Comparative Study of HbA1c Levels in EDTA Blood Versus Lithium-heparinized Blood Determined by Boronate Affinity Chromatography Method

Phatchareeya Pongruea[1] and Yaovalak Teerajetgul[2*]

[1]*Master Degree student, Clinical Pathology and Management Program, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen Provinec, Thailand*
[2]*Department of Clinical Chemistry, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen Provinec, Thailand*

Abstract

Diabetes is a major health problem worldwide including Thailand. In some cases, additional HbA1c testing was ordered that required blood collection again affecting satisfactions of patient. Therefore, this study aimed to compare the level of HbA1c in EDTA blood and lithium-heparinized blood measured by boronate affinity chromatography method using the BioHermes A1cChek Pro analyzer. Ninety left-over lithium-heparinized blood samples which had been taken simultaneously with routine EDTA blood for HbA1c determination of the same patients with HbA1c level of 4-14% were used. Comparative analysis of HbA1c level showed no difference between HbA1c level for EDTA blood and lithium-heparinized blood (p = 0.539, Mann-Whitney U test; mean ± SD of 7.23 ± 1.95 and 7.35 ± 1.92, respectively). For the Bland Altman analysis using an allowable error limit of ± 10%, it was found that differences of all 90 samples were within the acceptable range. The results of linear regression analysis showed that HbA1c levels in both blood samples were significantly correlated (R^2 = 0.962, p < 0.001; Y = 0.365 + 0.966X). In conclusion, lithium-heparinized blood sample can be used instead of EDTA blood for HbA1c assay with BioHermes A1cCheck Pro analyzer.

Keywords: Ethylenediamine tetraacetic acid, HbA1c, Lithium heparin, Boronate affinity chromatography

***Corresponding author E-mail address:** yaotee@kku.ac.th

Received: 27 October 2021 Revised: 14 December 2021 Accepted: 23 December 2021

8-64-25.indd 7963 21/3/2565 BE 13:40

การศึกษาเปรียบเทียบระดับ HbA1c ในเลือดที่ใช้ EDTA และ Lithium-heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง ตรวจวัดโดยวิธี Boronate Affinity Chromatography

พัชรียา ป้องเรือ[1] และ เยาวลักษณ์ ธีระเจตกูล[2*]

[1]นักศึกษาปริญญาโท สาขาพยาธิวิทยาคลินิกและการจัดการ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
[2]กลุ่มวิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

โรคเบาหวานเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย แนวปฏิบัติในการตรวจติดตามผู้ป่วยเบาหวานของโรงพยาบาลโคกสูง จังหวัดสระแก้ว คือ ตรวจวัดระดับ HbA1c ร่วมกับการตรวจสารชีวเคมีชนิดอื่น ๆ ทุก 3-6 เดือน ผู้ป่วยแต่ละรายจึงถูกเจาะเก็บเลือดใส่หลอดที่มีสารกันเลือดแข็งสองชนิด คือเอทิลีนไดเอมีนเตตราอะซิติกแอซิด (อีดีทีเอ) สำหรับการตรวจวัด HbA1c และลิเธียมเฮปารินสำหรับการตรวจวัดสารอื่น ๆ ทำให้พบปัญหาในคนไข้บางรายที่เจาะเลือดได้น้อยไม่เพียงพอต่อการแบ่งใส่หลอดเลือดทั้ง 2 หลอด และในกรณีที่แพทย์สั่งตรวจ HbA1c เพิ่มเติมหลังการเจาะเลือดชนิดลิเธียมเฮปารินแล้ว ทำให้ต้องเจาะเลือดผู้ป่วยซ้ำ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาเพื่อเปรียบเทียบระดับ HbA1c ในเลือด อีดีทีเอและเลือดลิเธียมเฮปาริน ที่ตรวจวัดด้วยวิธีโบโรเนตแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี โดยใช้เครื่อง BioHermes A1cChek Pro ใช้ตัวอย่างเลือดลิเธียมเฮปาริน ที่เหลือจากการทดสอบประจำวันของผู้ป่วยรายเดียวกันที่เจาะเลือดอีดีทีเอ เพื่อส่งตรวจ HbA1c จำนวน 90 ราย ที่มีค่า HbA1c อยู่ในช่วงร้อยละ 4-14 เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบระดับ HbA1c จากตัวอย่างเลือดทั้ง 2 ชนิด พบว่าระดับ HbA1c ในเลือดชนิดอีดีทีเอและชนิดลิเธียมเฮปารินมีค่าไม่แตกต่างกัน (p = 0.539, Mann-Whitney U test) ค่า mean ± SD เท่ากับ 7.23 ± 1.95 และ 7.35 ± 1.92 ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ Bland Altman analysis พบว่า ตัวอย่างทั้งหมดมีค่า HbA1c แตกต่างกันอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (± ร้อยละ 10) ผลการวิเคราะห์ linear regression พบว่า ระดับ HbA1c ในตัวอย่างเลือดทั้ง 2 ชนิด มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (R^2 = 0.962, p < 0.001; Y = 0.365 + 0.966X) สรุปได้ว่า สามารถใช้ตัวอย่างเลือดชนิดลิเธียมเฮปารินแทนเลือดชนิดอีดีทีเอ ในการตรวจวัดระดับ HbA1c ด้วยเครื่อง BioHermes A1cCheck Pro ได้ โดยต้องตรวจวิเคราะห์ภายใน 2 ชั่วโมงหลังจากเจาะเลือด

คำสำคัญ: ลิเธียมเฮปาริน อีดีทีเอ ฮีโมโกลบินเอวันซี

***ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address:** yaotee@kku.ac.th
รับบทความ: 27 ตุลาคม 2564 แก้ไขบทความ: 14 ธันวาคม 2564 รับตีพิมพ์บทความ: 23 ธันวาคม 2564

8-64-25.indd 7964 21/3/2565 BE 13:40

บทนำ

โรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่ก่อให้เกิดปัญหาสุขภาพของผู้ป่วยในหลาย ๆ ด้าน โดยเกิดจากความผิดปกติของระบบเมแทบอลิซึม หรือความผิดปกติของตับอ่อนในการสร้างฮอร์โมนอินซูลินซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ทำให้เกิดภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูง ซึ่งเมื่อเกิดขึ้นเป็นระยะเวลานานจะเกิดพยาธิสภาพต่ออวัยวะอื่น ๆ เช่น หัวใจ ตา ไต รวมถึงระบบประสาท และอาจทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนต่าง ๆ ตามมา ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญของโรคเบาหวาน[1-4] International Diabetes Federation (IDF) ได้รายงานยอดผู้ป่วยเบาหวานทั่วโลกที่มีอายุตั้งแต่ 20-79 ปี ในปี พ.ศ. 2562 พบมากกว่า 463 ล้านราย ซึ่งคาดว่าจะมีผู้ป่วยเบาหวาน 578 ล้านรายในปี พ.ศ. 2573 และ 700 ล้านรายในปี พ.ศ. 2588[1]

สำนักโรคไม่ติดต่อ กรมควบคุมโรค ประเทศไทย ได้รายงานสถิติผู้ป่วยเบาหวานพบว่า ในปี พ.ศ. 2562 ประเทศไทยมีผู้ป่วยโรคเบาหวานทั้งหมด 1,002,310 ราย เพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2561 รวม 61,084 ราย โดยที่จังหวัดสระแก้วพบผู้ป่วยโรคเบาหวาน 6,631 ราย เพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2561 ทั้งหมด 435 ราย และพบผู้เสียชีวิตจากโรคเบาหวานในปี พ.ศ. 2562 จำนวน 55 ราย คิดเป็นอัตรา 9.79 ต่อประชากรหนึ่งแสนราย ซึ่งคาดว่าจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง[5]

สมาคมโรคเบาหวานแห่งประเทศไทยได้กำหนดเป้าหมายของการรักษาโรคเบาหวานคือ รักษาและควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด เพื่อป้องกันการเกิดโรคหรือภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวาน และให้ผู้ป่วยโรคเบาหวานมีคุณภาพชีวิตใกล้เคียงกับคนปกติมากที่สุด โดยกำหนดแนวทางการตรวจติดตามผู้ป่วยเบาหวานที่แตกต่างกันตามระดับการควบคุมเบาหวานของผู้ป่วย โดยใช้ระดับฮีโมโกลบินเอวันซี (hemoglobin A1c: HbA1c) เป็นเกณฑ์ คือ ควบคุมเข้มงวดมาก (HbA1c < ร้อยละ 6.5) ควบคุมเข้มงวด (HbA1c = ร้อยละ 6.5-6.9) และควบคุมไม่เข้มงวด (HbA1c = ร้อยละ 7.0-8.0)[6] ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ระดับ HbA1c ทางห้องปฏิบัติการจึงมีความสำคัญมากในการบ่งชี้ว่าผู้ป่วยมีการควบคุมเบาหวานแบบใด

ปัจจุบันวิธีการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเพื่อหาระดับ HbA1c มีหลายวิธี แต่ละวิธีมีข้อจำกัดที่แตกต่างกัน โดยวิธีที่ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่มักเลือกใช้มีดังนี้ high pressure liquid chromatography (HPLC), boronate affinity chromatography, latex enhanced immunoassay method และ enzymatic HbA1c assay method[3, 7, 8]

โรงพยาบาลโคกสูง อำเภอโคกสูง จังหวัดสระแก้ว มีแนวทางการตรวจติดตามผู้ป่วยเบาหวาน คือ ตรวจวัดระดับความเข้มข้นของ HbA1c ควบคู่กับการตรวจความผิดปกติอื่น ๆ ได้แก่ การตรวจระดับน้ำตาลในเลือด (ระดับกลูโคส) การตรวจวัดระดับไขมัน (lipid profile) การตรวจการทำงานของไต (renal function test) และระดับเกลือแร่ในร่างกาย (electrolytes) ดังนั้น ในการตรวจติดตามผู้ป่วยเบาหวานแต่ละรายจึงต้องเจาะเก็บตัวอย่างเลือดทั้งหมดอย่างน้อยสองหลอดตามชนิดของสารกันเลือดแข็ง คือ หลอดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิดเอทิลีนไดเอมีนเตตราอะซิติกแอซิด: อีดีทีเอ (เลือดอีดีทีเอ) สำหรับการตรวจวัดระดับความเข้มข้นของ HbA1c และหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิดลิเธียมเฮปาริน (เลือดลิเธียมเฮปาริน) สำหรับการตรวจวัดรายการที่เหลือ ทำให้พบปัญหาในทางปฏิบัติคือ คนไข้บางรายไม่สามารถเจาะเลือดได้ในปริมาณที่ต้องการทำให้ไม่เพียงพอต่อการแบ่งใส่หลอดเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งทั้ง 2 ชนิด และในบางกรณีที่แพทย์สั่งตรวจ HbA1c เพิ่มเติมหลังจากที่มีการเจาะเลือดลิเธียมเฮปารินไปแล้ว ทำให้ต้องเจาะเลือดผู้ป่วยซ้ำ ส่งผลต่อความพึงพอใจของผู้รับบริการ

สารกันเลือดแข็งแต่ละชนิดมีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน โดยสารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอจะจับกับแคลเซียมในเลือดทำให้ไม่เกิดการแข็งตัวของเลือด มักใช้ในการตรวจทางโลหิตวิทยา[9-11] และใช้ในการตรวจวิเคราะห์ระดับ HbA1c เนื่องจากสามารถรักษาสภาพเม็ดเลือดได้ดี[10] แต่พบว่าหากเจาะเลือดได้ปริมาตรต่ำกว่าสัดส่วนเลือดต่อสารกันเลือดแข็งที่กำหนดจะทำให้เม็ดเลือดแดงเปลี่ยนรูปร่างและเสื่อมสภาพได้[9] ส่วนสารกันเลือดแข็งชนิดเฮปารินจะยับยั้งการเกิดทรอมบิน ทำให้ไม่เกิดการแข็งตัวของเลือด และมักใช้ในการตรวจวิเคราะห์ด้านเคมีคลินิก เนื่องจากสามารถลดการแตกของเม็ดเลือดแดงนอกร่างกายได้[9-12]

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ได้เปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ HbA1c จากตัวอย่างเลือดอีดีทีเอ และเลือดลิเธียมเฮปาริน โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์ที่ใช้หลักการ HPLC และอิมมิวโนแอสเซย์ ผลการศึกษาพบว่าระดับความเข้มข้นของ HbA1c แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ[13] แต่พบข้อมูลที่ระบุว่าเฮปารินไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดระดับความเข้มข้นของ HbA1c ในเครื่องตรวจที่ใช้หลักการอิเล็กโทรฟอรีซิส[3] ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาเพื่อทดสอบความแตกต่างของระดับ HbA1c ในเลือดอีดีทีเอ และเลือดลิเธียมเฮปาริน โดยใช้เครื่อง BioHermes รุ่น A1cChek Pro ด้วยหลักการโบโรเนตแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี

วัสดุและวิธีการ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาในลักษณะไปข้างหน้า (prospective study) โดยได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์มหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อวันที่ 15 มีนาคม พ.ศ. 2563 เลขที่ HE632018 โดยใช้ตัวอย่างเลือดที่เหลือจากการตรวจวัดประจำวันของผู้ป่วยคลินิกเบาหวาน โรงพยาบาลโคกสูง จังหวัดสระแก้ว จำนวน 90 ราย คำนวณขนาดตัวอย่างด้วยโปรแกรม MedCalc จากการทดสอบ Bland-Altman analysis โดยใช้ค่าอ้างอิงจากการศึกษาของวันวิสาข์ บุญเลิศ และคณะ[13] เป็นตัวอย่างเลือดลิเธียมเฮปารินของผู้ป่วยเบาหวานที่มีการเจาะตัวอย่างเลือดอีดีทีเอในเวลาเดียวกัน ซึ่งเลือกจากเลือดที่มีระดับ HbA1c ที่ตรวจจากเลือดอีดีทีเออยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจด้วยเครื่อง A1cChek Pro คือมีระดับ HbA1c อยู่ระหว่างร้อยละ 4-14

การควบคุมคุณภาพทำโดยการทดสอบสารควบคุมคุณภาพภายใน (internal control material) 2 ระดับก่อนการตรวจวัดประจำวัน และตรวจวิเคราะห์ระดับ HbA1c จากตัวอย่างเลือดอีดีทีเอภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากเจาะเลือด และนำตัวอย่างเลือดลิเธียมเฮปารินของผู้ป่วยรายเดียวกันมาตรวจวัดระดับ HbA1c ด้วยเครื่องตรวจเดียวกันภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากการตรวจวัดระดับ HbA1c จากตัวอย่างเลือดอีดีทีเอ (ภายใน 2 ชั่วโมงหลังจากเจาะเลือด)

การวิเคราะห์ข้อมูล แบ่งข้อมูลเป็น 3 กลุ่มตามระดับ HbA1c เป้าหมายการควบคุมเบาหวานของแนวทางเวชปฏิบัติเบาหวาน สมาคมโรคเบาหวานประเทศไทย[6] คือ กลุ่มที่มีการควบคุมเข้มงวดมาก (HbA1c < ร้อยละ 6.5) กลุ่มที่มีการควบคุมเข้มงวด (HbA1c = ร้อยละ 6.5-6.9) และกลุ่มที่มีการควบคุมไม่เข้มงวด (HbA1c $\geq$ ร้อยละ 7.0) เปรียบเทียบความแตกต่างโดยใช้สถิติ Mann-Whitney U test วิเคราะห์ความแตกต่างของค่า HbA1c โดยใช้ Bland-Altman analysis วิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้ สถิติ Spearman correlation coefficient และพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์โดยใช้สถิติ linear regression analysis จากโปรแกรม SPSS version 25 กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า p-value < 0.05

ผลการศึกษา

ผลการตรวจวัดระดับ HbA1c ของผู้ป่วยเบาหวานทั้งหมด 90 ราย ที่ได้จากตัวอย่างเลือดอีดีทีเอ และตัวอย่างเลือดลิเธียมเฮปาริน ของผู้ป่วยรายเดียวกันซึ่งเจาะเก็บตัวอย่างเลือดพร้อมกัน พบค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 7.23 และ 7.35 ตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับร้อยละ 1.95 และ 1.92 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์การกระจายตัวของข้อมูลด้วยสถิติ Kolmogorov—Smirnov test พบว่าตัวอย่างทั้งสองชนิดมีการกระจายตัวไม่ใช่แบบปกติ ($p < 0.01$) จึงเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับ HbA1c ในตัวอย่างเลือดทั้งสองชนิดโดยใช้สถิติ Mann-Whitney U test พบว่า ระดับ HbA1c ในตัวอย่างเลือดอีดีทีเอ และเลือดลิเธียมเฮปารินไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ดังแสดงใน Table 1

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลตามระดับ HbA1c โดยแบ่งข้อมูลเป็น 3 กลุ่มตามระดับการควบคุมเบาหวาน (HbA1c < ร้อยละ 6.5, = ร้อยละ 6.5-6.9 และ ≥ ร้อยละ 7.0) กลุ่มละ 30 ตัวอย่าง พบว่าการกระจายตัวของข้อมูลในแต่ละกลุ่มไม่ใช่แบบปกติ ($p < 0.05$) ยกเว้นในกลุ่มที่ควบคุมเข้มงวดจากตัวอย่างเลือดลิเธียมเฮปารินซึ่งมีการกระจายตัวแบบปกติ ($p > 0.05$) ค่าเฉลี่ยระดับ HbA1c ในตัวอย่างเลือดอีดีทีเอและเลือดลิเธียมเฮปาริน ของกลุ่มที่ควบคุมเข้มงวดมาก เท่ากับร้อยละ 5.55 และ 5.74 (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับร้อยละ 0.48 และ 0.54 ตามลำดับ) กลุ่มที่ควบคุมเข้มงวด พบค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 6.74 และ 6.84 ตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับร้อยละ 0.14 และ 0.41 ตามลำดับ และกลุ่มที่ควบคุมไม่เข้มงวด พบค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 9.42 และ 9.48

Table 1 HbA1c levels in EDTA blood and lithium-heparinized blood (n = 90)

Parameters	HbA1c (%)							
	Total (n=90)		Tight controlled diabetes (n=30)		Good controlled diabetes (n=30)		Poorly controlled diabetes (n=30)	
	EDTA	LH	EDTA	LH	EDTA	LH	EDTA	LH
Mean	7.23	7.35	5.55	5.74	6.74	6.84	9.42	9.48
SD	1.95	1.92	0.48	0.54	0.14	0.41	1.8	1.78
Min	4.1	4.4	4.1	4.4	6.5	6.1	7.3	7.2
Max	13.6	14.5	6.3	6.6	6.9	7.5	13.6	14
Kolmogorov–Smirnov test (*p*-value)	<0.001	<0.001	0.043	0.047	0.004	0.162	0.026	0.028
Mann-Whitney U test (*p*-value)	0.539		0.099		0.304		0.62	
paired t-test (*p*-value)	-		-		0.164		-	

EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid blood; LH: lithium-heparinized blood

และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับร้อยละ 1.8 และ 1.78 ตามลำดับ การเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับ HbA1c ในตัวอย่างเลือดทั้งสองชนิดของตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม โดยการทดสอบทางสถิติ (Mann-Whitney U test) พบว่า ทั้ง 3 กลุ่มมีระดับ HbA1c ไม่แตกต่างกัน (p - value เท่ากับ 0.099, 0.304 และ 0.620 ตามลำดับ) สำหรับกลุ่มที่ควบคุมเข้มงวดจากตัวอย่างเลือดลิเธียมเฮปาริน มีการกระจายตัวเป็นปกติจึงได้วิเคราะห์ด้วยสถิติ paired t-test เพิ่มเติม พบว่า ระดับ HbA1c ไม่แตกต่างกัน (p = 0.164) เช่นเดียวกัน (Table 1)

Table 2 Percentage of HbA1c level difference between EDTA blood and lithium-heparinized blood

Parameters	*Difference, %			
	Total (n=90)	Tight controlled diabetes (n=30)	Good controlled diabetes (n=30)	Poorly controlled diabetes (n=30)
Mean	1.91	3.45	1.54	0.76
SD	5.13	4.34	5.86	4.86
Min	-9.52	-9.43	-8.82	-9.52
Max	9.64	8.93	9.09	9.64

*%Difference=[(%HbA1c of lithium-heparinized blood - %HbA1c of EDTA blood) / %HbA1c of EDTA blood]x100

การวิเคราะห์ความแตกต่างเพื่อดูความสอดคล้องของระดับ HbA1c ในตัวอย่างเลือดอีดีทีเอ และเลือดลิเธียมเฮปาริน ด้วย Bland-Altman analysis โดยใช้เกณฑ์ ±2SD และเกณฑ์การยอมรับ (allowable error limit: AEL) ของ CLIA 2019 ที่ ± ร้อยละ 10[14] พบว่า หากใช้เกณฑ์ ± 2SD จะมีตัวอย่างทั้งหมด 87 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 96.67) มีความแตกต่างกันอยู่ในช่วง ±2SD หากใช้เกณฑ์ของ CLIA 2019 จะพบว่าตัวอย่างทั้งหมดแตกต่างกันอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังแสดงใน Table 2 และ Fig. 1

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้สถิติ Spearman correlation coefficient พบว่า ระดับ HbA1c ในตัวอย่างเลือดอีดีทีเอ และเลือดลิเธียมเฮปาริน ของตัวอย่างทั้งหมด 90 ตัวอย่าง มีความสัมพันธ์กันทางบวกในระดับดี (r = 0.981, y = 0.365 + 0.966X) เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยแบ่งข้อมูลตามกลุ่มการควบคุมเบาหวาน 3 กลุ่ม พบว่า กลุ่มตัวอย่างในกลุ่มควบคุมเข้มงวดมากและกลุ่มควบคุมไม่เข้มงวดมีความสัมพันธ์ทางบวกในระดับดี (r = 0.899 และ 0.970 ตามลำดับ) และกลุ่มที่ควบคุมเข้มงวดมีความสัมพันธ์ทางบวกในระดับอ่อน (r = 0.299) ผลการวิเคราะห์ linear regression analysis ของตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่มได้สมการคือ Y = 0.162 + 1.005X , Y = 0.761 + 0.902X และ Y = 0.452 + 0.980X ตามลำดับ (Fig. 2)

วิจารณ์

ผู้ป่วยเบาหวานโรงพยาบาลโคกสูงที่มีนัดตรวจติดตามอาการและระดับการควบคุมเบาหวานถูกเจาะเก็บตัวอย่างเลือดทั้งสองชนิด คือ เลือดอีดีทีเอ และเลือดลิเธียมเฮปาริน สำหรับการตรวจวิเคราะห์

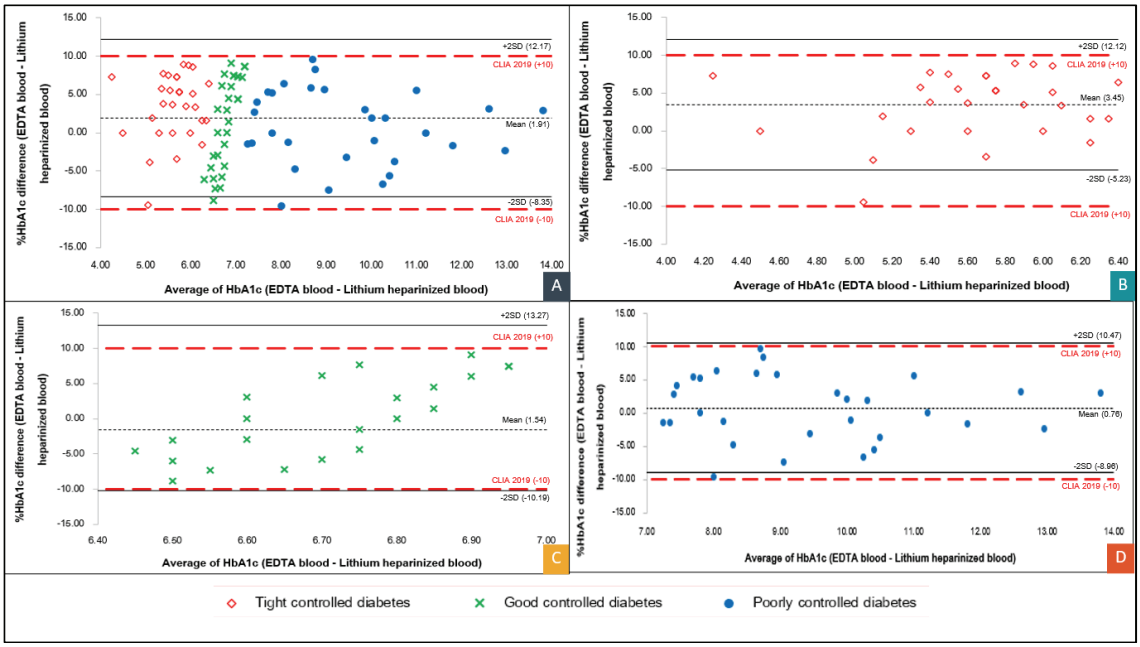

Fig. 1 Bland-Altman plot of HbA1c differences between EDTA blood and lithium-heparinized blood measured by BioHermes A1c Check Pro.

A = Blood samples with the HbA1c level of 4.0 – 14.0% (n = 90)

B = Blood samples with the HbA1c level of 4.0 – 6.4% (n = 30)

C = Blood samples with the HbA1c level of 6.5 – 6.9% (n = 30)

D = Blood samples with the HbA1c level of 7.0 – 14.0% (n = 30)

ระดับ HbA1c ด้วยเลือดอีดีทีเอ ต้องเจาะเลือดผู้ป่วยปริมาตร 3 มิลลิลิตร แต่นำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์เพียง 10 ไมโครลิตร ซึ่งหากเปลี่ยนใช้หลอดเลือดที่มีขนาดเล็กลง จะมีราคาสูงขึ้น ทำให้เพิ่มต้นทุนในการจัดซื้อวัสดุวิทยาศาสตร์ ในขณะที่ตัวอย่างเลือดลิเธียมเฮปารินสามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกได้หลายรายการ

ผลการศึกษาเปรียบเทียบระดับ HbA1c ในเลือดอีดีทีเอ และเลือดลิเธียมเฮปาริน ตรวจวัดโดยวิธีโบโรเนตแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ BioHermes รุ่น A1cCheck Pro ในผู้ป่วยเบาหวาน โรงพยาบาลโคกสูง จังหวัดสระแก้ว จำนวนทั้งหมด 90 ตัวอย่าง พบว่าระดับ HbA1c ในตัวอย่างเลือดอีดีทีเอ มีค่าเฉลี่ยต่ำกว่าในตัวอย่างเลือดลิเธียมเฮปาริน คือมีค่าเฉลี่ย เท่ากับร้อยละ 7.23 และ 7.35 และค่า SD เท่ากับ 1.95 และ 1.92 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยสถิติ Mann-Whitney U test พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน (p = 0.539) ถึงแม้จะแยกวิเคราะห์ความแตกต่างตามกลุ่มการควบคุมเบาหวาน คือ กลุ่มที่มีการควบคุมเข้มงวดมาก (HbA1c < ร้อยละ 6.5) กลุ่มที่มีการควบคุมเข้มงวด (HbA1c = ร้อยละ 6.5-6.9) และกลุ่มที่มีการควบคุมไม่เข้มงวด (HbA1c ≥ ร้อยละ 7.0) ก็ยังพบว่าตัวอย่างในแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน (p-value

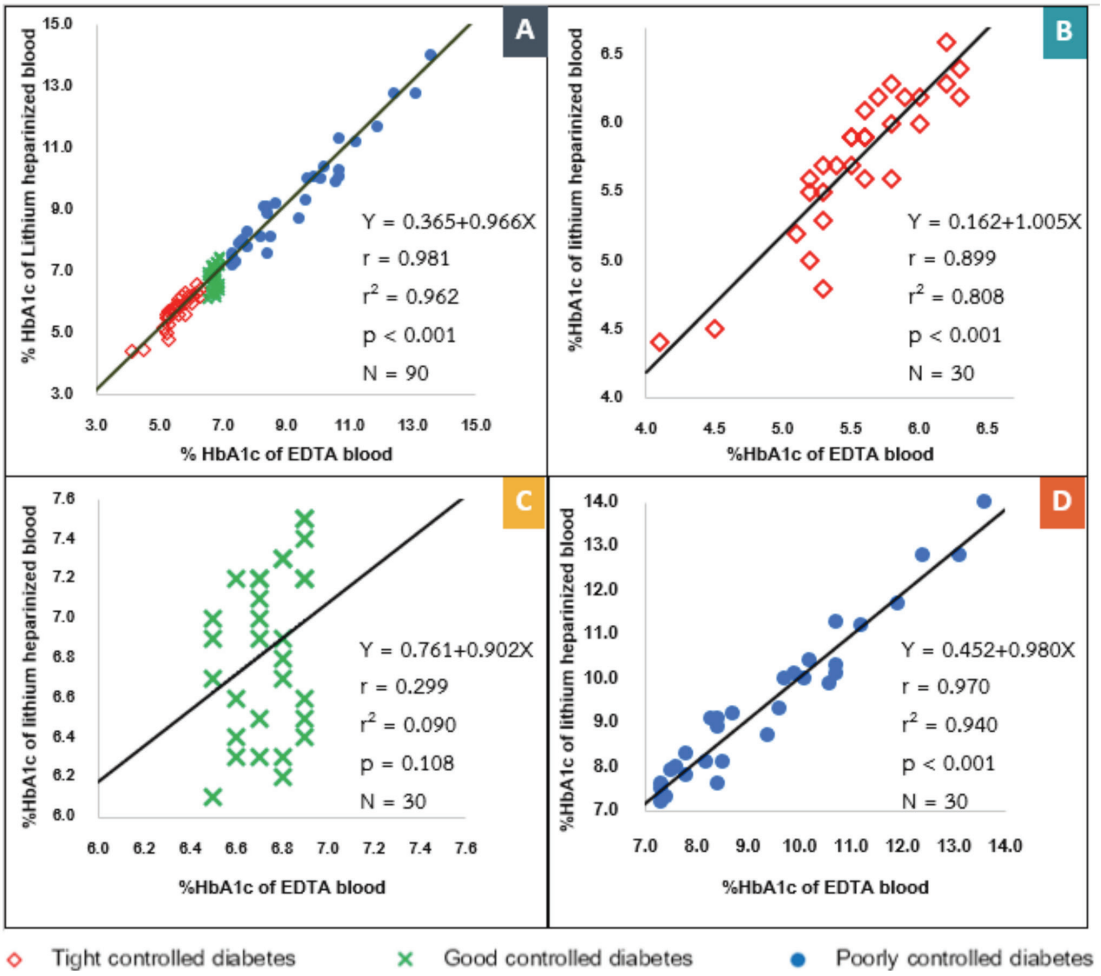

Fig. 2 Relationship between HbA1c level in EDTA blood and lithium-heparinized blood

A = Blood samples with the HbA1c level of 4.0 – 14.0% (n = 90)

B = Blood samples with the HbA1c level of 4.0 – 6.4% (n = 30)

C = Blood samples with the HbA1c level of 6.5 – 6.9% (n = 30)

D = Blood samples with the HbA1c level of 7.0 – 14.0% (n = 30)

เท่ากับ 0.099, 0.304 และ 0.620 ตามลำดับ) โดยอาจเนื่องมาจากปฏิกิริยาการเกิด HbA1c เป็นปฏิกิริยาไม่ใช้เอนไซม์ที่เกิดขึ้นอย่างช้า ๆ จึงมีความเสถียรมาก[15] โดยกลไกของสารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอ จะจับกับแคลเซียมในเลือด และลิเธียมเฮปารินจะยับยั้งการเกิดทรอมบิน ทำให้ไม่เกิดการแข็งตัวของเลือด ซึ่งไม่ส่งผลกระทบต่อการตรวจวัดระดับ HbA1c โดยการศึกษาครั้งนี้ทำการตรวจวิเคราะห์ภายใน 2 ชั่วโมงหลังจากเจาะเลือด จึงอาจทำให้ระดับ HbA1c จากตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งทั้ง

2 ชนิดไม่แตกต่างกัน ดังนั้นกรณีที่แพทย์สั่งตรวจ HbA1c เพิ่มเติมหลังจากเจาะเลือดชนิดลิเธียมเฮปาริน ไปแล้วไม่เกิน 2 ชั่วโมงจะสามารถใช้ตัวอย่างเลือดชนิดลิเธียมเฮปาริน มาตรวจวัดระดับ HbA1c ได้

การวิเคราะห์ความแตกต่างเพื่อดูความสอดคล้องของระดับ HbA1c ในตัวอย่างเลือดทั้งสองชนิด โดย Bland Altman analysis โดยกำหนดค่าจำกัดของความสอดคล้อง (limit of agreement) ที่ร้อยละ 95 พบตัวอย่าง 87 รายจากทั้งหมด 90 ราย มีความแตกต่างกันอยู่ในช่วง ± 2SD คิดเป็นร้อยละ 96.67 โดยตัวอย่างที่มีค่าความแตกต่างเกิน -2SD จำนวน 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.33 ซึ่งกระจายอยู่ในกลุ่มการควบคุมเบาหวานทั้ง 3 กลุ่ม โดยที่ตัวอย่างในกลุ่มที่ควบคุมเข้มงวดมาก ควบคุมเข้มงวด และควบคุมไม่เข้มงวด มีค่าความแตกต่างอยู่ที่ -2.21, -2.09 และ -2.11SD ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 รายนี้ไม่มีข้อมูลการสั่งตรวจระดับความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงที่อาจส่งผลกระทบต่อการตรวจวัด อย่างไรก็ตาม พบว่าตัวอย่างทั้งหมด 90 ราย มีความแตกต่างกันอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (allowable error limit) ของ CLIA 2019 คือ ± ร้อยละ 10 จึงสรุปได้ว่าการศึกษาครั้งนี้มีผลการทดลองเป็นไปตามสมมติฐาน คือ ระดับ HbA1c จากตัวอย่างที่มีอีดีทีเอและลิเธียมเฮปารินเป็นสารกันเลือดแข็งไม่แตกต่างกัน

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์และสร้างสมการในการทำนายระดับ HbA1c โดยใช้ linear regression analysis พบว่าตัวอย่างทั้งหมด 90 ตัวอย่างมีความสัมพันธ์กันในระดับดี เมื่อวิเคราะห์แยกตามกลุ่มการควบคุมเบาหวาน พบว่าในกลุ่มควบคุมเข้มงวดมากและควบคุมไม่เข้มงวดมีความสัมพันธ์ในระดับดี สำหรับกลุ่มที่ควบคุมเข้มงวดมีความสัมพันธ์ในระดับปานกลาง หมายความว่า สมการดังกล่าวในกลุ่มที่ควบคุมเข้มงวดมากและควบคุมไม่เข้มงวดสามารถทำนายได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่กลุ่มที่ควบคุมเข้มงวดสมการดังกล่าวไม่สามารถทำนายได้ เนื่องจากการควบคุมเบาหวานในแต่ละกลุ่มมีช่วงค่าระดับ HbA1c แตกต่างกัน โดยในกลุ่มที่ควบคุมเบาหวานแบบเข้มงวดมีช่วงค่าระดับ HbA1c ที่ต่างกันเพียงร้อยละ 0.4 (ร้อยละ 6.5-6.9)

การศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของเพ็ญศิริ ชูส่งแสง[16] ในปี พ.ศ. 2548 ที่ศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจวัดปริมาณ HbA1c โดยใช้เลือดอีดีทีเอกับเลือดโซเดียมฟลูออไรด์ ด้วยเครื่อง Hitachi 717 ที่ใช้หลักการ turbidimetric inhibition immunoassay (TINIA) พบว่าตัวอย่างทั้งหมด 212 ตัวอย่างมีค่าไม่แตกต่างกัน (p = 0.064) และค่ามีความสัมพันธ์กันดี (R = 0.994) สรุปได้ว่าสามารถใช้เลือดโซเดียมฟลูออไรด์ มาตรวจวิเคราะห์ HbA1c ได้ และในปี พ.ศ. 2553 วันวิสาข์ บุญเลิศ และคณะ[13] ได้ศึกษาเปรียบเทียบระดับ HbA1c ในตัวอย่างเลือดที่ใช้สารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอกับลิเธียมเฮปาริน, อีดีทีเอกับลิเธียมเฮปารินที่ผสมอยู่กับกลีเซอรัลดีไฮด์ และอีดีทีเอกับโซเดียมฟลูออไรด์ โดยใช้เครื่อง Cobas C111 หลักการ turbidimetric inhibition immunoassay (TINIA) และเครื่อง Bio Rad D-10 หลักการ HPLC โดยใช้ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยเบาหวาน 30 ราย และผู้ที่มีสุขภาพดี 5 ราย พบว่าความแตกต่างของระดับ HbA1c ที่ตรวจด้วยเครื่อง Cobas C111 และ เครื่อง Bio-Rad D-10 ในแต่ละตัวอย่างไม่แตกต่างกันและมีความสัมพันธ์กันระดับดี และสอดคล้องกับการศึกษาของ Allison FI และ Stephen DU[17] ในปี พ.ศ. 2562 ที่ศึกษาเปรียบเทียบระดับ HbA1c ในตัวอย่างเลือดที่ใช้สารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอ, ลิเธียมเฮปาริน และฟลูออไรด์ออกซาเลท ด้วยเครื่อง Clover หลักการโบโรเนตแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี จากกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี กลุ่มละ 30 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 90 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

นาน 3 วัน เมื่อทดสอบความแตกต่างโดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มคือ อีดีทีเอ-ลิเธียมเฮปาริน, อีดีทีเอ-ฟลูออไรด์ออกซาเลท และ ลิเธียม- ฟลูออไรด์ออกซาเลท พบว่าทั้ง 3 กลุ่มมีระดับ HbA1c ไม่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษานี้ สรุปการศึกษาที่ผ่านมาดังแสดงใน Table 3

สรุป

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับ HbA1c ในเลือดที่มีอีดีทีเอ และ ลิเธียมเฮปาริน เป็นสารกันเลือดแข็ง ของผู้ป่วยเบาหวานโรงพยาบาลโคกสูง จังหวัดสระแก้ว จำนวนทั้งหมด 90 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่อง Bio Hermes A1c Chek

Table 3 Summary of previous studies

Study	Analyzer	Principle	Anti-coagulant	Paired t-test (*p*-value)	Correlation coefficient (r)
Phensiri Chusongsang *et al.* (2005)[14]	Hitachi 717[a]	TINIA	- EDTA - NaF	p = 0.064	r = 0.994
Wanwisa Bunlert *et al.* (2010)[13]	Cobas c111[b]	TINIA	- EDTA - LH - LH + GA - NaF	p = 1.000	- EDTA / LH (r = 0.998) - EDTA / LH + GA (r = 0.999) - EDTA / NaF (r = 0.997)
	Bio Rad D-10[c]	HPLC	- EDTA - LH - LH + GA - NaF	p = 0.429	- EDTA / LH (r = 0.997) - EDTA / LH + GA (r = 0.993) - EDTA / NaF (r = 0.991)
Allison FI, Stephen DU (2019)[15]	Clover[d]	Boronate	- EDTA - LH	p = 0.9997	-
			- EDTA - FO	p = 0.9779	-
			- LH - FO	p = 0.9831	-

Boronate: Boronated affinity chromatography; EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid; FO: Fluoride oxalate; HPLC: High-pressure liquid chromatography; LH: lithium heparin; LH+GA: lithium heparin plus glyceraldhydes; NaF: Sodium fluoride; TINIA: Turbidimetric inhibition immunoassay. The number in parentheses after the author's name is the year of study.

[a] Roche Hitachi 717 chemistry analyzer

[b] Cobas c 111 clinical chemistry analyzer

[c] Bio-Rad D-10 Hemoglobin Testing System

[d] Clover A1c Analyzer

Pro ที่มีหลักการตรวจคือโบโรเนตแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี มีระดับ HbA1c ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) และค่าที่ตรวจได้มีความสัมพันธ์กันในระดับดีมาก เมื่อพิจารณาในแง่ของความแตกต่างที่ยอมรับทางคลินิกที่ AEL ± ร้อยละ 10 ก็ยังคงให้ผลตรวจไม่แตกต่างกัน เมื่อตัวอย่างเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง นานไม่เกิน 2 ชั่วโมง สรุปว่าสามารถใช้ตัวอย่างเลือดลิเธียมเฮปาริน แทนเลือดอีดีทีเอ ในการตรวจวิเคราะห์ระดับ HbA1c ด้วยเครื่อง Bio Hermes A1c Chek Pro ได้ โดยต้องตรวจวิเคราะห์ภายใน 2 ชั่วโมงหลังจากเจาะเลือด โดยให้ผลตรวจที่ไม่แตกต่างกัน สำหรับตัวอย่างที่มีค่า HbA1c ระหว่างร้อยละ 4.1 ถึง 13.6

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ผู้อำนวยการและเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลโคกสูง ที่มอบโอกาสและช่วยเหลือให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. IDF diabetes atlas. International Diabetes Federation. 2019; 9: 6-89.
2. Classification of diabetes mellitus. World Health Organization. 2019: 6-15.
3. Sacks DB. Diabetes Mellitus. In: Rifal N, Horvath AR, Wittwer CT. editors. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 6th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2018:1160-94.
4. Nadkarni P, Weinstock RS. Carbohydrates. In: McPherson RA, Pincus MR. editors. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods. Elsevier. 23rd ed. St. Louis, Missouri: 2017: 209-12.
5. Division of Noncommunicable Diseases, Department of Disease Control, Ministry of Public Health. The Number and Rate of Death from Non-communicable Diseases in 2016-2019. [serial online]. [Cited: 2021 May 19]. Available from: URL: http://www.thaincd.com/2016/mission3. (in Thai)
6. Diabetes Association of Thailand under the Patronage of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn, The Endocrine Society of Thailand, Department of Medical Services, Ministry of Public Health, National Health Security Office. Guidelines for Diabetes Care B.E. 2560 (2017). Pathum Thani: Romyen Media Company Limited; 2017: 35-8. (in Thai)
7. Rhea JM and Molinaro R. Pathology Consultation on HbA1c Methods and Interferences; 2014; 141: 8-13.
8. Weykamp C. HbA1c: A Review of Analytical and Clinical Aspects. Ann Lab Med 2013; 33: 393-5.
9. Jury C, Yutaka Y, Noriyuki N. In. Bain BJ, Bates I, Laffan MA, Lewis SM. Editors. Collection and handling of blood. Dacie and Lewis practical haematology. 11st ed. Elsevier: 2012: 6-7.
10. Haverstick DM, Jones PM. Specimen collection and processing. In: Rifal N, Horvath AR, Wittwer CT. editors. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 6th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2018; 6: 70-2.

11. Lifshitz MS. Preanalysis. In: McPherson RA, Pincus MR. editors. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods. Elsevier. 23rd ed. St. Louis, Missouri: 2017: 24-5.
12. Marlon LB, Prasanna Tadi. Laboratory Tube Collection. StatPearls Publishing; 2021; PMID: 32310451
13. Boonlert W, Narakantha P, Onseng S, Yamphochai S, Nuanmuang N, Moophprasit K. Hemoglobin A1c levels obtained from EDTA, lithium heparin, lithium heparin plus glycerides, and sodium fluoride blood samples. Songkla Med J 2010; 28: 107-16. (in Thai)
14. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA) Proficiency Testing Regulations Related to Analytes and Acceptable Performance. Federal Register 2019; 84: 1564-5.
15. 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.
16. Chusongsang P, Musigawan P, Wannapong N, Musow A, Apirakthunyakorn P. Comparative study of HbA1c measurement using EDTA blood vs. NaF blood. Songkla Med J 2005; 23: 73-9.
17. Allison FI, Stephen DU. Effect of different anti-coagulants on the accuracy of glycated haemoglobin results. AJMAH 2019; 16: 1-5.