสิ่งส่งตรวจทั้ง EDTA blood และ NaF blood ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบคุณภาพของเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Hitachi 717 โดยใช้ Pricinorm HbA_{1c} หรือ Precipath HbA_{1c} หลังจากนั้นจึงนำเลือดจาก EDTA blood และ NaF blood อย่างละ 10 µl มา hemolyzed ด้วย TTAB* 1 ml แล้วนำมาตรวจหาปริมาณ HbA_{1c}

สำหรับวิธีการศึกษาโดยนำค่า HbA_{1c} ทั้งจาก EDTA blood และ NaF blood จำนวน 212 ราย มาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทดสอบหาความสัมพันธ์โดยใช้ regression analysis และทดสอบหาความแตกต่างโดยใช้ paired t-test ของโปรแกรมทางสถิติ SPSS

ผลการศึกษา

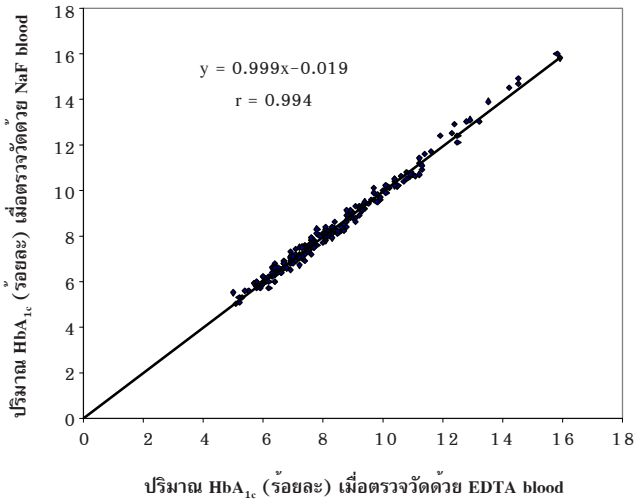
เมื่อนำค่า HbA_{1c} จาก EDTA blood และ NaF blood ทั้งหมดจำนวน 212 ราย มาหาค่าเฉลี่ยพบว่าค่าที่ได้ใกล้เคียงกันมาก ดังนี้ ค่า HbA_{1c} จาก EDTA blood ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละ 8.293 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 2.076 พิสัย (5.06-15.95) และค่า HbA_{1c} จาก NaF blood ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละ 8.265 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 2.086 และพิสัย (4.98-15.86) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตารางแสดงค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าต่ำสุดและสูงสุดของปริมาณ HbA_{1c}

สิ่งส่งตรวจ	ค่าเฉลี่ย (ร้อยละ)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ค่าต่ำสุด (ร้อยละ)	ค่าสูงสุด (ร้อยละ)
EDTA blood	8.293	2.076	5.06	15.95
NaF blood	8.265	2.086	4.98	15.86

ทดสอบหาความสัมพันธ์ปริมาณ HbA_{1c} ของ EDTA blood และ NaF blood พบว่ามีความสัมพันธ์กันดี โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.994 สมการถดถอยเชิงเส้นตรง $y = 0.999x - 0.019$ และค่า mean difference เท่ากับ 0.028 ดังแสดงในรูปที่ 1 และเมื่อนำมาทดสอบหาความแตกต่างโดยใช้

paired t-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าค่า HbA_{1c} ที่ได้จาก EDTA blood และ NaF blood ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p = 0.064$ $(p > 0.05)$



รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ HbA_{1c} (ร้อยละ) เมื่อตรวจวัดด้วย EDTA blood และ NaF blood

วิจารณ์

เนื่องจาก metabolism ของกลูโคส[19, 20] คือ glycolysis จะต้องได้รับการหยุดยั้งทันที เมื่อมีการเจาะเลือดออกจากร่างกาย จึงใช้ NaF ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ enolase ในขบวนการ glycolysis แต่ NaF เป็นสารกันเลือดแข็ง (anticoagulant) ที่ไม่ดี โดยทั่วไปจึงต้องใส่สารกันเลือดแข็งอย่างอื่นร่วมด้วย และคณะผู้วิจัยได้รวบรวมสารกันเลือดแข็งที่นิยมใช้มีดังนี้[21] 1) Heparin ใช้กันแพร่หลาย เป็นสารกันเลือดแข็งที่รักษาสภาพของเม็ดเลือดแดงได้ดี แต่ราคาค่อนข้างแพง โดยทำหน้าที่กันเลือดแข็งโดยยับยั้งไม่ให้เกิด thrombin heparin ที่ใช้กันทั่วๆ ไปเป็นเกลือของโซเดียม โปแตสเซียม ลิเธียม และแอมโมเนียม 2) Ethlylenediaminetetraacetic acid (EDTA) โดย EDTA ทำหน้าที่กันการแข็งตัวของเลือดโดยดึงแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) ออก EDTA ที่มีใช้เป็นเกลือของ disodium, dipotassium และ tripotassium แต่ dipotassium และ tripotassium ละลายง่าย นิยมใช้ในงานการตรวจวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาเพราะรักษาสภาพเม็ดเลือดได้ดี 3) Sodium Fluoride เป็นสารกันเลือดแข็งที่ไม่ดี จึงใช้ร่วมกับสารกันเลือดแข็งชนิดอื่นๆ มักใช้ในการตรวจวิเคราะห์น้ำตาลในเลือดเนื่องจากจะช่วยยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในขบวนการ glycolysis 4) Citrate เป็นสารกันการแข็งตัวของเลือดโดยเปลี่ยน Ca^{2+} ให้เป็นแคลเซียมอิออนที่ไม่แตกตัวเป็นอิออน นิยมใช้เพื่อตรวจสารต่างๆ ที่เกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด 5) Oxalate มีหลายชนิด เช่น sodium, potassium, ammonium และ litium oxalate ทำหน้าที่โดยเป็นสารกันเลือดแข็งโดยรวมกับ Ca^{2+} กลายเป็นตะกอนแคลเซียมอ๊อกซาเลทที่ไม่ละลาย นิยมใช้โปแตสเซียมอ๊อกซาเลท แต่ถ้าใช้ oxalate มีความเข้มข้นมากเกินไปจะทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้

ปัจจุบันมีหลอดเลือดสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมของ NaF สำหรับการทดสอบกลูโคสในเลือด แต่สำหรับห้องปฏิบัติการเคมีคลินิกได้เตรียมหลอด NaF ไว้ใช้เองเฉพาะภายในโรงพยาบาลเท่านั้น ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดต้นทุนค่าใช้จ่ายสำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส โดยใช้ส่วนผสมของ NaF 2 มิลลิกรัม และ EDTA 1.5 มิลลิกรัมต่อเลือด 1 มิลลิลิตร และสำหรับขวด EDTA เตรียมโดยหน่วยโลหิตวิทยา ซึ่งใช้ตรวจ CBC, Platelet count, ESR และ HbA_{1c} ด้วย มีส่วนประกอบของ EDTA 2 มิลลิกรัมต่อเลือด 1 มิลลิลิตร จะเห็นว่าทั้งใน EDTA blood และ NaF blood ต่างก็มีส่วนประกอบของ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งเช่นกัน แต่แตกต่างกันในปริมาณที่เล็กน้อย จากผลการศึกษาเปรียบเทียบที่ได้พบว่าปริมาณ HbA_{1c} จาก EDTA blood และ NaF blood มีค่าใกล้เคียงกัน มีค่าความแตกต่างกันเพียง 0.028 และมีความสัมพันธ์กันเป็นอย่างดี ($r = 0.994$) สมการถดถอยเชิงเส้นตรง $y = 0.999X-0.019$ ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาในต่างประเทศของ Sinclair และ MacDonald[17] ซึ่งทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของปริมาณ HbA_{1c} ระหว่างสิ่งส่งตรวจ EDTA blood และ NaF/Oxalate ด้วยวิธี Electrophoresis พบว่ามีความแตกต่างกันเพียง 0.07 มีความสัมพันธ์กันดี ($r = 0.98$) สมการถดถอยเชิงเส้นตรง $y = 0.97x+0.59$ อาจเป็นเพราะปฏิกิริยาการเกิด HbA_{1c} จากที่กล่าวข้างต้นเป็นปฏิกิริยาไร้เอนไซม์ที่เกิดขึ้นอย่างช้าๆ จึงมีความเสถียรมาก[22] อีกทั้งการตรวจวิเคราะห์ HbA_{1c} ด้วยวิธี Turbid metric inhibition immunoassay ใช้หลักการทางอิมโมโนวิทยาซึ่งมีความไว และมีความจำเพาะสูง ทำให้ค่า HbA_{1c} ที่ได้จากทั้งสองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สรุป

จากผลการศึกษาพบว่าหลอดเลือด NaF ของห้องปฏิบัติการเคมีคลินิกที่เตรียมขึ้นเองไว้ใช้เฉพาะภายในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ สำหรับตรวจหาระดับน้ำตาล

ในเลือด สามารถนำมาทดสอบหาค่าปริมาณ HbA_{1c} ได้ ซึ่งจะช่วยลดขั้นตอนการเจาะเลือด ใช้เลือดผู้ป่วยในปริมาณน้อยลงเพียง 2 มิลลิลิตรเท่านั้น และลดปัญหาจากการไม่ได้เจาะเลือดใส่ขวด EDTA สำหรับการทดสอบ HbA_{1c} อีกทั้งเป็นการประหยัดต้นทุนค่าใช้จ่ายอีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ อาจารย์ประสิทธิ์ เรืองไรรัตนโรจน์ หัวหน้าหน่วยเคมีคลินิก และเจ้าหน้าที่หน่วยเคมีคลินิก ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ทุกๆ ท่านที่ให้คำปรึกษาในการทำวิจัยและช่วยให้การศึกษาวิจัยลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Krishnamurti U, Steffes MW. Glycohemoglobin: a primary predictor of the development or reversal of complications of diabetes mellitus. Clin Chem 2001;47: 1157-65.
2. Nowatzke WL, Parvin CA, Scott MG, Hock K, Cole TG. Correction of positive bias of the Roche Tina-quant II hemoglobin A1c (HbA_{1c}) assay at low HbA_{1c} percentages. Clin Chem 2001;47:976-8.
3. พรทิพย์ โล่ห์เลขา. การตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกเพื่อการวินิจฉัย ติดตาม ควบคุม และรักษาโรคเบาหวาน. J Med Tech Assoc Thai 1990;18:99-104.
4. Fischbach F. A manual of laboratory & diagnostic tests. 5th ed. Philadelphia: Lippincott; 1996:335-7.
5. Kilpatrick ES. Glycated haemoglobin in the year 2000. J Clin Pathol 2000;53:335-9.
6. สุดารัตน์ มโนเชี่ยวพินิจ, สุรัชนี จูฑะพุทธิ. Frutosamine ในซีรั่มผู้ป่วยเบาหวาน. Bull Fac Med Tech Mahidol Univ 1974;11:103-12.
7. Watanabe T, Kato K, Yamada D, Midorikawa S, Sato W, Shiga M, et al. A nondiabetic case of hemoglobin variant (Hb Niigata) with inappropriately high and low HbA_{1c} titers detected by different methods. Clin Chem 1998;44:1562-4.
8. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, Mc Donald JM, Parrott M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. Chin Chem 2002;48:436-72.
9. Halwachs-Baumann G, Katzensteiner S, Schnedl W, Purstner P, Pieber T, Wilders-Truschnig M. Comparative evaluation of three assay systems for automated determination of hemoglobin A1c. Clin Chem 1997; 43:511-7.
10. Sakurabayashi I, Watano T, Yonehara S, Ishimaru K, Hirai K, Komori T, et al. New enzymatic assay for glycohemoglobin. Clin Chem 2003;49:269-74.
11. Roberts WL, Frank EL, Moulton L, Papadea C, Noffsinger JK, Ching-Nan Ou. Effects of nine hemoglobin variants on five glycohemoglobin methods. Clin Chem 2000; 46:560-76.
12. Chen D, Crimmins DL, Hsu FF, Lindberg FP, Scott MG. Hemoglobin raleigh as the cause of a falsely increased hemoglobin A1c in an automated ion-exchange HPLC method. Clin Chem 1998;44:1296-301.
13. Mosca A, Paleari R, MadèA, Ferrero C, Locatelli M, Ceriotti F. Commutability of control materials in glycohemoglobin determinations. Clin Chem 1998;44:632-8.
14. Roberts WL, De BK, Brown D, Hanbury MC, Hoyer JD, Garry JW, et al. Effects of hemoglobin C and S traits on eight glycohemoglobin methods. Clin Chem 2002;48:383-5.
15. Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FA, Slik van der W. Influence of hemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determinations, as investigated by 102 laboratories using 16 methods. Clin Chem 1993;39: 1717-23.
16. John WG, Gray MR, Bates DL, Beacham JL. Enzyme immunoassay--a new technique for estimating hemoglobin A1c. Clin Chem 1993;39:663-6.
17. Sinclair FM, MacDonald DJ. Correlation between glycosylated hemoglobin in specimens containing potassium EDTA and fluoride/oxalate. Clin Chem 1983;29:1319.

18. Occupation safely and health standards: bloodborne pathogens. (29 CFR 1910.1030). Federal register 1998;6:267-80.
19. Landit M. Glyceraldehyde preserves glucose concentrations in whole blood specimens. Clin chem 2000;46: 1144-9.
20. Lin YL, Smith CH, Dietzler PN. Stabilizaton of blood glucose by cooling with ice: an effective procedure for preservation of samples from adults and newborns. Clin chem 1976;22:2031-3.
21. Buetis CA, Ashwood ER, editors. Tietz textbook of clinical chemistry. 3rd ed. Philadephia: W.B. Saunders company; 1999:47-8.
22. Peterson KP, Pavlovich JG, Goldstein D, Little R, England J, Peterson CM. What is hemoglobin A1c? An analysis of glycated hemoglobins by electrospray ionization mass spectrometry. Clin Chem 1998;44:1951-8.