ผลกระทบของพาหะฮีโมโกลบินอีที่มีต่อการตรวจวิเคราะห์ระดับฮีโมโกลบินเอวันซีด้วยหลักการ HPLC และ immunoturbidimetric

The Effects of Hb E Heterozygosity on the HbA1c Measurement by HPLC and Immunoturbidimetric Method

จารุวรรณ บุญลาโภ[1*], กรวิภา วิกัยนภากุล[2], ชมพูนุท สินธุพิบูลยกิจ[3],
ทิพย์รัตน์ โพธิพิทักษ์[4]
[1, 2, 3] คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
[4] ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 5 สมุทรสงคราม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
กระทรวงสาธารณสุข
[*]E-mail: Boonlapoe.jar@gmail.com

บทคัดย่อ

การตรวจวิเคราะห์ระดับฮีโมโกลบินเอวันซี (HbA1c) มีข้อจำกัดในการตรวจวิเคราะห์บางหลักการและเครื่องตรวจวิเคราะห์บางรุ่น เนื่องจากถูกรบกวนโดยฮีโมโกลบินที่ผิดปกติ (hemoglobin variants) หลายชนิด เช่น ฮีโมโกลบินเอส ฮีโมโกลบินซี ฮีโมโกลบินดี โดยเฉพาะฮีโมโกลบินอีซึ่งมีอุบัติการณ์สูงในประเทศไทย การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลกระทบของพาหะฮีโมโกลบินอีต่อการตรวจวิเคราะห์ระดับ HbA1c ด้วยหลักการ cation-exchange high performance liquid chromatography (HPLC) และหลักการ immunoturbidimetric ซึ่งเป็นหลักการที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการในประเทศไทย โดยทำการตรวจวิเคราะห์ระดับ HbA1c ในตัวอย่างเลือดจำนวน 90 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างเลือดที่มีชนิดฮีโมโกลบินปกติ (normal hemoglobin typing; A2A) จำนวน 30 ตัวอย่าง และตัวอย่างเลือดที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอี (heterozygous hemoglobin E; EA) จำนวน 60 ตัวอย่าง ด้วยหลักการ HPLC (HbA1c analyzer รุ่น H9) และหลักการ immunoturbidimetric (automated chemistry analyzer รุ่น XL-200) ผลการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบระดับ HbA1c ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละหลักการ พบว่าระดับ HbA1c ในตัวอย่างเลือดที่มีชนิดฮีโมโกลบินปกติไม่แตกต่างจากตัวอย่างเลือดที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอี [HPLC: 5.75% (5.62, 5.88) และ 5.66% (5.58, 5.94), p = 0.349; immunoturbidimetric: 5.79% (5.67, 5.91) และ 5.70% (5.65, 5.90), p = 0.227] เมื่อเปรียบเทียบระดับ HbA1c ที่ตรวจได้จากทั้ง 2 หลักการ พบว่าระดับ HbA1c ที่ได้จากการตรวจด้วยหลักการ HPLC มีค่าไม่แตกต่างจากระดับ HbA1c ที่ได้จากการตรวจด้วยหลักการ immunoturbidimetric [A2A: 5.75% (5.62, 5.88) และ 5.79% (5.67, 5.91), p = 0.377; EA: 5.66% (5.58, 5.94) และ 5.70% (5.65, 5.90), p = 0.360] และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า HbA1c ที่ตรวจได้จากทั้ง 2 หลักการ พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (r = 0.789, p = 0.000) จากการศึกษาสรุปได้ว่า ระดับ HbA1c ที่วิเคราะห์ได้จากทั้ง 2 หลักการมีค่าไม่แตกต่างกัน มีความสัมพันธ์กัน และไม่ถูกรบกวนในตัวอย่างตรวจที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอี ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าเครื่องตรวจวิเคราะห์ทั้ง 2 เครื่องสามารถใช้แทนกันได้โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คำสำคัญ: ฮีโมโกลบินเอวันซี พาหะฮีโมโกลบินอี HPLC Immunoturbidimetric

Abstract

Hemoglobin variants are one of the most common method-specific interferences of hemoglobinA1c (HbA1c) measurement. It has been demonstrated that hemoglobin S, hemoglobin C, hemoglobin D and hemoglobin E, which is high incidence in Thailand, can

interfere the HbA1c analysis in some principles and models. This work aims to study the effects of heterozygous hemoglobin E on the HbA1c measurements by HPLC and immunoturbidimetric methods. The HbA1c levels of 90 EDTA blood samples, which are 30 samples of normal hemoglobin typing (A2A) and 60 samples of heterozygous hemoglobin E (EA), were analyzed by cation-exchange high performance liquid chromatography or HPLC (H9 HbA1c analyzer) and immunoturbidimetric method (XL-200 automated chemistry analyzer). Results: The HbA1c levels of normal hemoglobin typing and heterozygous hemoglobin E samples were not different [HPLC: 5.75% (5.62, 5.88) vs 5.66% (5.58, 5.94), p = 0.349; immunoturbidimetric: 5.79% (5.67, 5.91) vs 5.70% (5.65, 5.90), p = 0.227]. In addition, the HbA1c levels measured by HPLC were also not significantly different, compared to immunoturbidimetric assay in each hemoglobin typing [A2A: 5.75% (5.62, 5.88) vs 5.79% (5.67, 5.91), p = 0.377; EA: 5.66% (5.58, 5.94) vs 5.70% (5.65, 5.90), p = 0.360]. The statistically significant correlation of the two methods was observed (r = 0.789, p = 0.000). This study suggested that there were no statistically significant difference in HbA1c levels measured by HPLC (H9 HbA1c analyzer) and immunoturbidimetric assay (XL-200 automated chemistry analyzer). The results analyzed by two methods were correlated. The effect of heterozygous hemoglobin E on the HbA1c levels measured by both methods were not found.

Keywords: HemoglobinA1c, Heterozygous hemoglobin E, HPLC, Immunoturbidimetric

บทนำ

โรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่เกิดจากความผิดปกติของการหลั่งหรือการออกฤทธิ์ของอินซูลินที่ลดลงจึงส่งผลทำให้ระดับน้ำตาลในร่างกายสูงเป็นระยะๆ หรือสม่ำเสมอ ถ้าไม่ได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมจะทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นเวลานานซึ่งมีผลทำลายหลอดเลือดและนำไปสู่ภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงได้ โรคเบาหวานจัดเป็นปัญหาสำคัญระดับโลก จากรายงานของสหพันธ์เบาหวานโลก (International Diabetes Federation; IDF) ในปี พ.ศ. 2558 กล่าวว่าสามารถพบผู้เป็นโรคเบาหวาน 1 คน จากจำนวนผู้ใหญ่ 11 คน และทำนายว่าอีก 25 ปีข้างหน้าจะพบผู้เป็นโรคนี้เพิ่มขึ้นเป็น 1 คนจาก 10 คน และทั่วโลกจะมีผู้ป่วยโรคเบาหวานเพิ่มจากจำนวน 415 ล้านคน เป็น 642 ล้านคน ในปี พ.ศ. 2583[1] จากรายงานของสำนักโรคไม่ติดต่อพบว่าในระหว่างปี 2555-2558 มีแนวโน้มอัตราตายด้วยโรคเบาหวานในประเทศไทยเพิ่มขึ้นจาก 12.1 ต่อแสนประชากรเป็น 19.4 ต่อแสนประชากรและยังพบว่ามีอัตราการตายก่อนวัยอันควรอันมีสาเหตุมาจากโรคเบาหวานเพิ่มขึ้นจาก 13.2 ต่อแสนประชากรเป็น 17.8 ต่อแสนประชากรด้วย[2] ดังนั้นโรคเบาหวานจึงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย เบาหวานเป็นโรคที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้แต่สามารถควบคุมได้โดยการปฏิบัติตนตามคำสั่งของแพทย์อย่างเคร่งครัดเพื่อรักษาระดับน้ำตาลในเลือดไม่ให้สูงเกินไป กระบวนการติดตามและประเมินผลการรักษาทำได้โดยการตรวจระดับฮีโมโกลบินเอวันซี (HbA1c) ควบคู่กับการตรวจระดับน้ำตาลในเลือดหลังอดอาหารอย่างน้อย 8 ชั่วโมง (fasting blood glucose) เพื่อสะท้อนถึงระดับน้ำตาลในเลือดอย่างแท้จริง

HbA1c เกิดจากกระบวนการไกลเคชั่น (glycation) ของกรดอะมิโนวาลีน (valine) บริเวณตำแหน่งที่ 1 บนสายเบตาโกลบิน (β – globin chain) ของฮีโมโกลบิน ระดับ HbA1c สะท้อนถึงระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสะสมย้อนหลัง 3 เดือนได้จึงนำมาใช้ประโยชน์ในแง่ของการวินิจฉัยและติดตามการดูแลรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน ระดับ HbA1c จะมากหรือน้อยขึ้นกับความเข้มข้นของระดับน้ำตาลในเลือด (plasma glucose) จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง HbA1c และระดับน้ำตาลในเลือดพบว่าระดับ HbA1c จะเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 1 เมื่อระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น 30 mg/dL[3] สหพันธ์เบาหวานโลกแนะนำว่าระดับ HbA1c ในเลือดควรมีค่าน้อยกว่า

6.5% ในขณะที่สมาคมโรคเบาหวานแห่งสหรัฐอเมริกา (American Diabetes Association; ADA) แนะนำว่าควรควบคุมระดับ HbA1c ให้อยู่ในระดับที่ไม่เกิน 7% เพื่อลดภาวะแทรกซ้อนที่จะเกิดจากโรคเบาหวาน[4,5] จากการศึกษาของ UK prospective diabetes study (UKPDS) และ diabetes control and complications trial (DCCT) พบว่าระดับ HbA1c มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดโรคแทรกซ้อนจากเบาหวานในระยะยาว[5]

ในปัจจุบันหลักการที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ HbA1c มีหลายหลักการซึ่งสามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ 1.) การตรวจวิเคราะห์โดยอาศัยความแตกต่างของประจุไฟฟ้า ได้แก่ หลักการ electrophoresis, isoelectric focusing และ cation-exchange high performance liquid chromatography (HPLC) 2.) การตรวจวิเคราะห์โดยอาศัยความแตกต่างทางเคมี ได้แก่ หลักการใช้ปฏิกิริยาเอนไซม์ (enzymatic method) และ 3.) การตรวจวิเคราะห์โดยอาศัยความแตกต่างทางกายภาพ ได้แก่ affinity chromatography และ immunoassay สำหรับห้องปฏิบัติการในประเทศไทยนิยมใช้หลักการ HPLC และ immunoassay หลักการ cation-exchange high performance liquid chromatography (HPLC) แยก HbA1c ฮีโมโกลบินเอ (hemoglobin A; HbA) และฮีโมโกลบินชนิดอื่นๆแล้วคำนวณค่าเป็นร้อยละของระดับ HbA1c โดยเทียบกับ hemoglobin A (% HbA1c) ส่วนหลักการ immunoassay เป็นหลักการที่ใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ต่อตำแหน่งที่จำเพาะ (epitope) บริเวณปลายด้านหมู่อะมิโน (N-terminal) ของสายเบตาโกลบิน ทำให้เกิดการรวมกลุ่ม (agglutination) ระหว่าง antibody และ HbA1c (antibody-HbA1c complex) หลักการ immunoassay สามารถแบ่งเป็น 2 หลักการย่อย ได้แก่ หลักการ immunoturbidimetric ซึ่งวัดความขุ่นที่เกิดจากการรวมกลุ่มระหว่าง antibody และ HbA1c โดยตรง และหลักการ immunoturbidimetric inhibition ซึ่งใช้สารอีกชนิดมาจับกับแอนติบอดีที่เหลือจากปฏิกิริยาการรวมกลุ่มแล้ววัดความขุ่นที่เกิดขึ้น แต่อย่างไรก็ตามพบว่าความผิดปกติของฮีโมโกลบินสามารถรบกวนการตรวจวิเคราะห์ HbA1c ได้ทั้งในเชิงบวกและเชิงลบ[6]ขึ้นอยู่กับชนิดของความผิดปกติและหลักการที่ใช้ในการวิเคราะห์

ฮีโมโกลบินอีเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบมากในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (โดยเฉพาะประเทศไทย ลาว กัมพูชาและเวียดนาม) ฮีโมโกลบินอีเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติ (abnormal hemoglobin) ที่เกิดจากการกลายพันธุ์เพียง 1 ตำแหน่ง (single point mutation) ของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 26 บนสายเบตาโกลบินของฮีโมโกลบิน โดยเกิดการแทนที่ของกรดอะมิโนกลูตามิก (glutamic acid) ด้วยกรดอะมิโนไลซีน (lysine) ในประเทศไทยพบอุบัติการณ์ของฮีโมโกลบินอีโดยเฉลี่ยร้อยละ 13 และสูงขึ้นในภาคตะวันออกเฉียงเหนือถึงร้อยละ 30-40 [7] จากการศึกษาพบว่าฮีโมโกลบินอีสามารถรบกวนการตรวจด้วยหลักการ HPLC ได้ในเครื่องตรวจวิเคราะห์บางรุ่น งานวิจัยของ Little และคณะ ในปี 2008[8] ซึ่งศึกษาผลกระทบของตัวอย่างที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอี (heterozygous hemoglobin E) ที่มีต่อการตรวจวิเคราะห์ HbA1c ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์หลักการ HPLC จำนวน 10 รุ่น เทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่มีฮีโมโกลบินชนิดปกติ (homozygous hemoglobin A) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของระดับ HbA1c เฉลี่ยในกลุ่มตัวอย่าง heterozygous hemoglobin E เมื่อเทียบกับกลุ่มตัวอย่าง homozygous hemoglobin A ในเครื่องตรวจวิเคราะห์บางรุ่น [Variant (classic)] ในขณะที่เครื่องตรวจวิเคราะห์บางรุ่น [D-10 (short) และ Variant II Turbo)] วิเคราะห์ได้ระดับ HbA1c เฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่าง heterozygous hemoglobin E สูงกว่ากลุ่มตัวอย่าง homozygous hemoglobin A นอกจากนี้เครื่องตรวจวิเคราะห์บางรุ่น [D-10 (extended), Variant II NU, HA8160 TP, HA8160 DM, 2.2 Plus, G7 และG8] วิเคราะห์ได้ระดับ HbA1c เฉลี่ยในกลุ่มตัวอย่าง heterozygous hemoglobin E ต่ำกว่าในกลุ่มตัวอย่าง homozygous hemoglobin A

สำหรับหลักการ immunoassay ในปี 2008 Little และคณะ[8] ได้ศึกษาผลกระทบของตัวอย่างที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอี (heterozygous hemoglobin E) ที่มีต่อการตรวจวิเคราะห์ HbA1c เมื่อเทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่มีฮีโมโกลบินชนิดปกติ (homozygous hemoglobin A) ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์หลักการ immunoassay จำนวน 9 รุ่น พบว่าเครื่องตรวจวิเคราะห์บางรุ่น (A1cNow, Synchron UniCel DxC, DCA2000, Au400 และ Pointe Scientific) ตรวจวิเคราะห์ระดับ HbA1c เฉลี่ยในกลุ่มตัวอย่าง heterozygous hemoglobin E ได้ไม่

แตกต่างกับระดับ HbA1c เฉลี่ยในกลุ่มตัวอย่าง homozygous hemoglobin A ในขณะที่เครื่องตรวจวิเคราะห์บางรุ่น (Dimension RxL, Vitros, Integra 800 Gen2 และ Tina-quant 917) ตรวจวิเคราะห์ระดับ HbA1c เฉลี่ยในกลุ่มตัวอย่าง heterozygous hemoglobin E ได้ต่ำกว่าระดับ HbA1c เฉลี่ยในกลุ่มตัวอย่าง homozygous hemoglobin A อย่างไรก็ตามความแตกต่างของระดับ HbA1c ในกลุ่มตัวอย่าง heterozygous hemoglobin E ที่ตรวจได้โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์หลักการ immunoassay ทุกรุ่น เมื่อเทียบกับกลุ่มตัวอย่าง homozygous hemoglobin A พบว่าไม่มีนัยสำคัญทางคลินิกที่ระดับ HbA1c 6% และ 9% ตามลำดับ ในขณะที่ Paisooksantivatana และคณะ[9] เปรียบเทียบระดับ HbA1c ในกลุ่มตัวอย่าง normal hemoglobin typing (A_2A) และ heterozygous hemoglobin E (EA) ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์หลักการ turbidimetric inhibition immunoassay (Cobas Integra) และหลักการ immunoturbidimetric (Dimension RxL) พบว่าระดับ HbA1c เฉลี่ยในกลุ่มตัวอย่าง heterozygous hemoglobin E มีค่าต่ำกว่ากลุ่มตัวอย่าง normal hemoglobin typing อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างผลการตรวจวิเคราะห์ HbA1c ที่ตรวจโดยเครื่องตรวจวิเคราะห์ทั้ง 2 รุ่น กับปริมาณฮีโมโกลบินอีในตัวอย่าง

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าการตรวจวิเคราะห์ระดับ HbA1c ในหลายๆ หลักการ และหลายรุ่นของเครื่องตรวจวิเคราะห์ถูกรบกวนได้จากฮีโมโกลบินชนิดผิดปกติ เช่น ฮีโมโกลบินอี ซึ่งประเทศไทยเป็นหนึ่งในประเทศที่มีความชุกของฮีโมโกลบินอีสูง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลกระทบของพาหะฮีโมโกลบินอีต่อการตรวจวิเคราะห์ระดับ HbA1c ด้วยหลักการ cation-exchange high performance liquid chromatography (HPLC) และหลักการ immunoturbidimetric ซึ่งเป็นหลักการที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการในประเทศไทย

วิธีการดำเนินการวิจัย

เก็บตัวอย่างเลือดที่ได้รับการตรวจชนิดฮีโมโกลบินด้วยหลักการ high performance liquid chromatography (HPLC) ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์ Variant™ II hemoglobin testing system [Bio-Rad, USA] จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 5 สมุทรสงคราม กระทรวงสาธารณสุข จำนวน 90 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มตัวอย่างเลือดที่มีชนิดฮีโมโกลบินปกติ (normal hemoglobin typing; A_2A) จำนวน 30 ตัวอย่าง และกลุ่มตัวอย่างเลือดพาหะฮีโมโกลบินอี (heterozygous hemoglobin E; EA) จำนวน 60 ตัวอย่าง นำตัวอย่างเลือดมาวิเคราะห์ระดับฮีโมโกลบินเอวันซี (hemoglobin A1c; HbA1c) ด้วยหลักการ cation-exchange high performance liquid chromatography (cation-exchange HPLC) ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์ HbA1c analyzer รุ่น H9 [Lifotronic, China] และหลักการ immunoturbidimetric ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์ automated chemistry analyzer รุ่น XL-200 [Erba Mannheim, Germany] วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 23.0 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลของตัวอย่างเลือด ได้แก่ อายุเฉลี่ย ค่าเฉลี่ยของ % Hb F ค่าเฉลี่ยของ % Hb A_0 ด้วยสถิติ *t*-test และเพศด้วยสถิติ Chi-Square เปรียบเทียบความแตกต่างของระดับ HbA1c ระหว่างกลุ่มตัวอย่างชนิดฮีโมโกลบินปกติและตัวอย่างพาหะฮีโมโกลบินอี และความแตกต่างระหว่างระดับ HbA1c ที่ตรวจวิเคราะห์จากทั้ง 2 หลักการด้วยสถิติ *t*-test วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ HbA1c ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วย 2 หลักการ ด้วยสถิติ Pearson correlation coefficient โดยกำหนดนัยสำคัญที่ระดับ 0.05 งานวิจัยนี้ได้รับการรับรองจริยธรรมการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ เลขที่รับรอง อ.432/2559

ผลการวิจัย

จากตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีทั้งสิ้น 90 ตัวอย่าง จัดเป็นตัวอย่างเลือดที่เป็นเพศชาย 40 ตัวอย่าง เพศหญิง 50 ตัวอย่าง ซึ่งมีอายุระหว่าง 14-47 ปี ผลการวิเคราะห์แยกชนิดของฮีโมโกลบิน พบว่าเป็นชนิดฮีโมโกลบินปกติ (normal hemoglobin typing; A_2A) จำนวน 30 ตัวอย่าง (33.3%) และเป็นชนิดพาหะฮีโมโกลบินอี (heterozygous hemoglobin E) จำนวน 60 ตัวอย่าง (66.7%) โดยเพศและอายุระหว่างกลุ่มที่มี

ฮีโมโกลบินปกติ (A_2A) และกลุ่มที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอี (EA) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.504 และ 0.911 ตามลำดับ) ค่าเฉลี่ย % Hb F และ % Hb A_0 ระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่มีชนิดฮีโมโกลบิน A_2A และ EA มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.000) รายละเอียดแสดงในตารางที่ 1

จากการตรวจระดับ HbA1c ในตัวอย่างเลือดด้วยหลักการ HPLC (HbA1c analyzer รุ่น H9) ทั้ง 90 ตัวอย่าง พบว่าระดับ HbA1c ที่แสดงด้วยค่าเฉลี่ย (95% CI) มีค่าเท่ากับ 5.69% (5.59, 5.79) โดยในกลุ่มตัวอย่างที่มีชนิดฮีโมโกลบินปกติและในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอีมีระดับ HbA1c เท่ากับ 5.75% (5.62, 5.88) และ 5.66% (5.58, 5.94) ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ระดับ HbA1c จากทั้ง 90 ตัวอย่าง ด้วยหลักการ immunoturbidimetric โดยใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์ automated chemistry analyzer รุ่น XL-200 พบว่าระดับ HbA1c มีค่าเฉลี่ย (95%CI) เท่ากับ 5.73% (5.66, 5.80) โดยในกลุ่มตัวอย่างที่มีชนิดฮีโมโกลบินปกติและในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอีมีค่า HbA1c เท่ากับ 5.79% (5.67, 5.91) และ 5.70 (5.65, 5.90) ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ ระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่มีชนิดฮีโมโกลบินปกติและกลุ่มตัวอย่างที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอีจากการตรวจด้วยหลักการ HPLC (p = 0.349) และหลักการ immunoturbidimetric (p = 0.227) ดังสรุปในตารางที่ 2

เมื่อทดสอบหาความแตกต่างระหว่างการตรวจวิเคราะห์ HbA1c โดย 2 หลักการ ในกลุ่มตัวอย่างที่มีชนิดฮีโมโกลบินปกติ 30 ตัวอย่าง พบว่าระดับ HbA1c ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยหลักการ HPLC (HbA1c analyzer รุ่น H9) และหลักการ immunoturbidimetric (automated chemistry analyzer รุ่น XL-200) มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.377) และในกลุ่มที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอี 60 ตัวอย่าง มีค่าไม่แตกต่างเช่นเดียวกัน (p = 0.360) เมื่อวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของระดับ HbA1c รวมทั้ง 90 ตัวอย่างโดยไม่แบ่งชนิดฮีโมโกลบิน พบว่าทั้ง 2 หลักการให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.213) ดังสรุปในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ข้อมูลของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย (N = 90) แบ่งตามชนิดของฮีโมโกลบิน

ND = ไม่มีข้อมูล

ข้อมูล	**Normal hemoglobin typing (A_2A) (N = 30)**	**Heterozygous hemoglobin E (EA) (N = 60)**	***p*-value**	**รวม (N = 90)**
เพศ จำนวน (ร้อยละ)				
ชาย	15 (50 %)	25 (41.7 %)	0.504[a]	40 (44.4 %)
หญิง	15 (50 %)	35 (58.3 %)		50 (55.6 %)
อายุ ค่าเฉลี่ย (พิสัย) ปี	26 (15-45)	26 (14-47)	0.911	26 (14-47)
ค่าเฉลี่ย % Hb F (พิสัย)	0.40 (0.2-0.9)	0.98 (0.4-2.8)	0.000	0.79 (0.20-2.80)
ค่าเฉลี่ย % Hb A_0 (พิสัย)	86.96 (85.40-89.60)	61.72 (59.70-69.10)	0.000	70.14 (59.70-89.60)
ค่าเฉลี่ย % Hb A_2	2.93 (2.50-3.20)	ND		
ค่าเฉลี่ย % Hb E	ND	27.71 (24.50-31.00)		

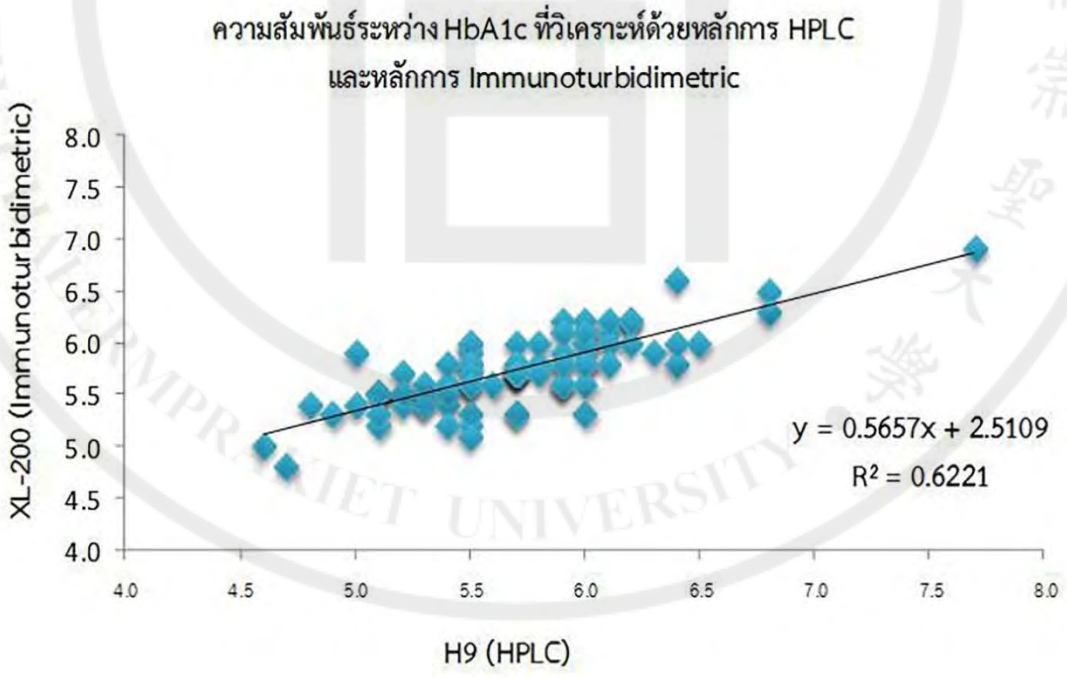
a. Chi-Square

ตารางที่ 2 ระดับ % HbA1c [ค่าเฉลี่ย (95 %CI)] ในกลุ่มตัวอย่าง normal hemoglobin typing (A_2A) และ heterozygous hemoglobin E (EA)

Hemoglobin type	HbA1c analyzer รุ่น H9 (HPLC)	Automated chemistry analyzer รุ่น XL-200 (Immunoturbidimetric)	*p*-value
Total (N = 90)	5.69 (5.59, 5.79)	5.73 (5.66, 5.80)	0.213
Normal hemoglobin typing (A_2A) (N = 30)	5.75 (5.62, 5.88)	5.79 (5.67, 5.91)	0.377
Heterozygous hemoglobin E (EA) (N = 60)	5.66 (5.58, 5.94)	5.70 (5.65, 5.90)	0.360
p-value	0.349[a]	0.227[a]	

a. เปรียบเทียบระหว่าง normal hemoglobin typing (A_2A) และ heterozygous hemoglobin E

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจวิเคราะห์ระดับ HbA1c ด้วยหลักการ HPLC (HbA1c analyzer รุ่น H9) และหลักการ immunoturbidimetric (automated chemistry analyzer รุ่น XL-200) พบว่าการตรวจวิเคราะห์ทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.789 (p = 0.000) และมีสมการถดถอยอย่างง่าย y = 0.5657x + 2.5109 ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ HbA1c ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยหลักการ HPLC (HbA1c analyzer รุ่น H9) และหลักการ immunoturbidimetric (automated chemistry analyzer รุ่น XL-200)

สรุปและวิจารณ์

จากงานวิจัยนี้พบว่าระดับ HbA1c เฉลี่ยที่ตรวจด้วยหลักการ cation-exchange high performance liquid chromatography (HPLC) จากเครื่องตรวจวิเคราะห์ HbA1c analyzer รุ่น H9 และหลักการ immunoturbidimetric จากเครื่องตรวจวิเคราะห์ automated chemistry analyzer รุ่น XL-200 ให้ผลไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่มีชนิดฮีโมโกลบินปกติและกลุ่มตัวอย่างที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอี (p = 0.349 และ 0.227 ตามลำดับ)

การวิเคราะห์ด้วยหลักการ HPLC โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์ HbA1c analyzer รุ่น H9 ให้ค่าระดับ HbA1c ที่แสดงด้วยค่าเฉลี่ย (95% CI) ในกลุ่มตัวอย่างที่มีชนิดฮีโมโกลบินปกติเท่ากับ 5.75% (5.62, 5.88) และในกลุ่มที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอีเท่ากับ 5.66% (5.58, 5.94) และสำหรับการวิเคราะห์ด้วยหลักการ immunoturbidimetric โดยใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์ automated chemistry analyzer รุ่น XL-200 ให้ค่าระดับ HbA1c ที่แสดงด้วยค่าเฉลี่ย (95% CI) ในกลุ่มตัวอย่างที่มีชนิดฮีโมโกลบินปกติเท่ากับ 5.79% (5.67, 5.91) และกลุ่มตัวอย่างที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอีเท่ากับ 5.70% (5.65, 5.90) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Little และคณะ[8] ซึ่งพบว่าพาหะฮีโมโกลบินอีไม่มีผลรบกวนต่อการตรวจวิเคราะห์ HbA1c ด้วยหลักการ HPLC ที่ตรวจวิเคราะห์โดยเครื่อง Variant (classic) และการตรวจวิเคราะห์ HbA1c ด้วยหลักการ immunoassay โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์ A1cNow, Synchron UniCel DxC, DCA2000, Au400 และ Pointe Scientific แต่ผลการศึกษาครั้งนี้ตรงกันข้ามกับงานวิจัยของ Pravatmuang และคณะ[10] ที่ศึกษาผลกระทบของฮีโมโกลบินอีที่มีต่อการตรวจวิเคราะห์ HbA1c ด้วยหลักการ ionic-exchange HPLC โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์ Variant™ Hemoglobin A1c program และการตรวจวิเคราะห์ด้วยหลักการ turbidimetric inhibition immunoassay โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์ BM / Hitachi 912 และน้ำยา Tina-quant HB1AC II ซึ่งพบว่าผลการตรวจวิเคราะห์ HbA1c ในกลุ่มตัวอย่างพาหะฮีโมโกลบินอีให้ผลการวิเคราะห์ไปในทางที่สูงกว่ากลุ่มตัวอย่างคนปกติที่ไม่เป็นพาหะ

เมื่อวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของระดับ HbA1c รวมทั้ง 90 ตัวอย่าง โดยไม่แบ่งชนิดของฮีโมโกลบิน พบว่าค่าเฉลี่ยของระดับ HbA1c ที่วิเคราะห์ด้วยหลักการ HPLC และ immunoturbidimetric มีค่าที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.213) โดยค่าเฉลี่ยของ HbA1c ที่แสดงด้วยค่าเฉลี่ย (95% CI) เมื่อวิเคราะห์ด้วยหลักการ HPLC โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์ HbA1c analyzer รุ่น H9 ให้ค่า HbA1c เฉลี่ยเท่ากับ 5.69% (5.59,5.79) และเมื่อวิเคราะห์ด้วยหลักการ immunoturbidimetric โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์ automated chemistry analyzer รุ่น XL-200 ให้ค่า HbA1c เฉลี่ยเท่ากับ 5.73% (5.66, 5.80)

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการตรวจวิเคราะห์ระดับ HbA1c ระหว่างหลักการ HPLC และ immunoturbidimetric โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์ HbA1c analyzer รุ่น H9 และ automated chemistry analyzer รุ่น XL-200 ตามลำดับ พบว่าการตรวจวิเคราะห์ทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (r = 0.789, p = 0.000) และมีสมการถดถอยอย่างง่าย คือ y = 0.5657x + 2.5109 แสดงให้เห็นว่าเครื่องตรวจวิเคราะห์ HbA1c analyzer รุ่น H9 ที่ใช้หลักการ HPLC และเครื่องตรวจวิเคราะห์ automated chemistry analyzer รุ่น XL-200 ซึ่งใช้หลักการ immunoturbidimetric ให้ผลการวิเคราะห์ HbA1c ไม่แตกต่างกันและมีความสัมพันธ์กันดี สามารถใช้แทนกันได้โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ลมุล วงศ์กฤตวิทย์[11] ที่ศึกษาเกี่ยวกับการตรวจวิเคราะห์ HbA1c ด้วยหลักการ turbidimetric inhibition immunoassay โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์ Cobas รุ่น Integra 800 และหลักการ high performance liquid chromatography (HPLC) โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์ ADAMS A1C รุ่น HA8180V พบว่าทั้ง 2 หลักการให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ไม่แตกต่างกัน มีความสัมพันธ์กันดีทางสถิติเช่นกัน

หลักการ HPLC เป็นหลักการที่แยก HbA1c, HbA และฮีโมโกลบินชนิดอื่น ๆ แล้วคำนวณค่าเป็นร้อยละของระดับ HbA1c โดยเทียบกับ hemoglobin A (% HbA1c) ดังนั้นความสามารถในการแยกชนิดฮีโมโกลบินของเครื่องตรวจวิเคราะห์หลักการ HPLC แต่ละรุ่นจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้การตรวจวิเคราะห์ HbA1c คลาดเคลื่อนได้ หากฮีโมโกลบินชนิดต่าง ๆ ถูกชะออกมาพร้อมกับ HbA1c หรือถูกชะออกมาพร้อมกับ Hb A ส่วนหลักการ

immunoturbidimetric เป็นหลักการที่ใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ต่อตำแหน่งที่จำเพาะ (epitope) กับกรดอะมิโนที่ปลายสายเบตาโกลบินซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสจับอยู่ อาจให้ผลคลาดเคลื่อนได้หากตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างตรวจที่มีชนิดฮีโมโกลบินผิดปกติที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ตรงกับความจำเพาะของแอนติบอดี

จากงานวิจัยนี้จึงสรุปได้ว่าพาหะฮีโมโกลบินอีไม่มีผลรบกวนการตรวจวิเคราะห์ระดับ HbA1c ด้วยหลักการ cation-exchange high performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์ HbA1c analyzer รุ่น H9 และหลักการ immunoturbidimetric ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์ automated chemistry analyzer รุ่น XL-200 ดังนั้นจึงสามารถใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์ทั้งสองรุ่นในการตรวจวิเคราะห์ระดับ HbA1c เพื่อติดตามผลการรักษาผู้ป่วยเบาหวานที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอีได้ เนื่องจากพบว่าผลการวิเคราะห์ HbA1c จากทั้งสองหลักการ จากเครื่องตรวจวิเคราะห์ทั้งสองรุ่นนี้ให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่แตกต่างกันและมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทำให้ผู้ปฏิบัติงานที่ต้องใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์ดังกล่าว เกิดความมั่นใจในผลการตรวจวิเคราะห์มากยิ่งขึ้นว่าจะได้ผลที่ถูกต้อง เนื่องจากไม่มีผลกระทบจากชนิดของฮีโมโกลบินในกลุ่มพาหะฮีโมโกลบินอี (heterozygous hemoglobin E) แต่ยังคงมีความจำเป็นในการศึกษาผลกระทบของชนิดฮีโมโกลบินที่ผิดปกติชนิดอื่นๆ อีก เช่น โฮโมซัยกัสฮีโมโกลบิน อี (homozygous hemoglobin E) ว่ามีผลรบกวนต่อการตรวจวิเคราะห์ HbA1c ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์ HbA1c analyzer รุ่น H9 และ automated chemistry analyzer รุ่น XL-200 หรือไม่ เพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นและความถูกต้องในการวิเคราะห์ HbA1c ในผู้ป่วยเบาหวานที่อาจมีชนิดของฮีโมโกลบินที่ผิดปกติได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนงานวิจัยจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 5 สมุทรสงคราม กระทรวงสาธารณสุข ในการรวบรวมตัวอย่างเลือดและข้อมูลของตัวอย่าง ขอขอบคุณคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Cavan D, Fernandes JR, Makaroff L, Ogurtsova K, Webber S, editors. IDF Diabetes Atlas. 7th ed. International Diabetes Federation 2015. p12 [cited 2017 Feb 28]. Available from: http://www.diabetesatlas.org/component/attachments/?task=download&id=116
2. กลุ่มยุทธศาสตร์และแผนงานสำนักโรคไม่ติดต่อ. รายงานประจำ ปี 2559. สำนักโรคไม่ติดต่อ กรมควบคุมโรคกระทรวงสาธารณสุข หน้า 18 [ค้นเมื่อ 28 กุมภาพันธ์ 2560]. เข้าถึงได้จาก http://thaincd.com/document/file/download/paper-manual/รายงานประจำปี_59_สำนักโรคไม่ติดต่อ.pdf
3. Nathan DM, Kuenen J, Borg R, Zheng H, Schoenfeld D, Heine RJ. Translating the A1C assay into estimated average glucose values. Diabetes Care. 2008; 31: 1473-8.
4. International diabetes federation. Clinical Guidelines Task Force. Global guideline for type 2 diabetes. 2012. p 38.
5. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2011. Diabetes Care. 2011; 34 (Suppl 1): S11-S61.
6. WHO (2011).Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus (Abbreviated Report of a WHO Consultation). WHO/NMH/CHP/CPM/11.1 p.16

7. มูลนิธิโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียแห่งประเทศไทย. แนวทางการวินิจฉัยและรักษาโรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย. กระทรวงสาธารณสุข. 2555. หน้า 1
8. Little RR, Rohlfing CL, Hanson S, Connolly S, Higgins T, Weykamp CW, et al. Effects of hemoglobin (Hb) E and HbD traits on measurements of glycated Hb (HbA1c) by 23 methods. Clin Chem. 2008; 54(8): 1277–82
9. Paisooksantivatana K , Kongsomgan A , Banyatsuppasin W , Khupulsup K. Influence of hemoglobin E on measurement of hemoglobin A1c by immunoassays. Diabetes Res Clin Pract. 2009; 83(3): e84-5
10. Pravatmuang P, Sae-Ngow B, Whanpuch T, Leowattana W. Effect of HbE and HbH on HbA1c level by ionic exchange HPLC comparing to immunoturbidimetry. Clin Chim Acta 2001;313 (1-2):171-8
11. ลมุล วงค์กฤตวิทย์. การศึกษาเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณฮีโมโกลบินเอวันซีด้วยวิธี Immunoturbidimetric และ High pressure liquid chomatography ในผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจที่คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช; Vajira Med J. 2015; 59(4): 9-16