สัญญาเลขที่ R2562B029

สำนักวิทยบริการ

สำนักวิทยบริการ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาวัสดุทดสอบความชำนาญและวัสดุอ้างอิงชนิดน้ำเหลืองสำหรับการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินเอวันซีและฟรุกโตซามินตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043 และ ISO 17034

สำนักวิทยบริการ มหาวิทยาลัยนเรศวร
30 ก.ค. 2564
QP
96
.5
น147ร
2562

คณะผู้วิจัย

1. ดร.นภาพร อภิรัฐเมธีกุล คณะสหเวชศาสตร์
2. ผศ.ดร.วันวิสาข์ ตรีบุพชาติสกุล คณะสหเวชศาสตร์
3. ดร.ครรชิต คงรส คณะสหเวชศาสตร์

สนับสนุนโดย

งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

Abstracts

Backgroud; Diabetes is a condition that patients can not to control the level of sugar in blood circulation lead to complications. Hemoglobin testing (HbA_{1c}) help to diagnostic blood glucose over the past 2-3 months. Quality control of laboratories for quality, conformity and reliable results were factors that affects to diagnosis. The previous study, quality control materials hemolysis during transportation and not stable. The purpose of this research were produce high stability of quality control materials (QCM) and develop in vitro glycation method to produce high levels of HbA_{1c} easily and show stability more than previous with glycation tecniques. Quality control materials or processing whole blood from glycation was up grade be the same as commercial by fellowing ISO 17034 reference material producer.

Method; Two type of QCM were perform by using proper blood sample. First, QCM in CPDA-1, whole blood was washing with 0.85% normal saline 2-3 times and kept in CPDA-1 at 2-8 °C for homogeneity and stability test. Then, materials were sent to members participating in the research project more than 200 participants with 2 levels of HbA_{1c} materials. Whole blood materials were measured by Boronate affinity and immunoassay method to specified uncertainty of measurement. Second, QCM by *in vitro* glycations for glycated for whole blood were washed by 0.85% *normal saline* at pH 7.4. The sedimentation of RBC was incubated with 150 mM of D-glucose at 37 °C to produce HbA_{1c} approximately from 5.0-7.0% for 9 hours and 6.5-11.3% for 15 hours. After incubation, processed blood materials were wash and suspend in citrate-phosphate-dextrose-adenine-1(CPDA-1) solution at 2-8 °C. The homogeneity and stability of HbA_{1c} were investigated by following ISO 17034 and ISO Guide 35 guidelines.

Results: The homogeneity of HbA_{1c} for both methods were accepted with F cal < F critical by using ANOVA single factor analysis. HbA_{1c} in process blood materials was stable for at least 109 days with t cal < t critical by using statistics following ISO Guide 35 guidelines it more than original process of laboratories. The results of uncertainty from clinicals and laboratories members in first round, 2020 (n=132) were 1.86 (boronate affinity) and 1.89 (immunoassay) and second round (n=126) were 1.35 (boronate affinity) and 1.37 (immunoassay). There were show a closely of uncertainty from both method by our materials. The both analyzer show closely uncertainty of process blood material.

Conclusion: Processed blood materials for HbA_{1c} testing with boronate affinity and immunoassay could be prepared from original process represent a small and closely of uncertainty but stability was lower than glycation method. For study condition of *in vitro* glycation by incubation with D-glucose solution at pH 7.4 for 9 to 12 hours. Processed blood materials represented good performance with sufficient homogeneity and HbA_{1c} was stable for at least three months. Thus, these processed materials from *in vitro* glycation may be useful as QC material for HbA_{1c} testing in the future.

บทคัดย่อ

เบาหวานเป็นสภาวะที่ผู้ป่วยไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในระดับปกติได้ ส่งผลให้มีภาวะแทรกซ้อนตามมา การตรวจฮีโมโกลบิน (HbA_{1c}) ประเมินผลการควบคุมระดับกลูโคสในผู้ป่วยเบาหวานย้อนหลัง 2-3 เดือน การควบคุมคุณภาพห้องปฏิบัติการให้มีคุณภาพ ความถูกต้อง และให้ผลที่น่าเชื่อถือ ถือเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วย การใช้เลือดครบส่วนมาผลิตวัสดุควบคุมคุณภาพด้วยวิธีไกลเคชันในการผลิตวัสดุควบคุมคุณภาพ ในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าวัสดุควบคุมคุณภาพเกิดการแตกของเซลล์และไม่มีความคงตัวระหว่างการขนส่ง โครงการวิจัยนี้จึงต้องการการพัฒนากรรมวิธีในการเตรียมตัวอย่างฮีโมโกลบินเอวันซีอย่างง่ายที่ระดับสูง มีความคงตัวสูงด้วยวิธีที่ไกลเคชัน และยกระดับการผลิตวัสดุทดสอบให้มีคุณภาพเทียบเท่าวัสดุทดสอบประเภทเลือดครบส่วนที่นำเข้าตามมาตรฐาน ISO 17034 การผลิตวัสดุอ้างอิง

กระบวนการเตรียมจากห้องปฏิบัติการ จะใช้เลือดจากธนาคารเลือดที่มีปริมาณของฮีโมโกลบินเอวันซีน้อยกว่า 5.0% ใช้เตรียมในระดับต่ำ และปริมาณฮีโมโกลบินเอวันซีมากกว่า 6.5% ใช้เตรียมในระดับสูง เลือดจากถุงเลือดจะถูกล้างจำนวน 2-3 ครั้งด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ แล้วเก็บในสารละลาย CPDA-1 ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เพื่อรอการตรวจความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวของวัสดุทดสอบ หลังจากนั้นวัสดุทดสอบจำนวน 2 ระดับจะถูกส่งให้กับสมาชิกที่เข้าร่วมโครงการจำนวน 200 สมาชิก ด้วยการตรวจวิเคราะห์ด้วยหลักการ Boronate affinity และ Immunoassay เพื่อกำหนดค่าความไม่แน่นของการตรวจวัด วิธีการเตรียมแบบใหม่หรือกระบวนการไกลเคชันในหลอดทดลองเตรียมโดยการนำเลือดจากธนาคารเลือดปั่นล้าง นำส่วนของเซลล์เม็ดเลือดแดงบ่มกับน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 150 mM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 9 ชั่วโมงสำหรับการผลิตฮีโมโกลบินที่มีช่วงค่า 5.0-7.0% และนาน 15 ชั่วโมงสำหรับสำหรับการผลิตฮีโมโกลบินที่มีช่วงค่า 6.5-11.3% หลังการบ่ม วัสดุทดสอบจะถูกปั่นแยกเซลล์เม็ดเลือดแดงเก็บในสารละลาย CPDA-1 ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวตามข้อกำหนดตามมาตรฐานการผลิตวัสดุอ้างอิง ISO 17034 guide 35 วัสดุทดสอบที่เตรียมด้วยวิธีไกลเคชันจะนำไปใช้ประโยชน์จริงในปี 2563

การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของวัสดุทดสอบโดยใช้สถิติ ANOVA แบบ single factor เพื่อศึกษาค่า F จากการคำนวนมีค่าน้อยกว่า F ที่จุดวิกฤต (F cal < F critical) สำหระบการทดสอบความคงตัวพบว่า t จากการคำนวนมีค่าน้อยกว่า t ที่จุดวิกฤต (t cal < t critical) วัสดุมีความคงตัวนานถึง 109 วัน ซึ่งสูงกว่าวัสดุทดสอบที่เตรียมโดยวิธีเดิมจากห้องปฏิบัติการ ผลการศึกษาค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวัดสมาชิกจากคลินิคและโรงพยาบาลรอบที่ 1 จำนวน 132 แห่ง ให้ค่าความไม่แน่นอนจากการวัดด้วยหลักการ boronate affinity และ immunoassay 1.86 และ 1.89 ตามลำดับ รอบที่ 2 จำนวน 126 แห่ง ให้ค่าความไม่แน่นอนจากการวัดด้วยหลักการ boronate affinity และ immunoassay 1.35 และ 1.37 ตามลำดับ ผลการศึกษาค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ด้วยวัสดุทดสอบที่ผลิตขึ้นพบว่าวิธีการตรวจวัดทั้ง 2 วิธีให้ค่าความไม่แน่นอนที่ใกล้เคียงกันมาก

กระบวนการเตรียมวัสดุทดสอบด้วยวิธีเดิมจากห้องปฏิบัติการ จากการทดสอบหาปริมาณฮีโมโกลบินเอวันซีด้วยหลักการ boronate affinity และ immunoassay พบว่าค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวัดมีค่าต่ำและใกล้เคียงกันทั้งสองหลักการ แต่ความคงตัวต่ำยังคงกว่าการเตรียมด้วยวิธีไกลเคชัน สำหรับการศึกษาสภาวะการไกลเคชันในหลอดทดลอง โดยการบ่มกลูโคสที่ pH 7.4 เป็นเวลา 9-12 ชั่วโมง พบว่าวัสดุทดสอบจากการเตรียมด้วยวิธีดังกล่าวมีความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวนานกว่า 3 เดือน ดังนั้นการเตรียมด้วยกรรมวิธีการไกลชันจะสามารถนำไปใช้แทนวัสดุทดสอบที่เตรียมโดยวิธีเดิมจากห้องปฏิบัติการได้ในอนาคต

บทสรุปผู้บริหาร

โครงการ "การพัฒนาวัสดุทดสอบความชำนาญและวัสดุอ้างอิงชนิดเลือดและน้ำเหลืองสำหรับการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินเอวันซีและฟรุกโตซามินตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043 และ ISO 17034" รับเงินสนับสนุนโครงการวิจัยจำนวน 1,402,560.00 บาท จากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2563 จนถึง 31 มีนาคม 2563 โดยมี ดร.นภาพร อภิรัฐเมกุล เป็นหัวหน้าโครงการ และมีผู้ร่วมวิจัยร่วมคือ ผศ. ดร.วันวิสาข์ ตรีบุพชาติสกุล และ ดร.ครรชิต คงรส อาจารย์ประจำคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการผลิตวัสดุควบคุมคุณภาพฮีโมโกลบินเอวันซีและฟรุกโตซามิน ตามมาตรฐาน ISO 17034-Reference materials producer ณ ห้องปฏิบัติการวิจัยเครื่องมือแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร วัสดุทดสอบถูกนำไปต่อยอดการใช้งานจริงโดยความร่วมมือกับผู้ประกอบการร่วมบริษัท วี เมด แล็บ เซ็นเตอร์ จำกัด ในการจัดส่งให้กับสมาชิกที่เข้าร่วมโครงการ โครงการวิจัยประกอบด้วย 3 กิจกรรมหลัก ได้แก่ 1. การพัฒนากรรมวิธีการเตรียมวัสดุทดสอบฮีโมโกลบินเอวันซี เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการไกลเคชัน เนื่องจากการเตรียมด้วยสภาวะเดิมหรือการเตรียมด้วยวิธีจากห้องปฏิบัติการมักมีข้อจำกัดต่างๆ เช่น การเตรียมได้ยากในระดับที่มีปริมาณของฮีโมโกลบินสูงๆ จึงหันมาใช้กระบวนการไกลเคชันแทนในอนาคต 2. การกำหนดค่าวัสดุทดสอบ ค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวัด โดยการส่งวัสดุทดสอบที่ผลิตด้วยกรรมวิธีเดิมที่เตรียมจากห้องปฏิบัติการ ในการนำร่องจัดส่งให้สมาชิกกว่า 200 แห่ง ทั่วประเทศ ด้วยหลักการที่หลากหลายในตรวจวิเคราะห์วัสดุทดสอบ 3. การพัฒนาระบบการจัดส่งข้อมูลให้กับสมาชิก เพื่อให้สมาชิกที่เข้าร่วมโครงการสามารถรับ-ส่งข้อมูล ผลการตรวจ การดาวน์โหลดเอกสารจากศูนย์ทดสอบความชำนาญ เป็นไปอย่างสะดวก และรวดเร็ว เว็บไซต์จึงถูกพัฒนาขึ้น เพื่อง่ายต่อการดำเนินกิจกรรม

โดยในปี 2563 ทางคณะผู้วิจัยจะดำเนินการพัฒนาวัสดุควบคุมคุณภาพฮีโมโกลบินเอซีให้มีคุณภาพและคุณสมบัติที่ดียิ่งขึ้น และพัฒนาวัสดุทดสอบชนิดฟรุกโตซามินให้ได้คุณภาพตามมาตรฐาน ISO 17034 รวมถึงนำระบบจัดส่งข้อมูลที่พัฒนาขึ้นมาทดลองใช้กับสมาชิกที่เข้าร่วมโครงการ

หัวหน้าโครงการวิจัย

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	ก
บทสรุปผู้บริหาร	ค
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมา	1
จุดมุ่งหมายของการศึกษา	3
ขอบเขตของงานวิจัย	3
นิยามศัพท์เฉพาะ	4
สมมติฐานของงานวิจัย	4
สมมติฐานของการศึกษา	6
กรอบแนวคิดของโครงการวิจัย	6
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	8
-เบาหวาน (Diabetes mellitus, DM)	8
-ฮีโมโกลบินเอวันซี (Glycated hemoglobin, HbA_{1c})	9
-ฟรุกโตซามิน (Fructosamine) หรือ glycated protein	10
-การควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการ	10
-การผลิตวัสดุอ้างอิงตามมาตรฐานการผลิต ISO 17034 General requirements for the competence of reference material producers	15
-งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	16
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	21
การศึกษาที่ 1 การพัฒนากรรมวิธีการเตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c}	23
-ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง	23

- กิจกรรมการดำเนินโครงการ 23

การศึกษาที่ 2 เพื่อพัฒนาระบบการประเมินผลข้อมูลตามมาตรฐาน ISO 13528 สำหรับการตรวจวิเคราะห์ HbA_{1c} ผ่านเว็บไซต์อย่างเต็มรูปแบบ 30

-วิธีการดำเนินการ 30

บทที่ 4 ผลการศึกษา 32

การศึกษาที่ 1 การพัฒนากรรมวิธีการเตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c} 33

-ศึกษาอายุและคุณสมบัติตัวอย่างเลือดที่นำมาใช้ในการศึกษา 33

-การเตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ที่เตรียมจากเลือดในสารละลาย CPDA-1 34

-การเตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ที่เตรียมจากเลือดผ่านกระบวนการไกลเคชัน 35

-นำวัสดุทดสอบที่เตรียมได้ไปใช้ในโปรแกรมการทดสอบความชำนาญ 43

การศึกษาที่ 2 เพื่อพัฒนาระบบการประเมินผลข้อมูลตามมาตรฐาน ISO 13528 สำหรับการตรวจวิเคราะห์ HbA_{1c} ผ่านเว็บไซต์อย่างเต็มรูปแบบ 50

-Mockup โปรแกรมการทดสอบความชำนาญการตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c} 51

-Mockup โปรแกรมการทดสอบความชำนาญการตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c} 52

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย 53

บรรณานุกรม 61

ประวัตินักวิจัยในโครงการ 60

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการมีความสำคัญในการช่วยแพทย์นำผลที่ได้มาวินิจฉัยโรค ติดตามผลการรักษาผู้ป่วย ป้องกันและควบคุมโรค รวมถึงการตรวจสุขภาพประจำปี การตรวจทางห้องปฏิบัติการเหล่านี้ ได้แก่ การตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิก โลหิตวิทยา งานภูมิคุ้มกันวิทยา จุลชีววิทยา และ ธนาคารเลือด รวมทั้งการทดสอบ ณ จุดดูแลผู้ป่วยเป็นต้น โดยการตรวจดังกล่าวต้องมีความน่าเชื่อถือจึงจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุณภาพภายใน หรือ ประจำวัน (Internal quality control, IQC) และการควบคุมคุณภาพด้วยองค์กรภายนอก (External quality assurance, EQA) หรือ Proficiency testing (PT)

ในการทำ IQC นั้น ผู้ใช้งานต้องทำทุกวันก่อนตรวจวัดสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย โดยใช้วัสดุควบคุมคุณภาพ (In kit control material) เมื่อ IQC ผ่านแล้วถึงจะทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างจากผู้ป่วยได้ นอกจากนี้ยังต้องทำการควบคุมคุณภาพห้องปฏิบัติการโดยองค์กรภายนอก หรือ EQA หรือ PT Provider โดยทางห้องปฏิบัติการจะต้องเข้าร่วมเป็นสมาชิกกับองค์กรภายนอก และองค์กรภายนอกจะทำหน้าที่เป็นผู้ดำเนินการ (PT Provider) เพื่อส่งตัวอย่างทดสอบ (PT item) ให้กับสมาชิกเพื่อทำการตรวจวัดเสมือนตัวอย่างผู้ป่วยจริง โดยที่สมาชิกไม่ทราบค่า และส่งผลตรวจกลับไปยัง PT Provider เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ และแจ้งผลการประเมินแก่สมาชิกต่อไป

PT Provider ในประเทศไทยที่ผ่านการรับรองมาตรฐานสากล ISO/IEC 17043-Proficiency testing ในการตรวจทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ได้แก่ กรมวิทยาศาสตร์ เพียงแห่งเดียว ซึ่งมีข้อจำกัดในการรับสมาชิกยังไม่ครอบคลุมห้องปฏิบัติการทั้งหมดในประเทศไทย และยังไม่มีการให้บริการในส่วนการทดสอบ ณ จุดดูแลผู้ป่วย ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043: 2012 สำหรับ Proficiency testing มีข้อกำหนดสำคัญคือ ตัวอย่างทดสอบต้องมีความเป็นเนื้อเดียวกันและมีความคงตัวเพียงพอต่อเวลาที่กำหนด เพื่อให้สมาชิกสามารถตรวจวัดได้อย่างถูกต้อง ดังนั้นตัวอย่างทดสอบต้องทนต่อสภาวะสิ่งแวดล้อมในขณะขนส่ง

วัสดุที่ใช้ใน PT ในประเทศไทยนั้น ส่วนใหญ่จะสั่งซื้อจากต่างประเทศซึ่งมีข้อจำกัด คือ ราคาแพง วันหมดอายุสั้น และเสื่อมสภาพขณะขนส่ง ทำให้การดำเนินการ PT Provider มีค่าใช้จ่ายสูง และยังขาดวัสดุทดสอบประเภทเลือดครบซึ่งทำได้ยากกว่าน้ำเหลือง นอกจากนี้วัสดุทดสอบ ต้อง

เสมือนตัวอย่างจริงที่ใช้ในการตรวจประจำวันตามที่ International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC) ได้แนะนำไว้

ในประเทศไทยมีรายงานพบผู้ป่วยเบาหวานจำนวน 1,050 รายต่อแสนราย ในปี พ.ศ. 2555 และพบว่าผู้ป่วยเบาหวานร้อยละ 70 ไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลให้อยู่ในเกณฑ์ได้ ซึ่งส่งผลให้ผู้ป่วยเบาหวานมีภาวะแทรกซ้อนตามมา เช่น โรคความดันโลหิต โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด และโรคหลอดเลือดสมอง ซึ่งจัดเป็นโรคเรื้อรังที่เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย การมีระดับกลูโคสสูงกว่าปกติในเลือดจะบ่งชี้โรคเบาหวานแต่การตรวจระดับกลูโคสในเลือดอาจไม่เพียงพอ เนื่องจากระดับน้ำตาลสามารถแปรเปลี่ยนไปตามปัจจัยต่างๆได้ จึงมีการตรวจ HbA_{1c} เพื่อช่วยในการวินิจฉัย ติดตามผลการรักษาหรือประเมินผลการควบคุมระดับกลูโคสในผู้ป่วยเบาหวานย้อนหลัง 2-3 เดือน ถึงแม้การตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c} มีข้อดีกว่าการตรวจวัดน้ำตาล แต่มีข้อจำกัดในผู้ป่วยเบาหวานที่เป็นโรคเลือด เช่น โลหิตจางธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ ที่เข้ามารับการตรวจวินิจฉัยเบาหวานและติดตามการรักษาระดับน้ำตาลในเลือดเป็นจำนวนมาก แพทย์จึงมักส่งตรวจวัดปริมาณฟรุกโตซามิน ทดแทนการตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c}

ซึ่งการตรวจวิเคราะห์ระดับน้ำตาล ณ จุดดูแลผู้ป่วยและน้ำตาลสะสมย้อนหลัง 2-3 เดือน หรือ HbA_{1c} ต้องมีการควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ เนื่องจากวัสดุทดสอบที่ใช้ใน PT-HbA_{1c} ควรมีลักษณะเหมือนเลือดมนุษย์ตามที่ International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC) ได้แนะนำไว้ ในการใช้เลือดครบส่วนมาเป็นวัสดุ ซึ่งเม็ดเลือดแดงหลังจากเจาะออกจากร่างกายยังคงมีชีวิต ต้องการพลังงานและมีอายุสั้นเพียง 120 วันเท่านั้น เซลล์เม็ดเลือดแดงสามารถเกิดการแตกได้ง่ายระหว่างการขนส่ง จึงต้องการการพัฒนากรรมวิธีในการเตรียมตัวอย่างเลือดเพื่อรักษาความคงตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดง เพื่อให้มีปริมาณ HbA_{1c} ที่คงที่ สามารถกำหนดค่าหรือระดับได้ ทนต่อสภาวะในขณะขนส่ง ตรวจวิเคราะห์ได้ทุกหลักการ และมีคุณภาพเทียบเท่าวัสดุทดสอบประเภทเลือดครบส่วนที่นำเข้าจากต่างประเทศ

งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า การเตรียมวัสดุทดสอบจากตัวอย่างเลือดที่ได้รับจากธนาคารเลือดหรือผู้ป่วยเบาหวานนั้น ไม่สามารถเตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ในระดับสูงได้ เนื่องจากมีข้อจำกัดของการเจาะเก็บเลือดในปริมาณสูงมาก การเตรียมโดยวิธีการใช้เลือดจากผู้ป่วยหลายๆรายรวมกันส่งผลให้เซลล์เม็ดเลือดแดงเกิดการแตก ค่าความคงตัวของวัสดุทดสอบลดลง เกิดปัญหาระหว่างการขนส่ง นักวิจัยจึงหันมาออกแบบและพัฒนากรรมวิธีการเตรียมวัสดุทดสอบด้วยเทคนิคการไกลเคชันในหลอดทดลอง โดยอาศัยการจับของน้ำตาลกลูโคสบนสายเบต้าของฮีโมโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดงในสภาะที่เหมาะสมในหลอดทดลอง และเกิดไกลเคทฮีโมโกลบินเกิดขึ้น วัสดุทดสอบที่เตรียมขึ้น ผ่านการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวตามมาตรฐานการผลิตวัสดุอ้างอิง ISO 17034

จุดมุ่งหมายของการศึกษา

1. เพื่อพัฒนากรรมวิธีการเตรียมตัวอย่างเลือดในหลอดทดลองสำหรับตรวจวัดฮีโมโกลบินเอวันซี
2. เพื่อพัฒนากรรมวิธีการเตรียมน้ำเหลืองในหลอดทดลองสำหรับใช้ตรวจวัดปริมาณฟรุกโตซามิน
3. เพื่อพัฒนาและกำหนดวัสดุอ้างอิง (Reference material) สำหรับการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินเอวันซีตามมาตรฐาน ISO 17034
4. เพื่อพัฒนาระบบการประเมินผลข้อมูลตามมาตรฐาน ISO 13528 สำหรับการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินเอวันซีผ่านเว็บไซต์อย่างเต็มรูปแบบ

ขอบเขตของงานวิจัย

พัฒนากรรมวิธีการเตรียมตัวอย่างเลือดและน้ำเหลืองในหลอดทดลองสำหรับใช้ตรวจวัด HbA_{1c} และปริมาณของฟรุกโตซามิน โดยการหาสภาวะสารตั้งต้นและวิธีการที่เหมาะสมในการไกลเคชั่นระหว่างน้ำตาลหรือเมตาบอไลท์ของน้ำตาลกับฮีโมโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดง (Intact red blood cell) มนุษย์ และการพัฒนากรรมวิธีการเตรียมฟลุคโตซามินในน้ำเหลืองด้วยการไกลเคชั่นระหว่างน้ำตาลหรือเมตาบอไลท์ของน้ำตาลกับอัลบูมินในพลาสมา

พัฒนาและกำหนดวัสดุอ้างอิง (Reference material) สำหรับการตรวจวิเคราะห์ HbA_{1c} และตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043 โดยทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity) และความคงตัว (Stability) ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043: 2012 ใช้สถิติตามที่ ISO 13528: 2016 ตามกำหนดไว้ และเปรียบเทียบค่ากับวิธีมาตรฐานและวิธีระดับ definitive method ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043 และหาความสัมพันธ์ของผลการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ HbA_{1c} ด้วยสถิติต่างๆของการตรวจทางห้องปฏิบัติการประเภทต่างๆ ใน 200 สมาชิก

พัฒนาระบบการประเมินผลข้อมูลผ่านเว็บไซต์ โปรแกรมทดสอบความชำนาญการตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c} ปันการต่อยอดระบบเว็บไซต์ จากระบบเว็บไซตสำหรับโปรแกรมทดสอบความชำนาญการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลในเลือดด้วยเครื่องตรวจแบบพกพา มาพัฒนาใช้กับโปรแกรมทดสอบความชำนาญการตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c} มีการออกแบบหน้าเว็บไซต์การพัฒนาวัสดุทดสอบความชำนาญและวัสดุอ้างอิงชนิดน้ำเหลืองสำหรับการตรวจวิเคราะห์ HbA_{1c} ตามมาตราฐาน ISO/IEC 17043 และ ISO 17034 การนำเข้าข้อมูล การรวบรวมผลได้เป็น PDF File การออกแบบหน้าเว็บไซต์การพัฒนาวัสดุทดสอบความชำนาญและวัสดุอ้างอิงชนิดน้ำเหลืองสำหรับการตรวจวิเคราะห์ฟรุกโตซามินตามมาตราฐาน ISO/IEC 17043 และ ISO 17034 การส่งรายงานผลการวิเคราะห์ ออกรายงานให้ผู้ใช้และระบบวิเคราะห์ข้อมูล เพื่อให้สะดวกและรวเร็วต่อผู้เข้ารับบริการ

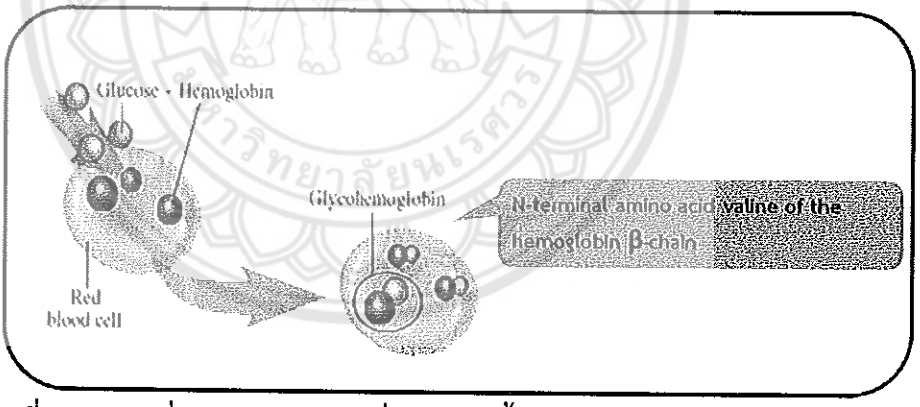
นิยามศัพท์เฉพาะ

การควบคุมคุณภาพภายใน ไกลเคชัน วัสดุอ้างอิง เลือดครบส่วน ความคงตัว ความเป็นเนื้อเดียวกัน

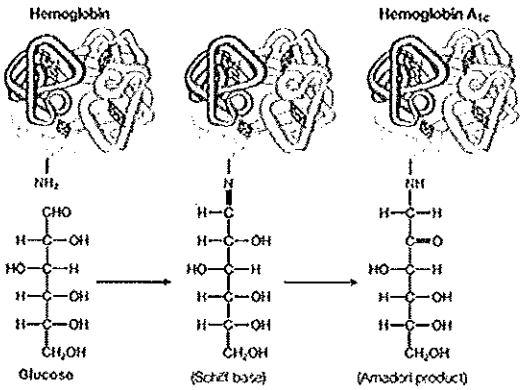
สมมติฐานของการวิจัย

ทฤษฎี

การตรวจน้ำตาลและ HbA_{1c} มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นตามจำนวนผู้ป่วยเบาหวานที่เพิ่มมากขึ้นทั่วโลก รวมทั้งในผู้ที่ยังไม่เป็นโรคเนื่องจากในปัจจุบันพบว่ามีผู้สนใจในเรื่องสุขภาพมากขึ้น ผลตรวจที่ได้ควรมีความแม่นยำ และเชื่อถือได้จึงจะเกิดประโยชน์สูงสุดของการนำไปใช้ HbA_{1c} คือ ฮีโมโกลบินที่มีน้ำตาลเกาะอยู่บนสายกลอบบินชนิดเบต้าของเม็ดเลือดแดง เนื่องจากเม็ดเลือดแดงประกอบ ด้วยฮีโมโกลบินหลากหลายชนิด ซึ่งส่วนมากเป็นฮีโมโกลบินเอ โดยภายในฮีโมโกลบินมีฮีมและกลอบบินอยู่ภายใน หลังจากคลอดแล้วกระดูกจะสร้าง กลอบบินชนิดแอลฟาและเบต้าจำนวนมากขึ้น HbA_{1c} เป็นการตรวจการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดย้อนหลัง 2-3 เดือน ของผู้ป่วยโรคเบาหวาน และมีความแปรปรวนจากอาหารที่รับประทานน้อยกว่าการตรวจวัดน้ำตาลในเลือด



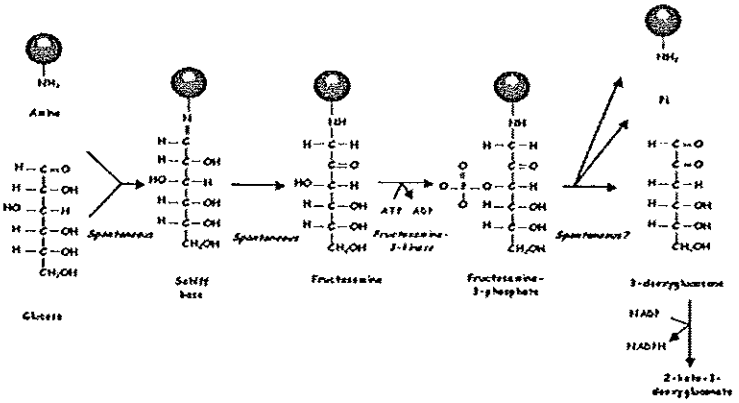
ภาพที่ 1 HbA_{1c} ที่เกิดจากการไกลเคชั่นระหว่างน้ำตาลกลูโคสและฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (Source: American Diabetes Association (ADA) V. Diabetes Care. *Diabetes Care* 2013; 36 (suppl 1): S19)



ภาพที่ 2 การเกิดไกลเคชั่นระหว่างน้ำตาลกลูโคสและฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงจนได้ Amadori product ซึ่งเป็นปฏิกิริยาแบบ irreversible (Source: http://www.medicographia.com/wp-content/uploads/2009/12/46.jpg)

ในผู้ที่มีฮีโมโกลบินผิดปกติ การตรวจ HbA_{1c} บางหลักการอาจให้ค่า HbA_{1c} ที่ไม่ถูกต้องทั้งในทิศทางที่สูงหรือต่ำกว่าความเป็นจริง โดยฮีโมโกลบินที่ผิดปกติจะทำให้อายุเฉลี่ยของเม็ดเลือดแดงสั้นลง แพทย์จึงมักส่งตรวจวัดปริมาณฟรุกโตซามิน หรือ glycated albumin ทดแทนการตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c}

ฟรุกโตซามินเป็นน้ำตาลที่จับกับโปรตีนในน้ำเหลือง หรือเป็นการวัดระดับโปรตีนในเลือดที่มีน้ำตาลเกาะ (glycated serum protein) โปรตีนดังกล่าวคือ อัลบูมิน เนื่องจากอัลบูมินมีอายุครึ่งชีวิต เท่ากับ 20 วัน ดังนั้น ฟรุกโตซามินจึงมีอายุ 20 วันตามอายุของอัลบูมิน จึงสามารถใช้บ่งชี้ระดับน้ำตาลในเลือดในช่วงเวลาเพียง 1-2 สัปดาห์ จากข้อจำกัดของการตรวจวัด HbA_{1c} ทำให้การตรวจวัดฟรุกโตซามิน ช่วยติดตามระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวานที่เป็นโรคเลือดทดแทน HbA_{1c}



ภาพที่ 3 ฟรุกโตซามินที่เกิดจากการไกลเคชั่นระหว่างน้ำตาลกลูโคสและโปรตีนในพลาสมา (Source: https://www.slideshare.net/shrekym/fructosamine-and-hg-a1c)

สมมุติฐานของการศึกษา

วัสดุทดสอบและวัสดุอ้างอิงสำหรับการตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c} และฟรุกโตซามินที่เตรียมได้จากเลือดและน้ำเหลืองในหลอดทดลองด้วยกรรมวิธีที่คิดค้นขึ้น มีคุณสมบัติตามมาตรฐาน ISO 17034 และISO/IEC 17043 สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในโปรแกรมทดสอบความชำนาญทางการแพทย์ ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043

กรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

การควบคุมคุณภาพทางห้องปฏิบัติการมีความสำคัญต่อการตรวจวิเคราะห์ผลของผู้ป่วย โดยทางห้องปฏิบัติการมีการควบคุมคุณภาพโดยวัสดุทดสอบที่นำเข้าจากต่างประเทศ เนื่องจากว่าขาดแคลนวัสดุทดสอบควบคุมคุณภาพบางรายการตรวจวิเคราะห์ที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งจะประสบปัญหาทั้งด้านระยะเวลาในการขนส่ง อายุของวัสดุทดสอบและราคาสูง เนื่องจากว่าวัสดุทดสอบที่มีภายในประเทศไทยยังคงต้องมีการพัฒนากรรมวิธีการเตรียมตัวอย่างทดสอบที่ใช้ในการทดสอบความชำนาญ หรือ proficiency testing ให้ครอบคลุมการตรวจวิเคราะห์ ณ จุดดูแลผู้ป่วยและการตรวจทางห้องปฏิบัติ เพื่อให้มีมาตรฐานตาม ISO/IEC 17043 และมีคุณภาพเทียบเคียงกับตัวอย่างนำเข้าจากต่างประเทศ จึงมีแนวคิดในการพัฒนากรรมวิธีการเตรียมวัสดุทดสอบให้เป็นไปตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043 โดยเตรียมวัสดุทดสอบจากวัตถุดิบที่มีในประเทศไทย สามารถนำผลิตภัณฑ์มาใช้ในประเทศไทย ราคาไม่แพง ลดการนำเข้า และสามารถผลิตสินค้าที่มีมาตรฐานส่งออกจำหน่ายในประเทศกลุ่มอาเซียน รวมถึงการจำหน่ายแบบแข่งขันได้ทั่วโลกได้ รวมทั้งวิจัยพัฒนาร่วมกับผู้ประกอบการเพื่อการนำมาใช้ประโยชน์อย่างเป็นรูปธรรม และยกระดับความเป็นศูนย์ให้บริการการทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการที่มีความโดดเด่นระดับภูมิภาคอาเซียน

กรอบแนวคิด (Conceptual Framework)

In put	Process	Out put
• คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร • ศูนย์ทดสอบความชำนาญฯ NUMLC บริษัท วี เมด แล็บ เซ็นเตอร์ จำกัด	กิจกรรมที่ 1 "การพัฒนากรรมวิธีการเตรียมตัวอย่างเลือดในหลอดทดลองสำหรับการตรวจ HbA_{1c}" กิจกรรมที่ 2 "พัฒนากรรมวิธีการเตรียมน้ำเหลืองในหลอดทดลองสำหรับการตรวจวัดปริมาณฟรุกโตซามิน" กิจกรรมที่ 3 "พัฒนาและกำหนดวสดุอ้างอิง (Reference material) สำหรับการตรวจวิเคราะห์ HbA_{1c} ตามมาตรฐาน ISO 17034" กิจกรรมที่ 4 "พัฒนาระบบการประเมินผลข้อมูลตามมาตรฐาน ISO 13528 สำหรับการตรวจวัด HbA_{1c} ผ่านเว็บไซต์อย่างเต็มรูปแบบ"	• ลดค่าใช้จ่ายในการกำจัดเลือด (infectious waste) ที่หมดอายุหรือไม่ได้มาตารฐาน • ได้วัสดุทดสอบที่ผลิตตามมาตรฐาน ISO 17034 • วัสดุอ้างอิงที่ผลิตสามารถใช้ได้กับทุกหลักกการทดสอบ • ได้วัสดุอ้างอิงที่ผลิตขึ้นภายในประเทศลดการนำเข้า และสามารถนำไปใช้ในการประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการทั่วประเทศ

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

1. เบาหวาน (Diabetes mellitus, DM) [1,2,3]

เบาหวานเป็นโรคที่เกี่ยวกับภาวะเมตาบอลิสมในร่างกาย จากการขาดฮอร์โมนอินซูลิน หรือการทำหน้าที่ของอินซูลินที่บกพร่อง ส่งผลให้ระดับน้ำตาลในกระแสเลือดสูง เนื่องจากฮอร์โมนอินซูลินมีหน้าที่ในการควบคุมระดับน้ำตาลโดยเปลี่ยนน้ำตาลให้อยู่ในรูปไกลโคเจนที่กล้ามเนื้อและตับ ดังนั้นเมื่อฮอร์โมนอินซูลินมีความบกพร่องจึงไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลได้ ส่งผลให้เกิดความผิดปกติในระบบเมตาบอลิสมของร่างกาย อีกทั้งยังเกิดภาวะแทรกซ้อน และความล้มเหลวในอวัยวะต่างๆ นำไปสู่การเกิดไตวาย ตาบอด ระบบประสาท หัวใจและหลอดเลือดส่วนปลายตีบตันและติดเชื้อลุกลามเป็นแผลเรื้อรัง ปี พ.ศ. 2555 ในประเทศไทยมีรายงานพบผู้ป่วยเบาหวานจำนวน 1,050 รายต่อแสนราย โดยสำนักงานโรคไม่ติดต่อ กรมควบคุมโรค และพบผู้ป่วยเบาหวานร้อยละ 70 ไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลให้อยู่ในเกณฑ์ส่งผลให้ผู้ป่วยเบาหวานมีภาวะแทรกซ้อนตามมา ในปี ค.ศ. 2008 พบว่า โรคหลอดเลือดและสมองเป็นสาเหตุให้คนเสียชีวิตทั่วโลกราว 17.3 ล้านคน และคาดว่าจะมีผู้เสียชีวิตเพิ่มเป็น 20.3 ล้านคนต่อปีในปี ค.ศ. 2030 สำหรับประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2555 พบผู้ป่วยโรคความดันโลหิตสูง (Hypertension) จำนวน 1570 รายต่อแสนราย โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (Myocardial infarction) จำนวน 228 รายต่อแสนราย และโรคหลอดเลือดสมอง (Stroke) จำนวน 355 รายต่อแสนราย ทำให้การตรวจน้ำตาลและ HbA_{1c} มีความสำคัญและมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นตามจำนวนผู้ป่วยเบาหวานที่เพิ่มมากขึ้นทั่วโลก รวมทั้งในผู้ที่ยังไม่เป็นโรคเนื่องจากในปัจจุบันพบว่ามีผู้สนใจในเรื่องสุขภาพมากขึ้น ผลตรวจที่ได้ควรมีความแม่นยำ และเชื่อถือได้จึงจะเกิดประโยชน์สูงสุดของการนำไปใช้

2. ฮีโมโกลบินเอวันซี (Glycated hemoglobin, HbA_{1c}) [4,5,6]

ฮีโมโกลบินเอวันซี คือ ฮีโมโกลบินที่มีน้ำตาลเกาะอยู่บนสายกลอบบินชนิดเบต้าของเม็ดเลือดแดง เนื่องจากเม็ดเลือดแดงประกอบด้วยฮีโมโกลบินหลากหลายชนิด ซึ่งส่วนมากเป็นฮีโมโกลบินเอ โดยภายในฮีโมโกลบินมีฮีมและกลอบบินอยู่ภายใน โดย HbA_{1c} เป็นการตรวจการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดย้อนหลัง 2-3 เดือน ของผู้ป่วยโรคเบาหวาน ซึ่งเกณฑ์สมาคมเบาหวานแห่งสหรัฐอเมริกา ค.ศ. 2017 ระดับ HbA_{1c} ของผู้ป่วยเบาหวานควรควบคุมให้ค่าน้อยกว่าร้อยละ 7 แต่สำหรับผู้ป่วยบางคนรายควรน้อยกว่า ร้อยละ 6 เพื่อให้ใกล้เคียงกับคนปกติมากที่สุด การตรวจวัด HbA_{1c} สามารถเก็บเลือดได้ไม่ต้องอดอาหาร ถึงแม้การตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c} มีข้อดีกว่าการตรวจวัดน้ำตาล แต่มีข้อจำกัดในผู้ป่วยเบาหวานที่เป็นโรคเลือด เช่น โลหิตจางธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ ขณะเดียวกันอุบัติการณ์การเกิดโรคเบาหวานในประเทศไทยที่พบเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยในปี พ.ศ.2555 โรคเบาหวานมีอุบัติการณ์สูงถึง 868 คนต่อประชากรไทย 100,000 คน เป็นผลให้ผู้ป่วยที่เป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติเข้ามารับการตรวจวินิจฉัยเบาหวานและติดตามการรักษาระดับน้ำตาลในเลือดเป็นจำนวนมากขึ้น

โดยทั่วไปการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ HbA_{1c} มีหลายหลายวิธี สามารถแบ่งออกเป็น 2 หลักการ โดยแยกตามความแตกต่างของประจุและแยกตามความแตกต่างของโครงสร้าง การแยกตามประจุได้แก่ หลักการ High performance liquid chromatography (HPLC) และ capillary electrophoresis (CE) และอาศัยการแตกตามความแตกต่างของโครงสร้าง ได้แก่ หลักการ immunoassay และ boronate affinity ปัจจุบันองค์กรมาตรฐานสากล “The International Federation of Clinical Chemistry” หรือ IFCC ได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดด้วย HPLC-mass spectrometry and HPLC-capillary electrophoresis ในการตรวจหาปริมาณ HbA_{1c} และ HbA_0 เพื่อใช้ในการการหาสัดส่วนของ HbA_{1c} ในตัวอย่างเลือด ซึ่งจะรายงานผลในหน่วยของ mmol ซึ่งการรายงานผลในหน่วยของ mmol สามารถทวนสอบ (traceable) ของวัสดุทดสอบกลับไปยังหน่วยมาตรฐานสากล หรือ Standard International Unit (SI unit) และองค์กร “National Glycohemoglobin Standardization Program” หรือ NGSP มักจะรายงานปริมาณ HbA_{1c} ในตัวอย่างเลือดในหน่วย % (David BS, 2012)

อย่างไรก็ตามการตรวจหาปริมาณ HbA_{1c} ในผู้ป่วยยังมีข้อจำกัดในผู้ป่วยที่มีสภาวะของร่างกายที่มีความผิดปกติของเซลล์เม็ดเลือดแดง เช่นผู้ป่วยธาลัสซีเมีย เป็นต้น ซึ่งผู้ที่มีฮีโมโกลบิน

ผิดปกติจะทำให้การตรวจ HbA_{1c} บางหลักการอาจให้ค่า HbA_{1c} ที่ไม่ถูกต้องทั้งในทิศทางที่สูงหรือต่ำกว่าความเป็นจริง ทำให้ได้รับการรักษาที่สูงหรือต่ำกว่าความเป็นจริง เนื่องจากบางหลักการตรวจให้ค่า HbA_{1c} ที่ไม่ถูกต้อง ถ้าผู้ป่วยมีฮีโมโกลบินผิดปกติแฝงอยู่ และส่งผลให้อายุเฉลี่ยของเม็ดเลือดแดงสั้นลง แพทย์จึงมักส่งตรวจวัดปริมาณฟรุกโตซามิน หรือ glycated albumin ทดแทนการตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c}

3. **ฟรุกโตซามิน (Fructosamine) หรือ glycated protein [7,8,9]**

Fructosamine เป็นน้ำตาลที่จับกับโปรตีนในน้ำเหลือง หรือเป็นการวัดระดับโปรตีนในเลือดที่มีน้ำตาลเกาะ (glycated serum protein) โปรตีนดังกล่าวคือ อัลบูมิน เนื่องจากอัลบูมินมีอายุครึ่งชีวิตเท่ากับ 20 วัน ดังนั้น fructosamine จึงมีอายุ 20 วันตามอายุของอัลบูมิน จึงสามารถใช้บ่งชี้ระดับน้ำตาลในเลือดในช่วงเวลาเพียง 1-2 สัปดาห์ จากข้อจำกัดของการตรวจวัด HbA_{1c} ทำให้การตรวจวัด fructosamine ช่วยติดตามระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวานที่เป็นโรคเลือดทดแทนการตรวจ HbA_{1C}

ในปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณฟรุกโตซามิน สามารถตรวจได้จากการตรวจความเข้มของสีด้วยวิธี nitroblue tetrazolium (NBT) หลักการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณไกลเคทโปรตีนด้วยวิธีต่างๆดังต่อไปนี้ (Verena Gounden; 2017)

- Enzymatic assay
- High-performance liquid chromatography (HPLC) and affinity chromatography
- Immunoassay, including quantification by radioimmunoassay
- Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
- Enzyme-linked boronate immunoassay (ELBIA)
- Colorimetry
- Electrochemical

4. **การควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ [11,12]**

การตรวจทางห้องปฏิบัติการมีความสำคัญในการช่วยแพทย์นำผลที่ได้มาช่วยในการวินิจฉัยโรค และยืนยันผลการวินิจฉัย ติดตามผลการรักษาผู้ป่วย การป้องกันควบคุมโรค การตรวจทางห้องปฏิบัติการจึงต้องมีคุณภาพ มีความน่าเชื่อถือ จึงจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วย

ได้ ดังนั้นห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ต้องมีการควบคุณภาพภายในประจำวัน (Internal quality control, IQC) และการควบคุมคุณภาพด้วยองค์กรภายนอก (External quality assurance, EQA) หรือ Proficiency testing (PT)

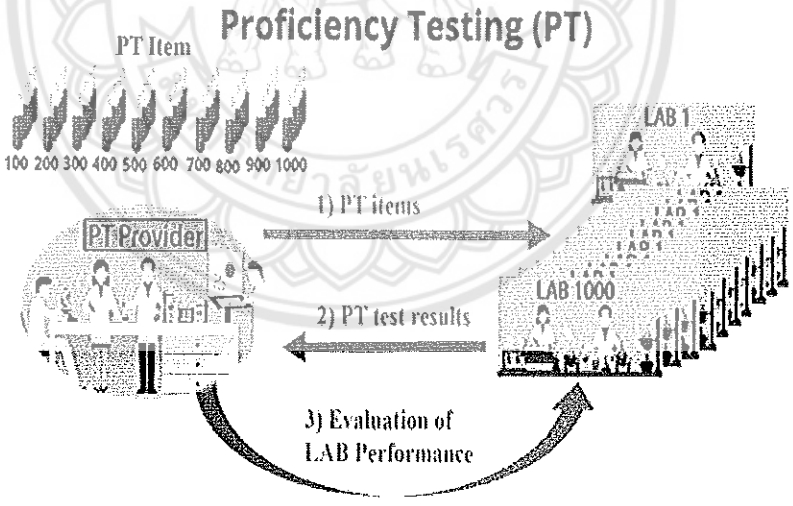
ในการทำ IQC นั้น ทางบริษัทผู้ผลิตน้ำยาจะมีวัสดุควบคุมคุณภาพ (In kit control material) ให้ผู้ใช้งานในการทดสอบก่อน หากผ่านถึงจะสามารถนำตัวอย่างจากผู้ป่วยไปทำการตรวจวัดได้ ในการทดสอบจะทดสอบทุกวันซ้ำๆกัน ดังนั้นในการทำ IQC สามารถบ่งชี้ถึง precision ของการวิเคราะห์สารนั้น สำหรับ EQA หรือ PT ทางห้องปฏิบัติการจะต้องเข้าร่วมสมาชิกกับองค์กรภายนอก โดยองค์กรภายนอก จะทำหน้าที่ เป็น PT Provider ทำหน้าที่ส่งตัวอย่างทดสอบ (PT item) ไปให้สมาชิกทำการตรวจวัดโดยสมาชิกจะตรวจวัดเสมือนตัวอย่างจากผู้ป่วย และส่งผลตรวจที่ได้กลับไปให้ PT Provider ทำการตรวจวิเคราะห์และแจ้งผลการประเมินให้แก้สมาชิกต่อไป

การควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ HbA_{1c} ประเภท EQA ในประเทศไทยยังไม่แพร่หลายนัก เนื่องจากวัสดุทดสอบที่ใช้ใน EQA ควรเสมือนที่ใช้จริงในการตรวจประจำวันตามที่ International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC) ได้แนะนำไว้ แต่วัสดุทดสอบประเภทเลือดครบส่วนนี้ทำได้ยากกว่าวัสดุควบคุมคุณภาพประเภทน้ำเหลือง เพราะเม็ดเลือดเป็นสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะเม็ดเลือดแดงมีปริมาณมากกว่าเม็ดเลือดชนิดอื่นๆ ต้องการน้ำตาลในพลาสมาเพื่อนำไปใช้เป็นพลังงานผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส (Glycolysis pathway) ร่วมทั้งเม็ดเลือดมนุษย์มีลักษณะเฉพาะ และไม่มีนิวเคลียส จึงไม่มีการสร้างโปรตีนหรือเอนไซม์เมื่อโตเต็มวัย ทำให้มีอายุ 120 และถูกจับกินในร่างกาย หรือแตกในหลอดทดลองเมื่ออยู่ในภาวะที่ไม่เหมาะสม จึงทำให้วัสดุทดสอบมีอายุสั้นและราคาแพง เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการนำเข้าวัสดุทดสอบ เพื่อใช้ในโปรแกรมทดสอบความชำนาญ เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการนำเข้าวัสดุทดสอบจากต่างประเทศ เนื่องจากมีอายุสั้นและราคาสูง จึงต้องมีการเตรียมวัสดุทดสอบความชำนาญจากเลือดผู้ป่วยเบาหวาน เช่นเดียวกับกับศูนย์ทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการทางการแพทย์เอ็นยู เอ็มแอลซี (NU MLC Center for Proficiency Testing) แต่การเตรียมด้วยวิธีนี้มีข้อจำกัดในการกำหนดค่าของ HbA_{1c} เนื่องจากต้องให้เป็นไปตามปริมาณที่พบในเลือดผู้ป่วยที่นำมาใช้ รวมทั้งปริมาณที่ได้มีข้อจำกัด จากหลายการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยเบาหวานโดยเฉพาะในกลุ่มที่เป็น Poor control ซึ่งมี HbA_{1c} ในระดับสูง จะแตกง่ายเนื่องจากสูญเสียคุณสมบัติ Deformality มีการเปลี่ยนแปลงทางด้านขนาดและรูปร่าง ดังนั้นในการนำเลือดผู้ป่วยเบาหวานมาใช้ จึงมักพบปัญญาหาเม็ดเลือดแดงแตกในขณะขนส่ง

การประเมินผลการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (Evaluation of Proficiency Testing) การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการของผู้รับบริการที่เข้าร่วมโปรแกรมการทดสอบความ ชำนาญห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ โดยกำหนดให้ผู้รับบริการรายงานผลการตรวจวิเคราะห์วัสดุทดสอบความชำนาญ กลับมาที่ เอ็นยู เอ็มแอลซี ศูนย์ทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และใช้การวิเคราะห์ทาง สถิติทำการประเมินผลการทดสอบความชำนาญ ซึ่งปฏิบัติตามมาตรฐาน ISO 13528: 2015 และ ISO/IEC 17043: 2010 เพื่อให้ได้มาซึ่งค่าเฉลี่ยพ้องกลุ่ม (Robust mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานพ้องกลุ่ม (Robust standard deviation) และความไม่แน่นอนของข้อมูลการวิเคราะห์ (Standard uncertainty) แล้วจึงนำค่าดังกล่าว ทำการประเมินผลการทดสอบความชำนาญโดยการคำนวณหาคะแนนมาตรฐาน โดยมีเกณฑ์การประเมินดังนี้

เมื่อ u_x (Standard uncertainty) ≤ 0.3 σ_{pt} จะทำการประเมินด้วย z score หรือ

u_x (Standard uncertainty) > 0.3 σ_{pt} จะทำประเมินด้วย z' score



ภาพที่ 4 ระบบการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

สูตรคะแนนมาตรฐาน z score ในการคำนวณทางสถิติในการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

$$z = (X_i - X_{pt}) / \sigma_{pt}$$

X_i = ค่าการตรวจวิเคราะห์วัสดุทดสอบความชำนาญรายงานจากผู้รับบริการที่เข้าร่วมโปรแกรม

X_{pt} = ค่าเฉลี่ยของกลุ่ม (Robust mean)

σ_{pt} = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในการประเมินความสามารถ (Robust standard deviation)

สูตรคะแนนมาตรฐาน z' score ในการคำนวณทางสถิติในการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

$$z' = \frac{X_i - X_{pt}}{\sqrt{\sigma_{pt}^2 + u^2(X_{pt})}}$$

X_i = ค่าการตรวจวิเคราะห์วัสดุทดสอบความชำนาญรายงานจากผู้รับบริการที่เข้าร่วมโปรแกรม

X_{pt} = ค่าเฉลี่ยของกลุ่ม (Robust mean)

σ_{pt} = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในการประเมินความสามารถ (Robust standard deviation)

u = ค่าความไม่แน่นอนของข้อมูลการวิเคราะห์ (Standard uncertainty) (k=2)

เกณฑ์การประเมินสำหรับการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการทางการแพทย์เป็น 3 กลุ่มตามค่า z score ดังนี้

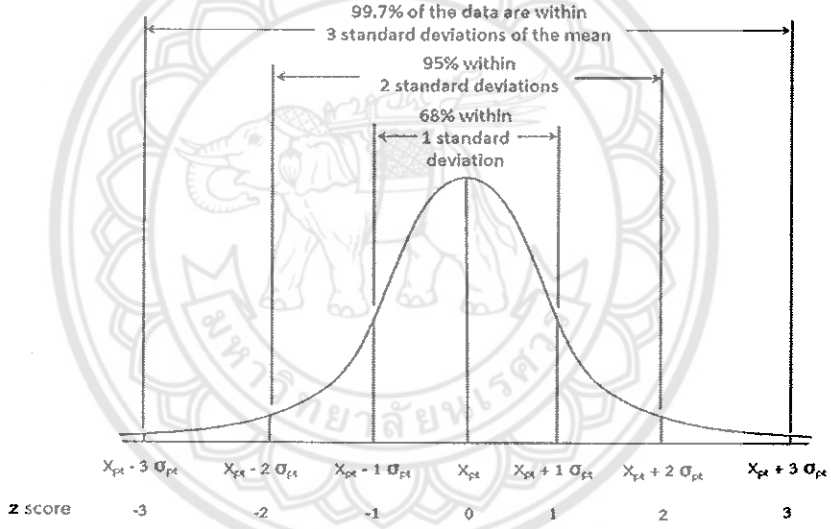
$|z| \leq 2.0$ ผลการตรวจวิเคราะห์ เป็นที่น่าพึงพอใจ (Satisfactory)

$2.0 < |z| < 3.0$ ผลการตรวจวิเคราะห์ เป็นที่น่าสงสัย (Questionable)

$|z| \geq 3.0$ ผลการตรวจวิเคราะห์ ไม่น่าพึงพอใจ (Unsatisfactory)

เป็นการประเมินผลการทดสอบความชำนาญจากค่าพ้องกลุ่ม (Consensus) คือ เมื่อผลการวิเคราะห์วัสดุ ทดสอบความชำนาญของผู้รับบริการมีลักษณะการกระจายตัวแบบปกติถือว่ามีการแจกแจงแบบปกติ (normal distribution) เมื่อคำนวณค่าเฉลี่ยพ้องกลุ่ม (Robust mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานพ้องกลุ่ม (Robust standard deviation) และคะแนนมาตรฐาน (z score) แล้วนำมา Plot กราฟ จะได้กราฟรูประฆังคว่ำมีลักษณะสมมาตร คะแนนมาตรฐานของผู้รับบริการส่วนใหญ่ จะกระจายตัวอยู่รอบค่าเฉลี่ยหรือตำแหน่งตรงกลาง ผลที่แตกต่างจาก ค่าเฉลี่ยจะค่อย ๆ กระจายลดหลั่นกันไปทางซ้ายและขวาในลักษณะเท่า ๆ กัน

จากภาพที่ 2 จะเห็นว่าคะแนนมาตรฐานของสมาชิกร้อยละ 68 จะอยู่ในช่วง ± 1 ร้อยละ 95 อยู่ในช่วง ± 2 และร้อยละ 99.7 จะอยู่ภายใน ± 3 หรืออีกนัยหนึ่งคะแนนมาตรฐานของผู้รับบริการร้อยละ 5 จะอยู่นอก ± 2 และ ร้อยละ 0.3 อยู่นอก ± 3 ดังนั้นคะแนนมาตรฐานที่มากกว่า ± 3 จะมีจำนวนน้อยจึงถือเป็นค่าที่ไม่น่าพึงพอใจ (Unsatisfactory) จะต้องทำการแก้ไขเร่งด่วน สำหรับคะแนนมาตรฐานที่อยู่ระหว่าง ± 2 ถึง ± 3 จึงเป็นค่าเตือน (Waning หรือ Questionable) ซึ่งควรพิจารณาหาสาเหตุและปรับปรุงวิธีการตรวจวิเคราะห์ ส่วนค่าคะแนนมาตรฐาน ที่อยู่ภายใน ± 2 ซึ่งมีจำนวนมาก (ร้อยละ 95) จึงเป็นค่าที่น่าพึงพอใจ (Satisfactory) การประเมินผลการทดสอบ ความชำนาญมากกว่า 3 ระดับอาจจะมีความไวในการบ่งชี้ความผิดพลาดมากเกินไปซึ่งอาจบ่งชี้ผลผิดพลาดลวงได้ ทำให้เกิดการแก้ไขในสิ่งที่ไม่จำเป็น (ISO 13528 Second-edition 2015)



ภาพที่ 5 กราฟการแจกแจงข้อมูลแบบปกติ

บริษัท วี เมด แล็บ เซ็นเตอร์ จำกัด ดำเนินธุรกิจโดยการผลิตวัสดุทดสอบชนิดเลือดครบส่วนโดยบริษัทนำกรรมวิธีการเตรียมตัวอย่างเลือดที่ได้รับอนุญาตให้ใช้สิทธิในทรัพย์สินทางปัญญาตามเอกสารขอรับสิทธิบัตร หมายเลข 1401002618 ลงวันที่ 30 เมษายน 2557 ของนักวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร ในการผลิตวัสดุยังคงใช้เลือดจากผู้ป่วยเบาหวานและคนปกติในการเตรียม โดยพบปัญหา คือ การแตกของเม็ดเลือดแดงขณะเตรียม ขนส่งและการเก็บ ความคงตัวเมื่อใช้เลือดจากผู้ป่วยหลายคนผลิตได้ปริมาณจำกัด การ HbA_{1c} ให้หลากหลายได้ยาก เป็น PT provider ในการกระจายวัสดุทดสอบไปยังห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ทั่วประเทศ

5. การผลิตวัสดุอ้างอิงตามมาตรฐานการผลิต ISO 17034 General requirements for the competence of reference material producers (ISO 17034, 2016) [12,13]

มาตรฐาน ISO 17034 คือ ข้อกาหนดทางวิชาการที่จำเพาะเพื่อความรู้ความสามารถและองค์ประกอบในการดำเนินการของผู้ผลิตวัสดุอ้างอิง เพื่อผลิตวัสดุอ้างอิง ซึ่งสามารถใช้เป็นวิธีการในการประกันคุณภาพทั่วไปของผู้ผลิตวัสดุอ้างอิง โดยมาตรฐานสากลนี้ครอบคลุมการผลิตวัสดุอ้างอิงและวัสดุอ้างอิงที่ได้รับการรับรอง โดยวัสดุทดสอบต้องผ่านการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวในระยะเวลาที่ทำการศึกษา

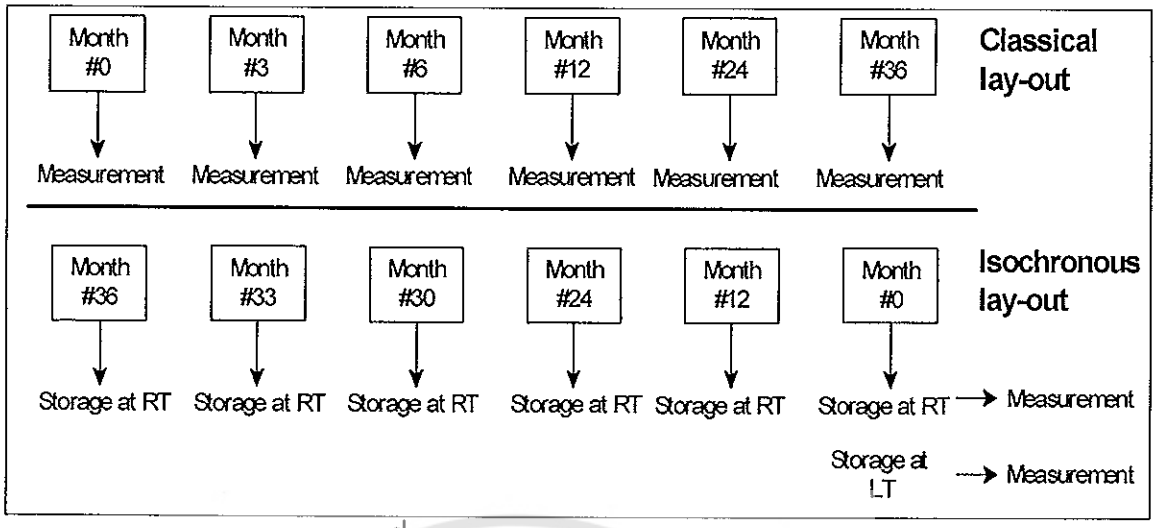
5.1 การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity test)

การหาความเป็นเนื้อเดียวกันทั้งหมดในการผลิตวัสดุทดสอบ หลังการผลิตแล้ววัสดุทดสอบจะถูกสุ่มอย่างน้อยจำนวน 10 ตัวอย่าง ทำการทลองซ้ำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ใน 1 การผลิตนั้นๆ ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ได้นำมาคำนวณโดยใช้ one-way ANOVA เพื่อหาความสัมพันธ์ของค่า Fcalculation < Fcritical แสดงให้เห็นว่าผลการทดสอบวัสดุทดสอบในกระบวนการผลิตรอบนั้นๆมีความเป็นเยื้อเดียวกัน

5.2 การทดสอบความคงตัว (Stability test)

เป็นการทดสอบหาความคงตัวของวัสดุทดสอบ โดยการสุ่มตัวอย่างจำนวน 5 ตัวอย่างแบบสุ่ม จากนั้นตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ HbA_{1c} ในวันที่ 0, 1, 3, 15, 30,..... n จนกว่าวัสดุทดสอบจะมีความไม่คงตัว วิธีการทดสอบสามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธีคือ

1. Classical lay out ทำการตรวจวัดวัสดุทดสอบ ณ เวลาที่เก็บตัวอย่าง หรือเวลานั้นๆ
2. Isochronous lay out ทำการเก็บวัสดุทดสอบ แล้วตรวจวัดวัสดุทดสอบ ณ เวลาเดียวกันคือเวลาสิ้นสุดระยะเวลาการศึกษาที่เก็บตัวอย่าง หรือเวลานั้นๆ



ภาพที่ 6 Stability test (Charun Y. 2018)

6. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง [14]

จากงานวิจัยที่ผ่านมาของภัณฑิรา, 2017 ได้เตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c} จากเลือดที่หมดอายุจากธนาคารเลือด ผ่านกรรมวิธีการเตรียมโดยการล้าง และปั่นแยกแยกเซลล์เม็ดเลือดแดงแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส พบว่าการเตรียมด้วยวิธีดังกล่าวทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกส่งผลให้วัสดุทดสอบมีความคงตัวในระยะเวลาอันสั้น การเตรียมในปริมาณมากไม่สามารถทำได้เนื่องจากการการใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงที่แตกต่างกันมาเทรวมกันทำให้เกิด hemolysis ได้มาก ข้อจำกัดเหล่านี้จึงถูกยกขึ้นมาเป็นข้อจำกัด และใช้ในการพัฒนา ปรับปรุงวัสดุทดสอบในโรงการวิจัยครั้งนี้

งานวิจัยที่ผ่านดังแสดงตารางที่ 1 และ 2 การไกลเคชันของน้ำตาลและโปรตีนในพลาสมาเรียกว่าไกลเคทโปรตีน อาศัยการจับกันของโปรตีนและน้ำตาลในน้ำเหลือง หรือเรียกว่า Extracellular glycation และการไกลเคทฮีโมโกลบินระหว่างน้ำตาลกับฮีโมโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดง เรียกว่า Intracellular glycation สภาวะของการไกลเคชันในหลอดทดลองในงานวิจัยที่ศึกษาสามารถสรุปได้ดังนี้ การเกิด Intracellular glycation ใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงจากถุงเลือดที่ได้รับบริจาคจากธนาคารเลือด ล้าง ปั่นแยกเซลล์เม็ดเลือดแดง แล้วนำไปบ่มกับน้ำตาล D-glucose ในสารละลาย phosphate buffer (PBS), pH 7.4 เติมสารต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย Sodium azide บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1-21 วัน สำหรับ Extracellular glycation โปรตีนในพลาสมาจะเกิดการไกลเคทกับน้ำตาล หลังการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลานานถึง 30 วัน

ตารางที่ 1: สารเคมี วิธีการเตรียม สภาวะสำหรับกระบวนการไกลเคชันในหลอดทดลองระหว่างน้ำตาลกลูโคสและฮีโมโกลบิน (intracellular glycation)

ปี	ผู้วิจัย	หัวข้อการศึกษา	สารเคมี	สภาวะและวิธีการไกลเคชัน
1982 [15]	Smith RJ. Koenig RJ. Binnerts A. Soeldne JS, Aoki TT.	Regulation of hemoglobin A_{1c} formation in human erythrocytes *in vitro*. Effects of physiologic factors other than glucose.	เซลล์เม็ดเลือดแดง	1. เลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดแดงในอาหารที่มีส่วนผสมของ 90% Earle's salt solution, 10% bovine serum, phenol red (glucose indicator), pH 7.4, 5% CO_2 เป็นเวลา 8 วัน 2. ปริมาณ HbA_{1c} เพิ่มสูงขึ้นหลังการบ่มเป็นเวลา 8 วัน
2006 [16]	Selvaraj N. Zachariah B. Sathiyapriya V.	Effect of lipid peroxides and antioxidants on glycation of hemoglobin: An *in vitro* study on human erythrocytes.	เซลล์เม็ดเลือดแดง	1. เซลล์เม็ดเลือดแดงบ่มกับน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 5-50 mmol/l ในสารละลาย phosphate buffer pH 7.4
2015 [17]	Izabela SB. Grzegorz B.	Ascorbic acid and protein glycation *in vitro*	Peripheral blood	1. ตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครเจาะเก็บใน sodium citrate tube 2. ตัวอย่างถูกนำมาปั่นล้าง แยกเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ความเร็วรอบ 2000 g, 10 นาที, 4 °C

ปี	ผู้วิจัย	หัวข้อการศึกษา	สารเคมี	สภาวะและวิธีการไกลเคชัน
				3. เซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีค่า hct. 10% บ่มกับน้ำตาล D-glucose 5, 50 or 100 mM บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 - 48 ชม.
2018 [18]	Zeba S. Mohd IM. Saheem A.	D-Ribose induced glycoxidative insult to hemoglobin protein: An approach to spot its structural perturbations	ฮีโมโกลบิน	1. ฮีโมโกลบิน (Hb) บ่มกับ D-ribose (1, 2, 5 and 10 mM) ในสารละลาย 100 mM phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4 ในสภาวะปลอดเชื้อ 2. หลังการไกลเคชัน 21 วัน ผลิตภัณฑ์จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 °C เพื่อรอการศึกษาต่อไป การใช้ D-ribose อาจส่งผลต่อความคงตัวของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากทำให้โครงสร้างเกิดการเปลี่ยนแปลงได้
2018 [19]	Rudolf F. Enzo C. Ram HN. Menachem S. Timothy SK. Edward M.	DAF in diabetic patients is subject to glycation/inactivation at its active site residues	เซลล์เม็ดเลือดแดง	1. เซลล์เม็ดเลือดแดงบ่มร่วมกับ 0.5 M glucose ที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 10 วัน เทียบกับการบ่มเซลล์เม็ดเลือดแดงกับ D-ribose ในสารละลาย phosphate buffer หลังการบ่มผลิตภัณฑ์จะถูกเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว

ตารางที่ 2: สารเคมี วิธีการเตรียม สภาวะสำหรับกระบวนการไกลเคชันในหลอดทดลองระหว่างน้ำตาลกลูโคสและโปรตีนในพลาสมา (extracellular glycation)

ปี	ผู้วิจัย	หัวข้อการศึกษา	สารเคมี	สภาวะและวิธีการไกลเคชัน
2014 [20]	Javad B. Adeleh D. Ali AS.	Honey bee venom decreases the complications of diabetes by preventing hemoglobin glycation	Bovine serum albumin (BSA)	BSA ที่ความเข้มข้น 10, 20 and 40 μg/ml บ่มกับน้ำตาลที่อุณหภูมิ 37 °C, 40 RPM เป็นเวลา 5 สัปดาห์ใน shaker incubatorทุกๆสัปดาห์จะต้องเก็บตัวอย่าง (sampling) และเก็บตัวอย่างที่ –70 °C เพื่อรอการศึกษาต่อไป
2015 [21]	Izabela SB. Grzegorz B.	Ascorbic acid and protein glycation *in vitro*	Bovine serum albumin (BSA)	BSA บ่มกับน้ำตาล 0.5 M fructose หรือน้ำตาล ribose ในสารละลาย phosphate buffer, pH 7.4 มีการเติมการต้านแบคทีเรีย sodium azide ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6 วัน
2017 [22]	Marika V. Mariacristina P.	A quick, simple method for detecting circulating fluorescent advanced glycation end-products: Correlation with *in vitro* and *in vivo* non-enzymatic glycation	Bovine serum albumin (BSA)	50 mg/mL BSA ในสารละลาย 0.2 M PBS pH 7.8 เติม antibiotics และ protease inhibitors บ่มกับน้ำตาล D-glucose concentrations 0, 5, 25, 125, 250, 500 mM ตั้งทิ้งไว้ในสภาวะที่ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ การบ่ม BSA กับ 500 mM D-glucose concentrations for a fixed time or with a fixed D-glucose เป็นเวลา 8 สัปดาห์จะให้ค่า AGEs ที่สูงขึ้น

ปี	ผู้วิจัย	หัวข้อการศึกษา	สารเคมี	สภาวะและวิธีการไกลเคชัน
2017 [23]	Sadaf F. Tamanna A. Nabeel A. Asimul I. Priyankar S.	Non-enzymatic glycation enhances human serum albumin binding capacity to sodium fluorescein at room temperature: A spectroscopic analysis	Human Serum Albumin (HSA)	600 umol ของ HSA บ่มกับน้ำตาล glucose ความเข้มข้น 1.8 M ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 วัน มีการเติม sodium azide ซึ่งเป็น bacterial จากนั้นตรวจวัดหาปริมาณฟรุกโตซามินด้วย fructosamine assay kit ทุกๆ 5 วัน และตรวจหาปริมาณโปรตีนด้วย 12% SDS-PAGE. พบว่าหลังการบ่มเป็นเวลา 20 วันจะให้ค่าฟรุกโตซามินที่เพิ่มสูงขึ้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

โครงการวิจัยเป็นโครงการวิจัยต่อเนื่อง 2 ปี โดยมีทั้งหมด 8 กิจกรรมดังนี้

กิจกรรมที่ 1 การพัฒนากรรมวิธีในการเตรียมตัวอย่างทดสอบให้มีคุณลักษณะเหมือนกับตัวอย่าง (Whole blood) และน้ำเหลือง (Plasma) โดยใช้เลือดเหลือใช้จากธนาคารเลือด

กิจกรรมที่ 2 การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity test) และการทดสอบความคงตัว (Stability test) ตามมาตรฐานที่ ISO13528:2015 กำหนดไว้

กิจกรรมที่ 3 นำตัวอย่างทดสอบที่เตรียมได้ไปใช้ในโปรแกรมทดสอบความชำนาญที่สร้างขึ้น

กิจกรรมที่ 4 เปรียบเทียบ รวมทั้งหาความสัมพันธ์ของผลการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ด้วยสถิติต่างๆของการตรวจทางห้องปฏิบัติการประเภทต่างๆ ในสมาชิก รวมทั้งการใช้ Lab performance และ sigma matric

กิจกรรมที่ 5 ดำเนินการเตรียมและกำหนดค่าวัสดุอ้างอิง (Reference material) ผ่านการนำไปใช้ในการทดสอบความชำนาญไม่น้อยกว่า 200 สมาชิก

กิจกรรมที่ 6 เปรียบเทียบค่ากับวิธีมาตรฐานและวิธีระดับ definitive method ตามมาตรฐาน ISO 17034 นำข้อมูลที่ได้จากการตรวจด้วย 2 สมาชิก มาคำนวณค่า CV ของการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินเอวันซีและฟรุกโตซามิน

กิจกรรมที่ 7 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของผลการประเมินการตรวจวิเคราะห์ชนิดฮีโมโกลบินเอวันซีและฟรุกโตซามินด้วยสถิติต่างๆของการตรวจทางห้องปฏิบัติการประเภทต่างๆใน 200 สมาชิก รวมทั้งการใช้ Lab performance และ sigma matric

กิจกรรมที่ 8 ออกแบบระบบการส่งผล รายงานผล ผ่านเว็บไซต์และผ่านแอพพลิเคชันบนสมาร์ทโฟน

กิจกรรมที่ 9 จัดทำระบบการประเมินผลการทดสอบความชำนาญผ่านระบบเว็บไซต์

โดยในปีที่ 1 (ปีงบประมาณ 2562) การดำเนินกิจกรรมที่ผ่านมาสรุปเป็น 2 การศึกษาหลักดังต่อไปนี้

การศึกษาที่ 1 การพัฒนากรรมวิธีการเตรียมวัสดุทดสอบ HbA1c ประกอบด้วยกิจกรรมที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 7

การศึกษาที่ 2 การพัฒนาระบบการประเมินผลข้อมูลตามมาตรฐาน ISO 13528 สำหรับการตรวจวิเคราะห์ HbA1c ผ่านเว็บไซต์อย่างเต็มรูปแบบ ประกอบด้วยกิจกรรมที่ 8 และ 9

โดยในการศึกษาการเตรียมวัสดุทดสอบสำหรับการตรวจวัดปริมาณฟรุกโตซามินและการศึกษาการเปรียบเทียบวัสดุทดสอบสำหรับการตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c} กับวิธีมาตรฐาน จะดำเนินการศึกษาต่อในปีงบประมาณ 2563

การศึกษาที่ 1
การพัฒนากรรมวิธีการเตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c}

การพัฒนากรรมวิธีในการเตรียมตัวอย่างทดสอบให้มีคุณลักษณะเหมือนกับตัวอย่าง (Whole blood) โดยใช้เลือดเหลือใช้จากธนาคารเลือด วัสดุทดสอบดังกล่าวผ่านการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity test) และการทดสอบความคงตัว (Stability test) ตามมาตรฐานที่ ISO13528:2015 กำหนดไว้ จากนั้นนำตัวอย่างทดสอบที่เตรียมได้ไปใช้ในโปรแกรมทดสอบความชำนาญที่สร้างขึ้น โดยจัดส่งให้กับสมาชิกจำนวน 200 แห่ง ผ่านศูนย์ทดสอบความชำนาญทางการแพทย์ ศูนย์เอ็นยู เอ็มแอลซี PT provider บริษัท วี เมด แล็บ เซ็นเตอร์ จำกัด ผลการตรวจวิเคราะห์จะถูกนำมาวิเคราะห์ เปรียบเทียบ รวมทั้งหาความสัมพันธ์ของผลการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ ด้วยสถิติต่างๆของการตรวจทางห้องปฏิบัติการประเภทต่างๆ ในสมาชิก และกำหนดค่าวัสดุอ้างอิง (Reference material)

1. ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

1.1 เกณฑ์การคัดเข้ากลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างเลือดที่เหลือใช้หรือได้รับบริจาคจากสภากาชาด ปริมาตรถุงละ 300-350 mL ผ่านการคัดกรองโรคติดเชื้อเบื้องต้นแล้ว เช่น โรคไวรัสตับอักเสบชนิดบีและซี (Hepatitis B, C) โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง (HIV) โรคซิฟิสลิส (Syphilis)

1.2 เกณฑ์การคัดออกกลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างเลือดที่ตรวจพบโรคติดเชื้อที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ใช้งาน เช่น ไวรัสตับอักเสบชนิดบีและซี (Hepatitis B, C) โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง (HIV) โรคซิฟิสลิส (Syphilis)

2. กิจกรรมการดำเนินโครงการ

การพัฒนากรรมวิธีการเตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ประกอบด้วยกิจกรรมการดำเนินการ 5 หัวข้อการศึกษาดังนี้

2.1 ศึกษาคุณสมบัติและอายุตัวอย่างเลือดที่นำมาใช้ในการเตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c}

2.1.1 คุณสมบัติของเลือดที่จะนำมาใช้ในการผลิตวัสดุทดสอบ

ก่อนการผลิตวัสดุทดสอบเพื่อให้การผลิตเป็นไปอย่างมีคุณภาพ ประสิทธิภาพ และลดต้นทุนการผลิตมากที่สุด จึงต้องคัดเลือกเซลล์ที่มีคุณภาพก่อนการนำไปเตรียมผลิตวัสดุทดสอบ โดยเซลล์ที่สามารถนำไปผลิตวัสดุทดสอบได้ดี มีปริมาณของผลิตภัณฑ์สูงนั้นต้องมี

คุณสมบัติดังต่อไปนี้ เลือดมีสีแดง ไม่คล้ำ เขียวหรือดำ อายุของเซลล์ต้องไม่หมดอายุเกิน 2-3 เดือน ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมีค่าประมาณ 38-40% ไม่เกิดการแตกของเซลล์ (Hemolysis) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ไม่มีฟองกาศปรากฏ และไม่มีลิ่มเลือดปรากฏ เซลล์ที่ผ่านคุณสมบัติดังกล่าวจะถูกนำมาใช้ในการเตรียมการศึกษาการไกลเคชันต่อไป

2.1.2 การศึกษาอายุของตัวอย่างเลือดที่จะนำมาใช้

นำตัวอย่างเลือดที่ผ่านเกณฑ์การประเมินเบื้องต้นหลังการหมดอายุ 0, 1, 2 และ 3 เดือน มาล้างเพื่อศึกษาจำนวนครั้งในการล้าง และปริมาณเซลล์ที่ได้ (Yield) เพื่อนำไปใช้ในการผลิตวัสดุทดสอบต่อไป

เนื่องจากว่าตัวอย่างเลือดที่รับจากธนาคารเลือดมานั้น มีจำนวนวันที่หมดอายุแตกต่างกัน และคุณสมบัติของเลือดที่หมดอายุแตกต่างกันนี้ มีผลต่อจำนวนครั้งของการล้างและปริมาณของเซลล์ที่เก็บได้ เพื่อช่วยลดต้นทุนการเตรียมสารเคมีในการล้าง สังเกตสี บันทึกจำนวนครั้งหลังการปั่นล้าง และปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เหลือ

2.2 การเตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ที่เตรียมจากเลือดในสารละลาย CPDA-1

2.2.1 ขั้นตอนการเตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c}

วัสดุทดสอบเตรียมขึ้น 2 ระดับคือระดับต่ำช่วงค่า HbA_{1c} 4-6 % และระดับสูงมีช่วงค่า HbA_{1c} 6.5%-12%

1. การเตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ระดับต่ำ (4-6 %); เลือกถุงเลือดยังไม่หมดอายุ หรือหมดอายุแล้วไม่เกิน 2 เดือน โดยสังเกตจากวันที่ระบุข้างถุงที่มีการเจาะเก็บเลือดจากอาสาสมัคร นำถุงเลือดออกจากตู้เย็นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที
2. การเตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ระดับต่ำ (6.5-12 %); ตัวอย่างเลือดผู้ป่วยเบาหวานหรือเลือดที่หมดอายุจากธนาคารเลือดที่มีค่า HbA_{1c} สูง (>6.5%)

การเตรียมวัสดุทดสอบทั้ง 2 ระดับสามารถนำตัวอย่างเลือดข้างต้นไปปั่นล้างด้วย Normal saline (NSS) 0.85% ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 3500 รอบ / นาที เป็นเวลา 5 นาที ดูด NSS ออกด้วยเครื่อง Suction จนเหลือแต่ เซลล์เม็ดเม็ดเลือดแดง ทำซ้ำจนกว่า NSS ใส ไม่มีสีแดงปน เก็บเซลล์เม็ดเลือดแดง ผสมกับ CPDA-1 และเก็บรักษาเซลล์ในอุณภูมิที่เหมาะสม

2.2.2 การทดสอบค่าความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวของวัสดุทดสอบ HbA_{1c}

หลังการเตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c} จำนวน 2 ระดับที่ผ่านการประเมินค่าความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวของวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ตามมาตรฐาน ISO 17034:Guide 35 เรียบร้อยแล้ว

จ QP
96
.5
ท๑๙๕
๒๕๖๔
30 ก.ค. 2564

นั้น วัสดุทดสอบจะถูกนำไปใช้จริงในโปรแกรมทดสอบความชำนาญ ก่อนการนำไปใช้ในโปรแกรมฯ วัสดุทดสอบจะต้องทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวของวัสดุทดสอบตามมาตรฐาน ISO 13528 สถิติที่ทดสอบวัสดุในโปรแกรมทดสอบความชำนาญตามมาตรฐาน ISO 17043 ขั้นตอนการทดสอบดังต่อไปนี้

1. การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันวัสดุทดสอบ
   สุ่มตัวอย่างส่งห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรองมาตรฐาน ISO 13528 เพื่อตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ HbA_{1c} จำนวน 10 ตัวอย่างทดสอบ (n=10) ทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ แล้วคำนวณผลตามมาตรฐาน ISO 13528
2. การทดสอบความคงตัวของวัสดุทดสอบ
   สุ่มตัวอย่างส่งห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรองมาตรฐาน ISO 13528 เพื่อตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ HbA_{1c} จำนวน 5 ตัวอย่างทดสอบ (n=5) ทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ แล้วคำนวณผลตามมาตรฐาน ISO 13528

2.3 การเตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ที่เตรียมจากเลือดผ่านกระบวนการไกลเคชัน

การศึกษาสภาวะที่มีผลต่อการไกลเคชัน แบ่งออกเป็น 6 กิจกรรมการศึกษาดังนี้

2.3.1 การศึกษาผลของระยะเวลาในการบ่ม

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าระยะเวลาในการบ่มต้องใช้เวลามากกว่า 15-20 วัน จึงจะเกิดการไกลเคชันได้ หากการไกลเคชันใช้เวลานาน จะมีผลต่อลักษณะเซลล์ของเม็ดเลือดแดง ทำให้เกิดการแตกของเซลล์เกิดขึ้น อีกทั้งยังส่งผลต่อการตรวจวิเคราะห์ได้อีกด้วย ตามหลักการตรวจวัดของเครื่องตรวจวัดบางหลักการจะต้องมีปริมาณของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นอย่างน้อย 15% ดังนั้นการไกลเคชันเป็นระยะเวลานานจะมีผลต่อต้นทุนการผลิต เวลาในการผลิต และความสมบูรณ์ของเซลล์ ในการทดลองนี้จึงออกแบบสภาวะการบ่มและระยะเวลาในการบ่มของ Red blood cell กับ PBS และตัวอย่าง Red blood cell กับ Glucose ที่อุณหภูมิ 37 °C บันทึกผลปริมาณ HbA_{1c} และค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเป็นเวลา 1-5 วัน

2.3.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเกิดไกลเคชัน

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มที่เหมาะสมคืออุณหภูมิ 37 °C เนื่องจากเลือดที่ได้รับจากสภากาชาดถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 °C จึงเป็นที่มาของสมมติฐานว่า ถ้าเกิดปล่อยให้เลือดที่ได้รับบริจาคเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 และ 2-8 °C มีค่าของ HbA_{1c} และมีผลต่อการแตกของเม็ดเลือดแดงหรือไม่ ในการทดลองนี้จึงออกแบบสภาวะการบ่มตัวอย่าง Red blood cell ที่

อุณหภูมิ 37 °C และ 2-8 °C โดยตัวอย่างที่บ่มกับ PBS และตัวอย่าง Red blood cell กับ Glucose บันทึกผลปริมาณ HbA_{1c} และค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเป็นเวลา 5 วัน

2.3.3 การศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ในการกระบวนการไลเคชัน คือความเข้มข้น 50, 100, 125, 150 และ 200 mM โดยมี PBS เป็นตัวควบคุม บ่มกับตัวอย่าง Red blood cell บันทึกผลปริมาณ HbA_{1c} และค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเป็นเวลา 5 วัน

2.3.4 การศึกษาการหยุดปฏิริยาไกลเคชัน และสภาวะการเก็บรักษาเซลล์

หลังการบ่มตัวอย่าง Red blood cell กับน้ำตาลกลูโคสที่สภาวะที่เหมาะสมปริมาณ HbA_{1c} จะเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นการศึกษาการหยุดปฏิริยาไกลเคชัน และสภาวะการเก็บรักษาเซลล์เพื่อรักษาค่าความคงตัวของวัสดุทดสอบ HbA_{1c} และค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเป็นระยะเวลานาน จึงเป็นสิ่งสำคัญ การศึกษาสภาวะการเก็บรักษาเซลล์ทำได้โดย

1. เก็บสารละลายหลังไกลเคชันที่อุณหภูมิ
   a. ที่อุณหภูมิ 2-8 °C
   b. ที่อุณหภูมิ -20 °C
2. ปั่นล้างสารละลายหลังกระบวนการไกลเคชันในหลอดทดลอง แล้วเก็บเซลล์เม็ดเลือดแดงในสารละลายดังต่อไปนี้
   a. ในสารลลาย CPDA-1 และเก็บวัสดุทดสอบที่อุณหภูมิ 2-8 °C
   b. ในสารลลายน้ำตาลกลูโคส และเก็บวัสดุทดสอบที่อุณหภูมิ 2-8 °C

บันทึกผลปริมาณ HbA_{1c} และค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเป็นเวลา 10 วัน

2.3.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิและความชื้นต่อความคงตัวของ HbA_{1c} และค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นระหว่างการขนส่ง

ตัวอย่างวัสดุทดสอบถูกนำมาทดสอบความคงตัวในวันที่ 0, 1, 2 และ 3 ซึ่งคาดว่าการขนส่งจะใช้เวลาในการขนส่งจำนวน 3 วันถึงห้องปฏิบัติการและตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างได้ จึงออกแบบการทดลองในการจำลองการส่งตัวอย่างเป็นระยะเวลา 3 วัน ภายในกล่องบรรจุจะประกอบด้วยเจลเย็น วัสดุตัวอย่างฮีโมโกลบินเอวันซี และตัววัดอุณหภูมิและความชื้น (Data logger) เพื่อใช้บันทึกอุณหภูมิและความชื้นในกล่องบรรจุ แล้วนำกล่องบรรจุวางที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นวัดปริมาณ HbA_{1c} และค่าเม็ด

เลือดแดงอัดแน่นทุกวันที่ 0, 1, 2 และ 3 เพื่อนำมาคำนวนค่าความคงตัวของวัสดุทดสอบตามสถิติ ISO 17034 : Guide 35

2.3.6 การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวของวัสดุทดสอบ HbA_{1c}

วัสดุทดสอบ HbA_{1c} หลังการไกลเคชันด้วยสภาวะที่เหมาะสม นำมาทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity test) การทดสอบความคงตัว (Stability test) ของสารชีวเคมีในวัสดุอ้างอิง โดยการสุ่มตัวอย่างอย่างน้อยจำนวน 10 ตัวอย่าง (n≥10) ตรวจวัดจำนวนตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ส่วนการตรวจวัดค่าความคงตัว (Stability) โดยสุ่มตัวอย่างอย่างน้อยจำนวน 5 ขวด ตรวจวัดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เป็นเวลาอย่างน้อย 30 วันขึ้นไป แล้วคำนวณตามมาตรฐาน ISO 17034 : Guide 35 โดยใช้ one-way ANOVA หรือขึ้นกับวิธีการคำนวณที่อ้างอิงในข้อกำหนด

ขั้นตอนการคำนวณ Homogeneity test

1. ตรวจเช็ค outlier หรือการสังเกตการกระจายตัวของค่าที่ผิดปกติ หากพบว่าผลการตรวจวิเคราะห์มี outlier ต้องตัดค่านั้นทิ้งไป

Homogeneity test

bottle No.	Rep#1	Rep#2	Rep#3	$s_{(s)}^2$ (B)	R/total	Critical?
1	6.7	6.8	6.5	0.0233	0.00352	pass
2	6.7	6.7	6.5	0.0133	0.00201	pass
3	6.6	6.8	6.5	0.0233	0.00352	pass
4	6.7	6.5	6.5	0.0133	0.00201	pass
5	6.7	6.6	6.7	0.0033	0.00050	pass
6	6.6	6.6	6.7	0.0033	0.00050	pass
7	6.7	6.7	6.6	0.0033	0.00050	pass
8	6.6	6.6	6.6	0.0000	0.00000	pass
9	6.6	6.6	6.7	0.0033	0.00050	pass
10	6.7	6.6	6.5	0.0100	0.00151	pass
grand mean		6.63			Critical 95%	0.8411

2. การคำนวณโดยใช้ singe factor, ANOVA เพื่อคำนวณหาค่า F critical และ F calculation หากพบว่าค่า F calculation น้อยกว่า F critical แสดงว่าวัสดุทดสอบดังกล่าวมีความเป็นเนื้อเดียวกัน

Anova: Single Factor							
SUMMARY							
Groups	Count	Sum	Average	Variance			
Row 1	3	20	6.6667	0.02333			
Row 2	3	19.9	6.6333	0.01333			
Row 3	3	19.9	6.6333	0.02333			
Row 4	3	19.7	6.5667	0.01333			
Row 5	3	20	6.6667	0.00333			
Row 6	3	19.9	6.6333	0.00333			
Row 7	3	20	6.6667	0.00333			
Row 8	3	19.8	6.6	1.2E-30			
Row 9	3	19.9	6.6333	0.00333			
Row 10	3	19.8	6.6	0.01			
ANOVA							
Source of Varia	SS	df	MS	F	P-value	F crit	
Between G	0.02967	9	0.0033	0.341	0.9498	2.39281	
Within Gr	0.19333	20	0.0097				
Total	0.223	29					

3. หลังจากวัสดุทดสอบผ่านการประเมินค่าความเป็นเนื้อเดียวกันแล้ววัสดุทดสอบจะถูกดูดแบ่งใส่หลอด หลอดละ 0.3 mL จากนั้นวัสดุทดสอบเหล่านี้จะต้องทดสอบความคงตัวของวัสดุโดยอาศัยการคำนวณตามข้อกำหนด ISO 17934: Guide 35 หากพบว่าผลการทดสอบผ่านการประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันแสดงว่าวัสดุทดสอบมีความคงตัว ณ เวลาที่ทำการทดสอบนั้นๆ

3. คำนวณหา Stability โดยใช้ฟังก์ LINEST				
Slope,B1	0.001	6.7031	Intercept,B0	
Std error	0.0009	0.0509	Std error of Intercept,sb0	
r^2	0.0638	0.1235	SYX	
F	1.294	19	df	
SSregress	0.0197	0.2893	SSresidual	
tcal	1.1375			
t-critical	2.2281			
Results	stable			

2.4 การทดสอบวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ที่เตรียมขึ้นผ่านโปรแกรมการทดสอบความชำนาญ

ผู้วิจัยนำวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ที่เตรียมในสารละลาย CPDA-1 ที่ผ่านการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวเรียบร้อยแล้ว ส่งให้กับโปรแกรมการทดสอบความชำนาญหรือห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรองมาตรฐาน (Reference laboratory) เพื่อหาความสัมพันธ์ของผลการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ ด้วยสถิติต่างๆของการตรวจทางห้องปฏิบัติการประเภทต่างๆ เพื่อนำค่าที่ได้มาใช้กำหนดค่าวัสดุอ้างอิง จำนวน 200 แห่งทั่วประเทศ รวมวัสดุทดสอบความชำนาญทั้งหมด 400 ต้นแบบ

2.4.1 วัสดุทดสอบถูกจัดส่งให้กับสมาชิกผู้เข้าร่วมโครงการ

วัสดุทดสอบ HbA_{1c} ที่เตรียมจากเลือดในสารละลาย CPDA-1 จะถูกนำไปทดลองใช้งานจริง หลังการทดสอบผ่านความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวของวัสดุทดสอบแล้วนั้น วัสดุทดสอบจะถูกส่งให้ห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมโครงการ ผ่านศูนย์ทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ บริษัทวี เมด แล็บ เซ็นเตอร์ จำกัด ผู้ประกอบการร่วมโครงการวิจัย เป็น PT provider ในการกระจายวัสดุทดสอบโดย เพื่อตรวจวิเคราะห์หาค่าของ HbA_{1c} และสมาชิกจะต้องส่งผลตรวจกลับมายังศูนย์ทดสอบความชำนาญเพื่อประเมินคุณภาพของวัสดุและห้องปฏิบัติการ

2.4.2 คำนวณ z score เพื่อประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการ

ผลการตรวจวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการ จะถูกนำมาคำนวณ z score เพื่อประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการ ตามข้อกำหนด ISO 17034: guide 35 จากค่า weight mean, Alogism A, Mean หรือ Median เป็นต้น ค่ากลาง ค่าความไม่แน่นอน จะถูกนำมากำหนดค่าของวัสดุทดสอบความชำนาญ ตัวอย่างเช่น zผลการทดสอบห้องปฏิบัติการทั้งหมด 200 แห่ง ถูกนำมาประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการโดยการกำหนดค่า z score ที่อยู่ในช่วง -2 ถึง 2 เท่านั้น จึงจะถือว่าห้องปฏิบัติการดังกล่าวมีผลการประเมินเป็นที่น่าพึงพอใจ โดยอาศัยการคำนวณตามข้อกำหนดใน ISO 15189:2012 Requirements for Measurement Uncertainty in the Clinical Laboratory

2.4.3 กำหนดค่าวัสดุทดสอบ HbA_{1c} จากการหาค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวัด (uncertainty)

กลุ่มห้องปฏิบัติการที่ผ่านการประเมิน จะถูกคัดเลือกมาเป็นกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการกำหนดค่า uncertainty ของวัสดุทดสอบ โดยการหาค่า mean ของผลการทดสอบ และการคำนวณหา uncertainty จากผลการวิเคราะห์ทั้งหมดจะได้ค่าวัสดุทดสอบในการรายงานผลเช่น

$$HbA_{1c} = 8.5 \pm 1.5$$

หมายความว่า HbA_{1c} มีช่วงค่าระหว่าง 7.0 – 10.0% แสดงค่า Mean ± uncertainty

การศึกษาที่ 2
การพัฒนาระบบการประเมินผลข้อมูลตามมาตรฐาน ISO 13528 สำหรับการตรวจวิเคราะห์ HbA_{1c} ผ่านเว็บไซต์อย่างเต็มรูปแบบ

ออกแบบเว็บไซต์สำหรับระบบรับ/ส่งและวิเคราะห์ HbA_{1c} และฟรุกโตซามิน เป็นการออกแบบระบบเว็บไซต์สำหรับจัดการข้อมูล และวิเคราะห์ข้อมูล โดยระบบเว็บไซต์นี้จะช่วยให้ระบบการทำงาน PTP มีการจัดการข้อมูลได้ง่ายขึ้น ประหยัดเวลาในการทำงาน เพื่อใช้ในการรวบรวมผลวิเคราะห์ผล และประเมินผลการทดสอบความชำนาญ รวมถึงการออกรายงานให้กับผู้บริการที่เข้าร่วมโปรแกรมการทดสอบความชำนาญ และการค้นหาข้อมูลย้อนหลังได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วิธีการดำเนินการ

การปรับปรุงและพัฒนาระบบครั้งนี้ มีขั้นตอนการดำเนินงาน ดังนี้

1) ออกแบบระบบเว็บไซต์ให้สอดคล้องการดำเนินการโปรแกรมการทดสอบความชำนาญฯ

2) วางแผนออกแบบระบบเว็บไซต์ให้ใช้งานได้ง่ายทั้งผู้รับบริการและผู้ใช้งาน (admin) มีการจัดการข้อมูลได้สะดวกรวดเร็วประหยัดเวลาทำงาน มีระบบการจัดการไม่ซับซ้อน ได้แก่

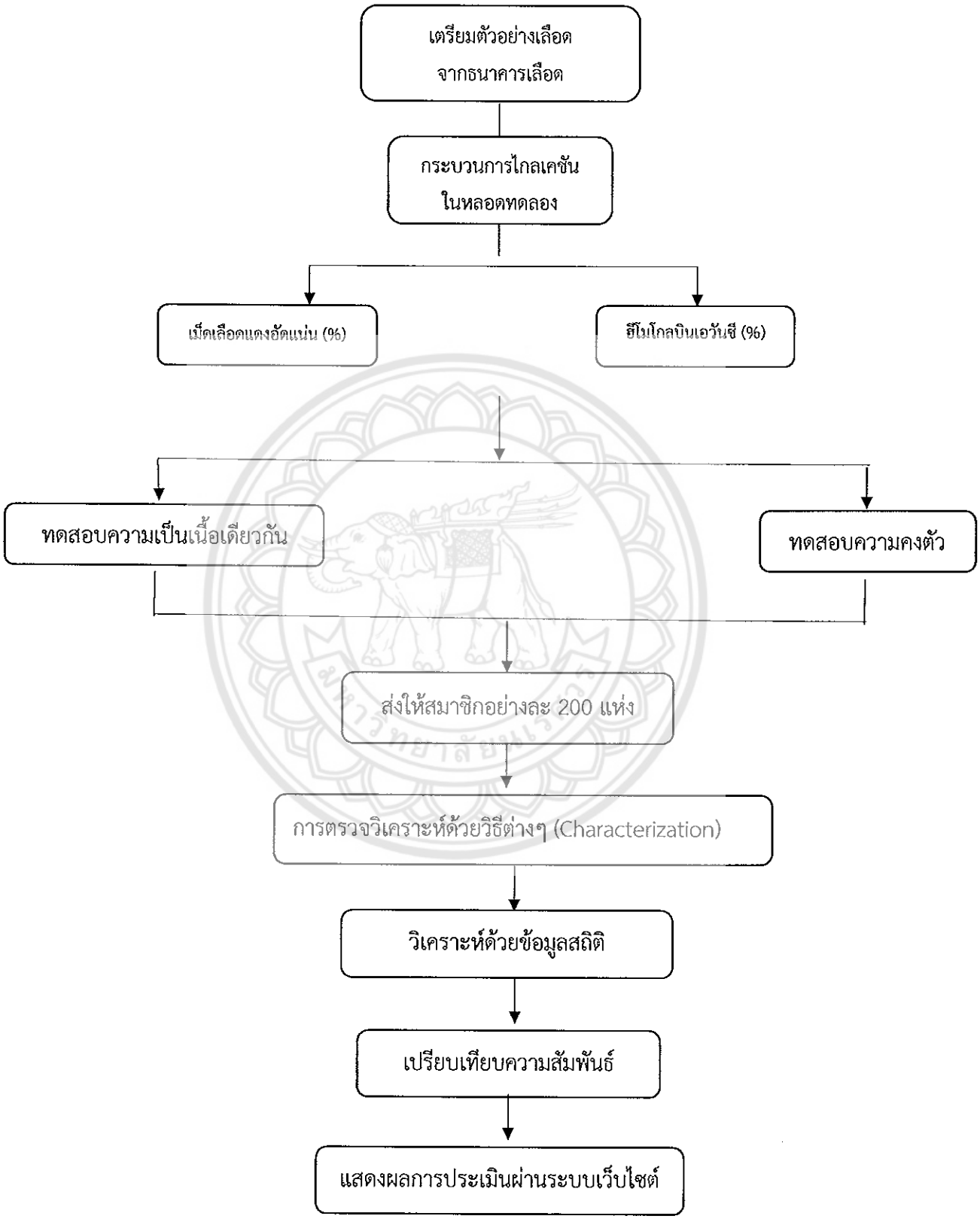
- ระบบการตั้งค่าเอกสารสำหรับผู้รับบริการในแต่ละรอบ
- ระบบการเพิ่มเครื่องการตรวจวิเคราะห์
- ระบบการจัดการเพิ่ม, แก้ไข, ลบ User
- ระบบการรวบรวมผล, ระบบการวิเคราะห์ผล และระบบการประเมินผล
- ระบบการส่งออกของรายงานเบื้องต้น, รายงานประจำรอบ และรายงานประจำปี
- ระบบการประชาสัมพันธ์
- ระบบการประมวลผลการใช้งาน ข้อมูลผู้รับบริการ ความพึงพอใจของผู้รับบริการ
- ระบบการสื่อสารตอบสนองผู้รับบริการที่รวดเร็ว เป็นต้น

3) ตรวจสอบการใช้งานในขั้นตอนเบื้องต้น แนะนำและปรับปรุงแก้ไขระบบเว็บไซต์ให้ตรงตามการใช้งานของผู้ใช้งาน (admin) และสอดคล้องกับการดำเนินการทดสอบความชำนาญมากที่สุด

4) วางแผนการทดสอบการใช้งานผ่านระบบเว็บไซต์โดยบุคลากรภายใน และภายนอก

5) วางแผนการฝึกอบรมทักษะและความรู้ที่จำเป็นสำหรับการพัฒนาระบบเว็บไซต์ให้มีประสิทธิภาพ

6) ตรวจสอบระบบเว็บไซต์ที่สมบูรณ์แล้ว พร้อมเอกสารรายงานความก้าวหน้าของระบบเว็บไซต์ในระยะที่ส่งมอบ



แผนภาพที่ 4 แสดงผังการศึกษาการเตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c}

บทที่ 4

ผลการวิจัย

โครงการวิจัยเป็นการศึกษา การพัฒนาวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ที่เตรียมจากเลือดในสารละลาย CPDA-1 เทียบกับวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ด้วยวิธีการเดิมที่ห้องปฏิบัติการเตรียมขึ้น เพื่อส่งให้กับศูนย์ทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการ เพื่อจัดส่งให้กับสมาชิกอย่างน้อย 200 แห่ง ทั่วประเทศ เนื่องจากวิธีเดิมของห้องปฏิบัติการมีข้อจำกัดจำนวนมาก เช่น ความคงตัวของวัสดุทดสอบต่ำ ปริมาณของเม็ดเลือดแดงน้อยซึ่งบางหลักการตรวจวิเคราะห์ไม่รองรับ ทำให้การตรวจวิเคราะห์มีผลเป็นเท็จได้ มีข้อจำกัดในการเตรียมหากต้องมีการเจาะเก็บเลือดจากผู้ป่วยโดยตรง ปริมาณฮีโมโกลบินที่ระดับสูงยังไม่สามารถผลิตได้เอง มีการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงระหว่างกระบวนการขนส่ง และวัสดุนำเข้าราคาสูง นำมาสู่หัวข้องานวิจัยครั้งนี้ ในการผลิตวัสดุทดสอบให้มีความคงตัวระหว่างการขนส่ง ไม่เกิดการแตก สามารถเตรียมที่ระดับของ HbA_{1c} สูงได้ โดยไม่ต้องมีการเจาะเก็บเลือดจากอาสาสมัคร อาศัยทฤษฎีการไกเคชันในหลอดทดลองของฮีโมโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดงกับน้ำตาลในเลือด การวิจัยครั้งนี้มีการนำหลักการการไกลเคชันมาพัฒนาวัสดุทดสอบที่มีอยู่เดิมให้มีคุณภาพ ประสิทธิภาพ และปริมาณการเตรียมที่สูงขึ้นตามความต้องการของผู้ประกอบการ

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยคือโครงการวิจัยนี้จึงมีการศึกษาวัสดุทดสอบที่เตรียมขึ้น จัดส่งให้กับศูนย์ทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการ เพื่อนำมากำหนดค่า และเตรียมวัสดุทดสอบด้วยวิธีไกลเคชันในหลอดทดลองเพื่อทดแทนการผลิตวัสดุทดสอบวิธีเดิม และนำมาใช้จริงกับศูนย์ทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ควบคู่กับการนำไปใช้การรับส่งผลการทดสอบผ่านระบบเว็บไซต์ เพื่อความสะดวก รวดเร็วต่อผู้เข้ารับบริการ

ผลการศึกษาแต่ละการศึกษาให้ผลดังต่อไปนี้

การศึกษาที่ 1
การพัฒนากรรมวิธีการเตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c}

การศึกษาที่ 1 ประกอบด้วย 3 กิจกรรมการศึกษาดังนี้

1.1 ศึกษาอายุและคุณสมบัติตัวอย่างเลือดที่นำมาใช้ในการศึกษา

1.1.1 คุณสมบัติของเลือดที่จะนำมาใช้ในการผลิตวัสดุทดสอบ

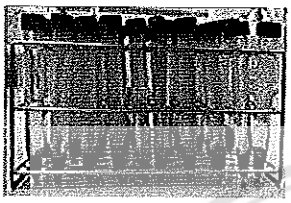
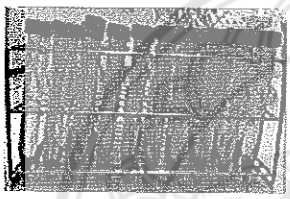
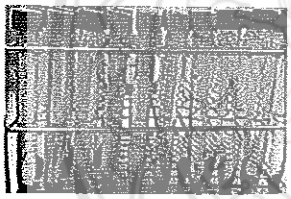
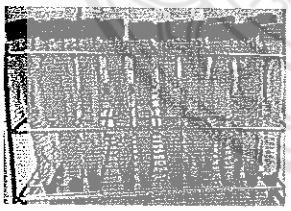
ก่อนการผลิตวัสดุทดสอบเพื่อให้การผลิตเป็นไปอย่างมีคุณภาพ ประสิทธิภาพ และลดต้นทุนการผลิตมากที่สุด จึงต้องคัดเลือกเซลล์ที่มีคุณภาพก่อนการนำไปเตรียมผลิตวัสดุทดสอบ โดยเซลล์ที่สามารถนำไปผลิตวัสดุทดสอบได้ดี มีปริมาณของผลิตภัณฑ์สูงนั้นต้องมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้ เลือดมีสีแดง ไม่คล้ำ เขียวหรือดำ อายุของเซลล์ต้องไม่หมดอายุเกิน 2-3 เดือน ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมีค่าประมาณ 38-40% ไม่เกิดการแตกของเซลล์ (Hemolysis) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ไม่มีฟองกาศปรากฏ และไม่มีลิ่มเลือดปรากฏ เซลล์ที่ผ่านคุณสมบัติดังกล่าวจะถูกนำมาใช้ในการเตรียมเซลล์ในการศึกษาการไกลเคชันในการศึกษาถัดไป

1.1.2 การศึกษาอายุของตัวอย่างเลือดที่จะนำมาใช้

นำตัวอย่างเลือดที่ผ่านเกณฑ์การประเมินเบื้องต้น นำมาปั่นล้างเพื่อศึกษาอายุของเลือดที่จะนำมาใช้ในการผลิตวัสดุทดสอบ เนื่องจากว่าตัวอย่างเลือดที่รับมามีจำนวนวันที่หมดอายุแตกต่างกัน และคุณสมบัติของเลือดที่หมดอายุแตกต่างกันนี้ เพื่อศึกษาจำนวนครั้งของการล้างและปริมาณของเซลล์ที่เก็บได้เพื่อช่วยลดต้นทุนการเตรียมสารเคมีในการล้าง

ผลการทดลอง

ตารางที่ 1 จำนวนครั้ง และปริมาณเซลล์ที่ได้หลังจากการปั่นล้างของเลือดที่ยังไม่หมดอายุและเลือดที่หมดอายุ (n=20)

อายุของตัวอย่างเลือด	รูปภาพที่ล้างจนใส	Mean ±SD		
		อายุเฉลี่ยหลังการเจาะเก็บ (วัน)	จำนวนครั้งในการล้าง (ครั้ง)	ปริมาณเซลล์ (mL)
ยังไม่หมดอายุ (Control) n=5		28.6 ±2.3	1.4 ±0.5	1.0 ±0.1
หมดอายุ 1 เดือน n=5		45.8 ±9.3	3.0 ±0.5	0.7 ±0.1
หมดอายุ 2 เดือน n=5		76.8 ±7.0	4.0 ±0.4	0.5 ±0.1
หมดอายุ 3 เดือน n=5		106.6 ±6.7	7.0 ±0.5	0.3 ±0.1

เลือดจากธนาคารเบือดที่หมดอายุมากกว่า 2 เดือน จำนวนการล้างจะมากกว่า 4 ครั้ง ดังนั้นการใช้เลือดที่หมดอายุเป็นเวลานานจะส่งผลต่อปริมาณต้นทุนและปริมาณ yield ที่เก็บได้

1.2 การเตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ที่เตรียมจากเลือดในสารละลาย CPDA-1

วัสดุทดสอบที่เตรียมจากเลือดในสารละลาย CPDA-1 จำนวน 2 ระดับคือระดับสูงและระดับต่ำ ผ่านการประเมินจากห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรองมาตรฐาน ISO 13528 ในการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว โดยวัสดุทดสอบ HbA_{1c} จะส่งให้กับโปรแกรมทดสอบความชำนาญฯ จำนวน 2 รอบต่อปีการประเมินในปี 2562 ให้ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวของวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ดังนี้

ตารางที่ 7 ตารางแสดงผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวของวัสดุทดสอบ HbA_{1c} จากห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรอง มาตรฐาน ISO 13528

รอบการประเมิน	หมายเลขวัสดุทดสอบ	การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน		ผลการประเมิน	การทดสอบความคงตัว		ผลการประเมิน
		S_s	σ_{pt}		$\lvert\overline{y_1} - \overline{y_2}\rvert$	σ_{pt}	
1	62-301	0.000	0.235	Pass	0.010	0.236	Pass
	62-302	0.015	0.066	Pass	0.050	0.137	Pass
2	62-310	0.000	0.207	Pass	0.383	0.383	Pass
	62-320	0.040	0.105	Pass	0.050	0.105	Pass

S_s ค่าแสดง Difference from homogeneity mean

Pass= วัสดุทดสอบมีความเป็นเนื้อเดียวกัน, วัสดุทดสอบมีความคงตัว

การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวของวัสดุทดสอบ HbA_{1c} พบว่าผ่านการประเมินทั้ง 2 รอบที่ทำการจัดส่ง โดยความเป็นเนื้อเดียวกันสังเกตจากค่า $S_s < \sigma_{pt}$ แสดงให้เห็นว่าวัสดุทดสอบดังกล่าวมีความเป็นเนื้อเดียวกันทุกหลอดที่ทำการดูดแบ่ง 0.3 mL ในหลอดขนาด 0.5 mL และการทดสอบความคงตัวของวัสดุทดสอบ HbA_{1c} สังเกตจาก $|\overline{y_1} - \overline{y_2}| < \sigma_{pt}$ แสดงให้เห็นว่าวัสดุทดสอบดังกล่าวมีความคงตัว ณ เวลาที่ทำการทดสอบ

1.3 การเตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ที่เตรียมจากเลือดผ่านกระบวนการไกลเคชัน

การเตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c} โดยการศึกษาสภาวะการไกลเคชันในหลอดทดลองประกอบด้วย 6 การทดสอบให้ผลดังต่อไปนี้

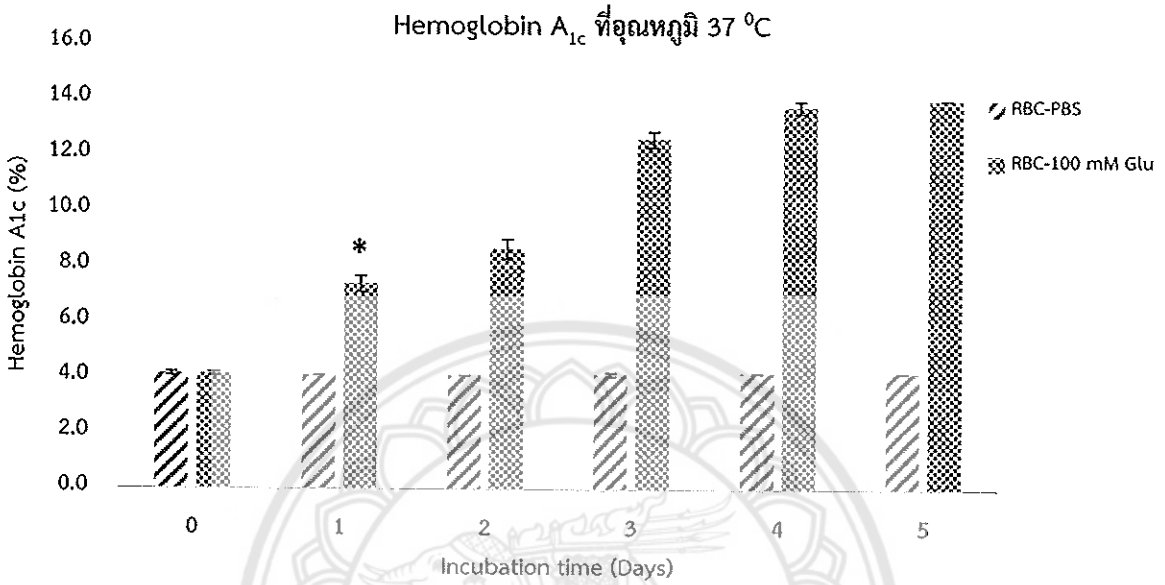
1.3.1 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่ม

การบ่มตัวอย่าง Red blood cell กับ PBS และตัวอย่าง Red blood cell กับ Glucose ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 วัน พบว่าการบ่มตัวอย่าง red blood cell กับ100 mM D-glucose เป็นระยะเวลา 5 วัน จะทำให้ปริมาณ HbA_{1c} เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน ลักษณะของวัสดุทดสอบมีสีแดงสด ไม่คล้ำ หรือดำ และเมื่อศึกษาปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นจะลดลงหลังการบ่มเป็นระยะเวลา 1 วัน ดังนั้นระยะเวลาในการบ่มที่เหมาะสมต่อการเกิดไกลเคชันและยังคงรักษาค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นให้อยู่ในระดับ 38-40% คือการบ่มเป็นเวลา 1 วัน (8-10 ชั่วโมง) ให้ผลการทดลองดัง**ภาพที่ 7, 8, 9 และ** 10

1.3.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดไกลเคชัน

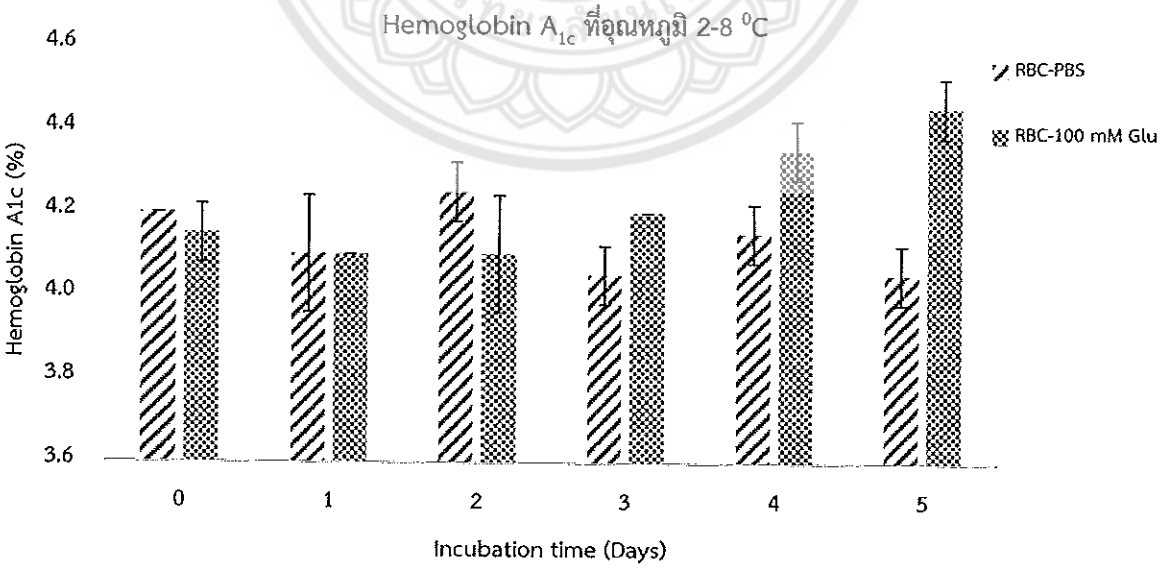
การบ่มตัวอย่าง Red blood cell กับ PBS และตัวอย่าง Red blood cell กับ Glucose ที่อุณหภูมิ 37 และ 2-8 °C พร้อมบันทึกปริมาณ HbA_{1c} และค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น เป็นระยะเวลา 5 วัน ได้ผลการทดลอง

ดัง **ภาพที่ 7, 8, 9 และ 10** การบ่มที่อุณหภูมิที่ 37 °C จะช่วยให้เกิดไกลเคชันได้ดีและปริมาณของ HbA_{1c} สูงขึ้นเมื่อเทียบกับสภาวะควบคุม การไกลเคชันที่ดีที่อุณหภูมิ 37 °C การที่เก็บรักษาเซลล์ที่อุณหภูมิ 2-8 °C



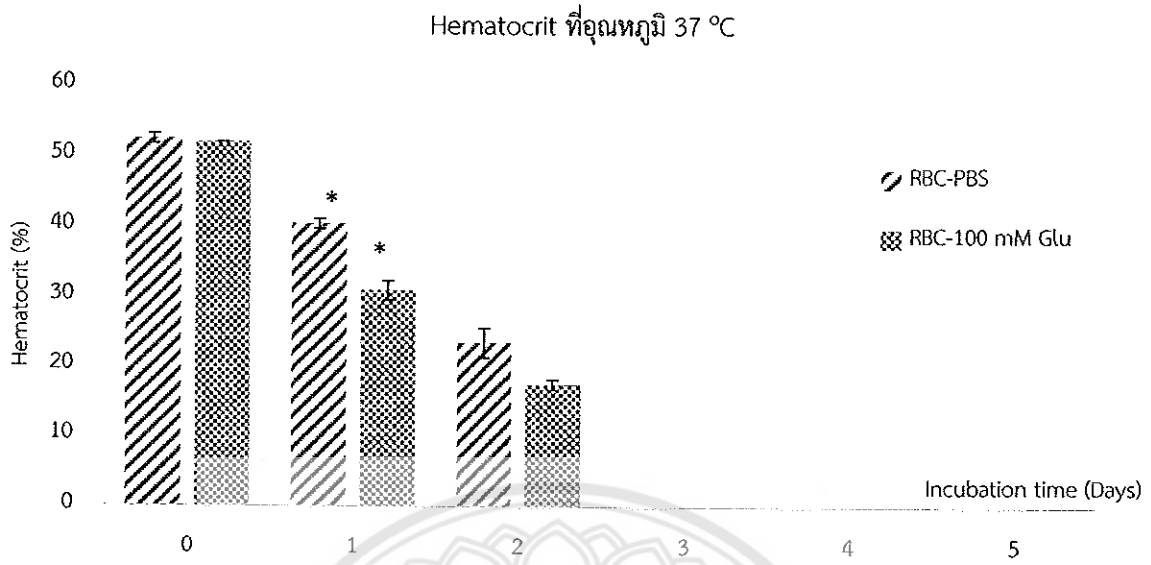
*มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ 0.05

ภาพที่ 7 แผนภาพแสดงปริมาณ HbA_{1c} หลังการบ่มตัวอย่าง 5 วันที่อุณหภูมิ 37 °C

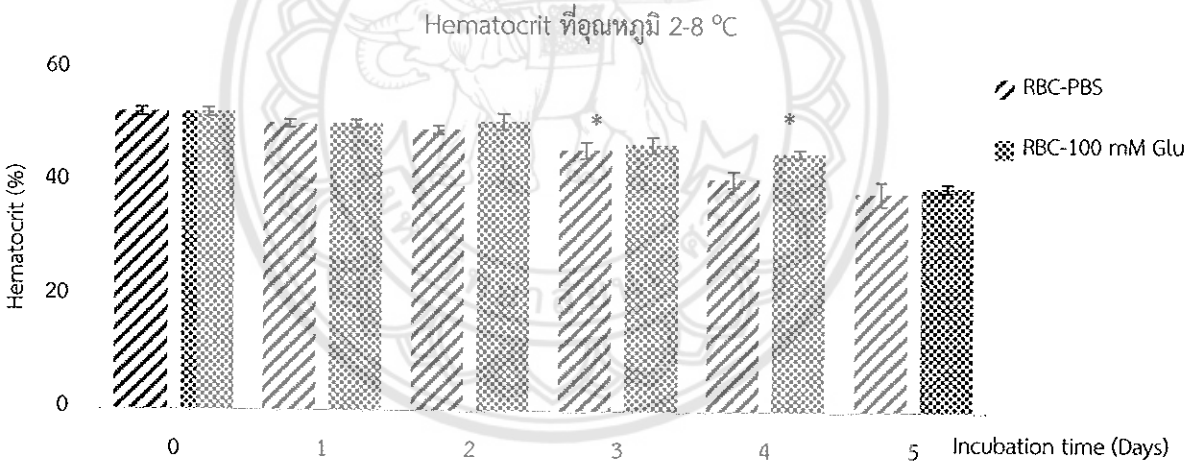


*มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ 0.05

ภาพที่ 8 แผนภาพแสดงปริมาณ HbA_{1c} หลังการบ่มตัวอย่าง 5 วันที่อุณหภูมิ 2-8 °C



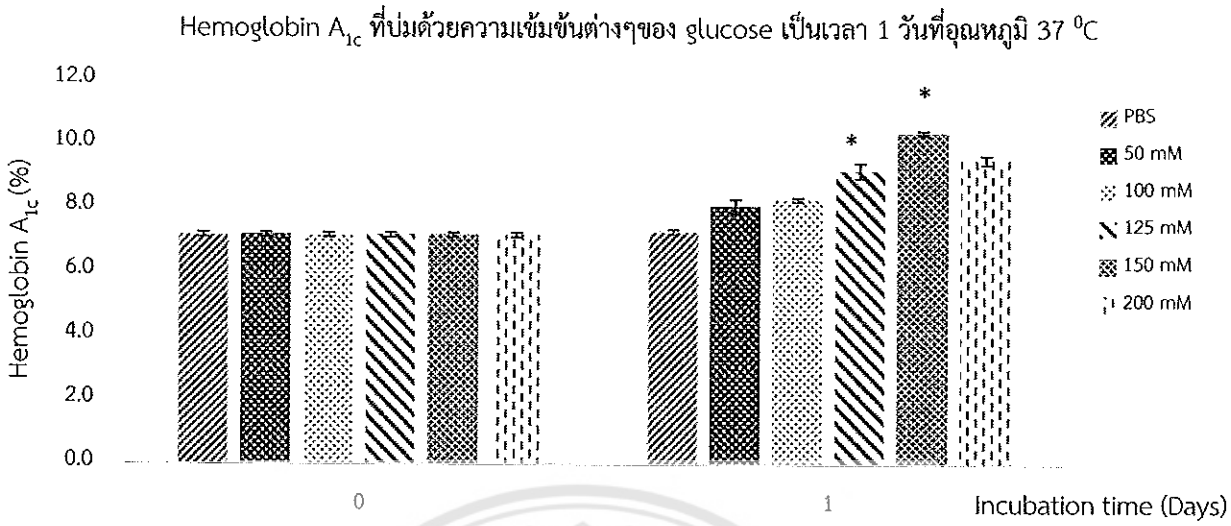
ภาพที่ 9 แผนภาพแสดงปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น หลังการบ่มตัวอย่าง 5 วันที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C



ภาพที่ 10 แผนภาพแสดงปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น หลังการบ่มตัวอย่าง 5 วันที่อุณหภูมิ 2-8 ^{0}C

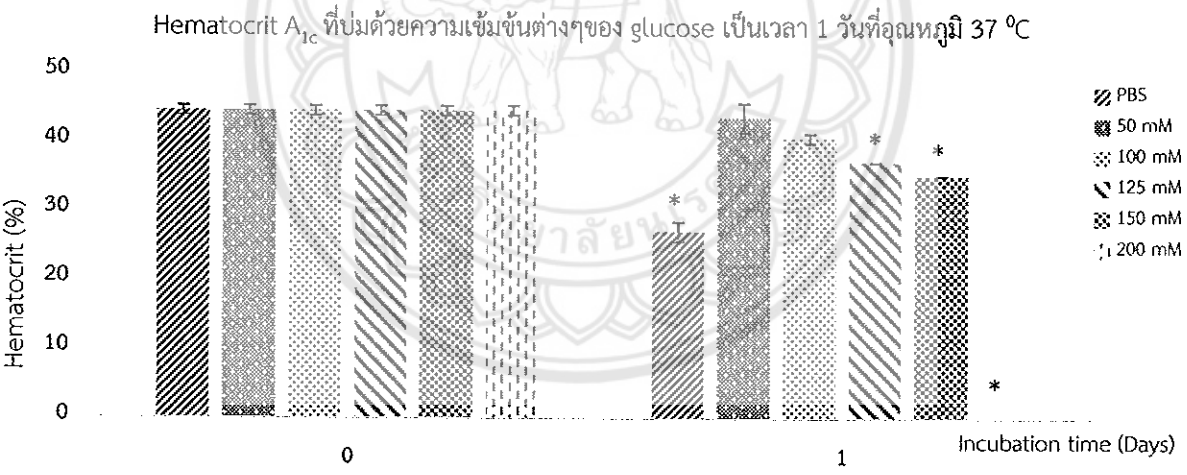
1.3.3 การศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมในการไกลเคชัน

จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าสารตั้งต้นที่เหมาะสมกต่อการไกลเคชันคือ red blood cell กับ ความเข้มข้น 50, 100, 125, 150 และ 200 mM โดยมี PBS เป็นตัวควบคุม นำแต่ละสภาวะไปบ่มที่ 37 ^{0}C เป็นระยะเวลา 2 วันพร้อมบันทึกปริมาณ HbA_{1c} และปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ได้ผลการทดลองดัง **ภาพที่ 11 และ 12**



*มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ภาพที่ 11 แผนภาพแสดงปริมาณ HbA_{1c} หลังการบ่มตัวอย่างA_{1c} ด้วยความเข้มข้นต่างๆของ glucose เป็นเวลา 1 วัน ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C



*มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

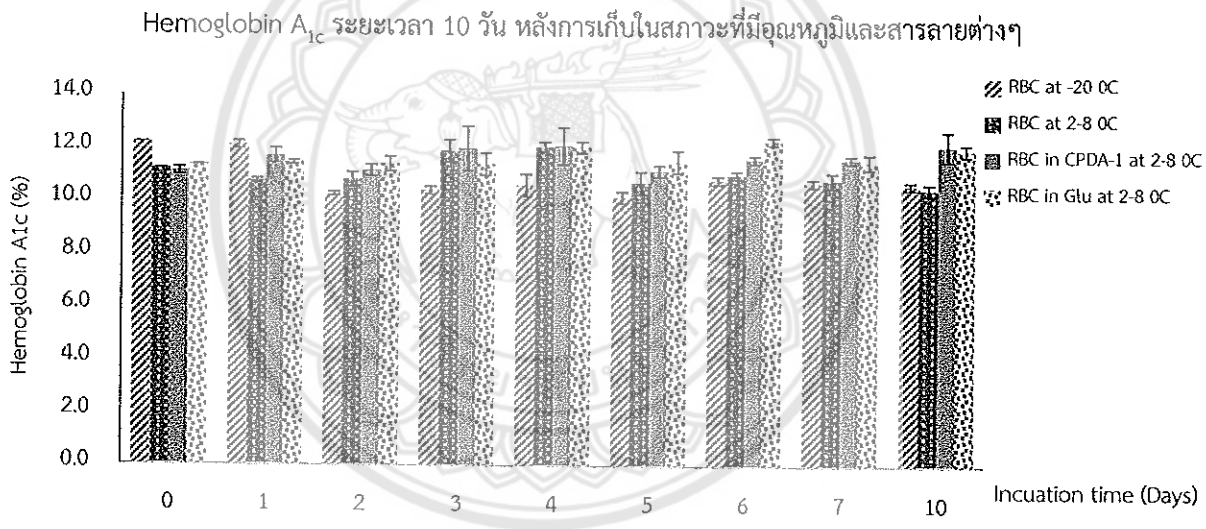
ภาพที่ 12 แผนภาพแสดงปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น หลังการบ่มด้วยความเข้มข้นต่างๆของ glucose เป็นเวลา 1 วัน ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C

การบ่มตัวอย่าง red blood cell กับ glucose ที่ความเข้มข้นต่างๆได้แก่ 50, 100, 125, 150 และ 200 mM โดยมี PBS เป็นตัวควบคุม หลังการบ่มเป็นเวลา 1 วัน พบว่าการบ่มที่ความเข้มข้น 150 และ 200 mM glucose จะให้ปริมาณของ HbA_{1c} ที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ 0.05 เมื่อเทียบกับตัวควบคุม (PBS) สำหรับการตรวจวัดปริมาณของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน ที่ความเข้มข้น 200 mM เกิด hemolysis 100% ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ 0.05 ระดับความเข้มข้นของ

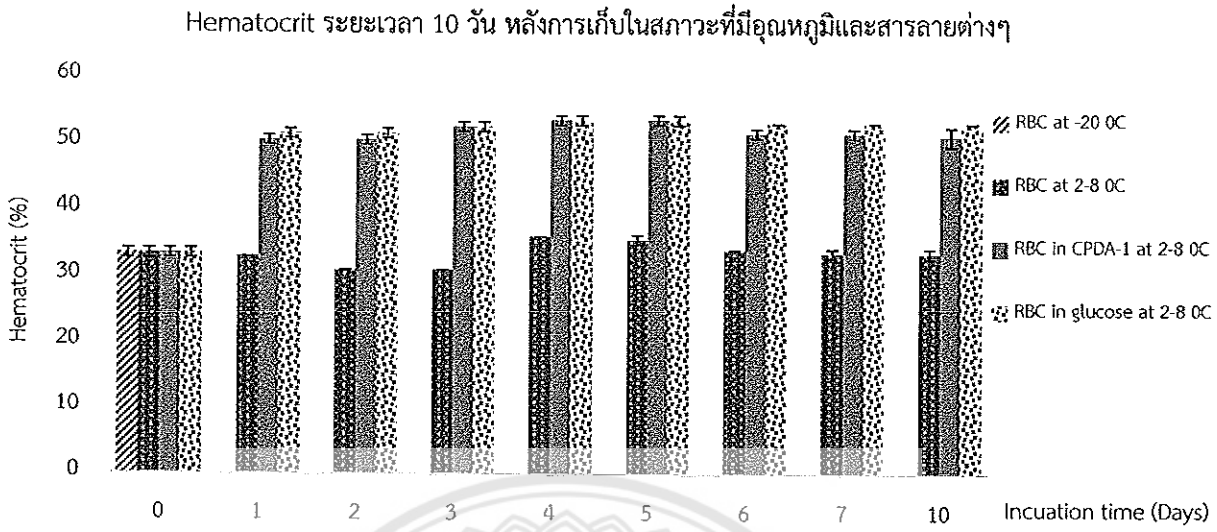
glucose เป็น 125, 150 และ 200 mM ดังนั้นในการศึกษาถัดไปจะใช้ระดับความเข้มข้นของ glucose ที่ 150 และ 200 mM ในการบ่มร่วมกับ red blood cell เป็นเวลา 1 วัน ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เพื่อรักษาปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นไม่ให้เกิด hemolysis

1.3.4 การศึกษาการหยุดปฏิริยาไกลเคชัน และสภาวะการเก็บรักษาเซลล์

ในกระบวนการไกลเคชันจะเกิดขึ้นได้เมื่อมี อุณหภูมิ ความเข้มข้นของน้ำตาล และสารตั้งต้นที่เหมาะสม ไกลเคชันจะเกิดสูงขึ้นจนกระทั่งเซลล์เม็ดเลือดแดงแตกหรือ hemolysis ดังนั้นกระบวนการหยุดปฏิกิริยาจึงมีความสำคัญ เพื่อให้คงรักษาระดับค่าของ HbA_{1c} และรักษาค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นให้มีคงที่ตลอดระยะเวลาการตรวจวัด การบ่ม red blood cell กับน้ำตาล glucose ที่ความเข้มข้น 200 mM ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 2 วัน พบว่า ตัวอย่างหลังการไกลเคชันจะถูกเก็บในสภาวะที่มีอุณหภูมิ -20 ^{0}C และ 2-8 ^{0}C



ภาพที่ 13 แผนภาพแสดงปริมาณ HbA_{1c} หลังการเก็บตัวอย่าง 10 วัน ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C



ภาพที่ 14 แผนภาพแสดงปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น หลังการเก็บตัวอย่าง 10 วัน ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C

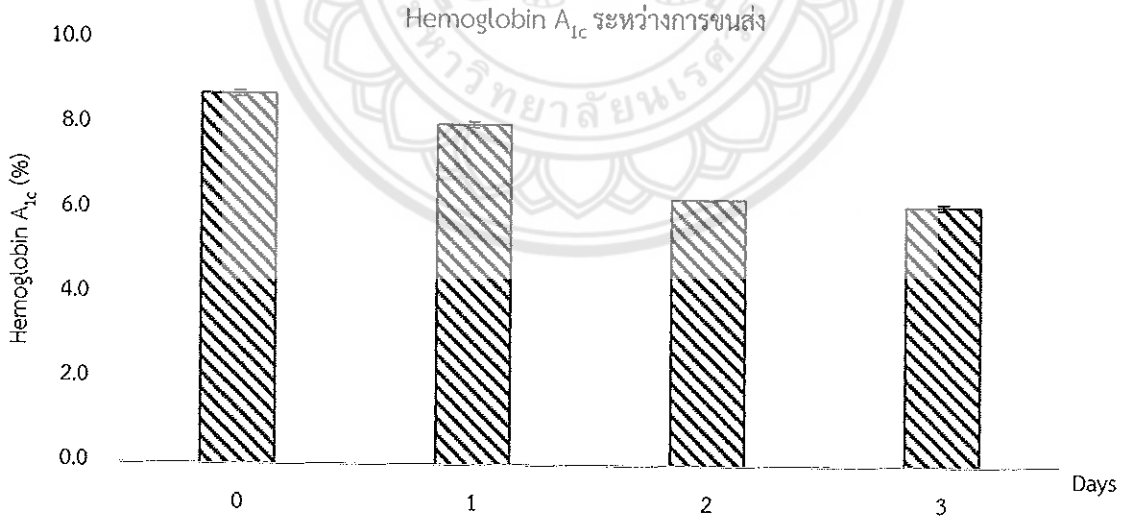
หลังการบ่ม red blood cell กับน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 200 mM เป็นระยะเวลา 1 วันที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C ระหว่างปฏิกิริยาจะให้ค่า HbA_{1c} ที่สูงขึ้น ดังนั้นระดับ HbA_{1c} ที่สูงขึ้นหลังการไกลเคชันจะต้องมีระดับคงที่หรือมีความคงตัว (stable) จึงต้องมีการจัดเก็บผลิตภัณฑ์ในสภาวะที่เหมาะสมหลังการไกลเคชัน ได้แก่ เก็บที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C หรือ 2-8 ^{0}C และสภาวะที่นำไปปั่นแยกเอาน้ำตาลส่วนเกินออกแล้วเติม CPDA-1 หรือ glucose แล้วเก็บที่ อุณหภูมิ 2-8 ^{0}C จากนั้นตรวจวัด HbA_{1c} และค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นและคำนวนด้วยสถิติ ISO 17034 จากภาพที่ 13 และ 14 ให้ผลการทดสอบดังนี้

a. การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์หลังการไกลเคชัน และเก็บวัสดุทดสอบที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C ระดับ HbA_{1c} และค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นไม่คงตัว (Not stable) เนื่องจากเกิดก่อนการนำมาวัดได้ตั้งวัสดุทดสอบทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที อาจทำให้เกิดการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง
b. การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์หลังการไกลเคชันที่อุณหภูมิ 2-8 ^{0}C ระดับ HbA_{1c} และค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมีความคงตัว (Stable) ในระยะเวลาที่ทำการศึกษาเป็นเวลา 3 เดือน
c. การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่ปั่นแยกน้ำตาลส่วนเกินแล้ว เติม CPDA-1 เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 ^{0}C ระดับ HbA_{1c} และค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมีความคงตัว (Stable)
d. การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่ปั่นแยกน้ำตาลส่วนเกินแล้ว glucose หลังการไกลเคชันที่อุณหภูมิ 2-8 ^{0}C ระดับฮีโมโกลบินเอวันซีและค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมีความคงตัว (Stable) ในระยะเวลาที่ทำการศึกษาเป็นเวลา 3 เดือน

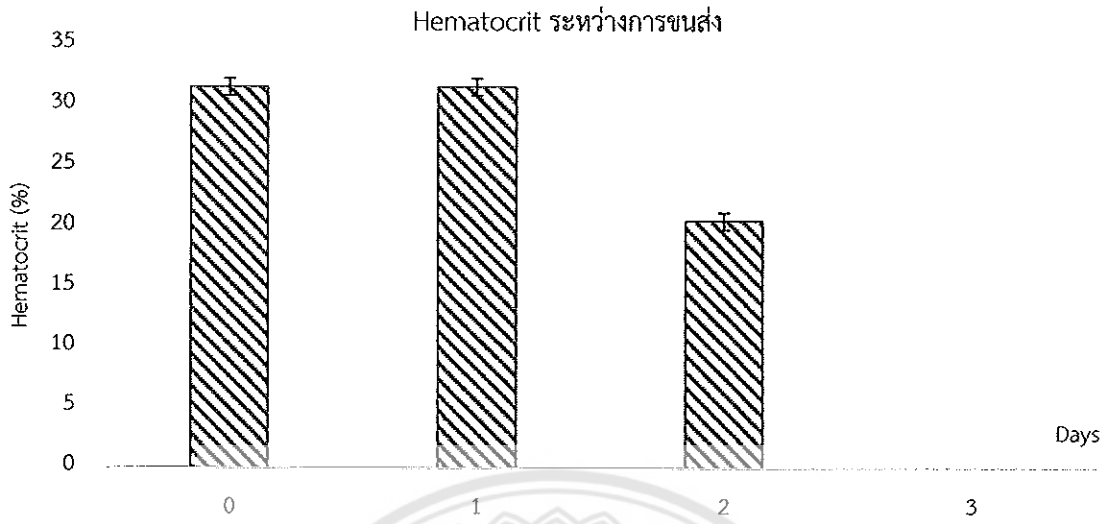
1.3.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิและความชื้นต่อความคงตัวของ HbA_{1c} และค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นระหว่างการขนส่ง

การศึกษาผลของอุณหภูมิและความชื้นต่อการตรวจวิเคราะห์ โดยจำลองการส่งวัสดุทดสอบไปยังสมาชิกหรือห้องปฏิบัติการอื่นๆ เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิและความชื้น โดยให้ผลการทดสอบดังภาพที่ 15

ภาพที่ 15 กราฟแสดงอุณหภูมิและความชื้นระหว่างการจำลองการขนส่ง



ภาพที่ 16 กราฟแสดงปริมาณของ HbA_{1c} ลดลงระหว่างการขนส่งเป็นเวลา 3 วัน



ภาพที่ 17 กราฟแสดงปริมาณของ Hct. ลดลงระหว่างหารขนส่งเป็นเวลา 3 วัน

เตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ที่เตรียมขึ้น ที่ความเข้มข้นต่างๆ 200 mM ใส่ในกล่องที่บรรจุด้วยจลเย็น และ data logger แล้วจำลองการจัดส่งไปยังห้องปฏิบัติการต่างๆ ในระยะเวลา 3 วัน พบว่า HbA_{1c} จะลดลง เนื่องจากมีอุณหภูมิสูงขึ้น เจลเย็นกล่องบรรจุเริ่มละลายเนื่องจากอุณหภูมิสูงระหว่างการขนส่ง และค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นลดลงเป็นศูนย์ เนื่องจากอุณหภูมิสูงขึ้นทำให้มีผลต่อการเกิด hemolysis ดังนั้นสมาชิกที่ต้องใช้เวลาในการขนส่งนานเกิน 2 หรือ 3 วันอาจส่งผลเสียหายต่อวัสดุทดสอบได้ อาจมีการเพิ่มปริมาณของเจลเย็น หรือมีมาตรการในการขนส่งที่เหมาะสม ภายในระยะเวลา 1-2 วันถึงสมาชิกเพื่อทำการทดสอบ

1.3.6 การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวของวัสดุทดสอบ HbA_{1c}

การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของวัสดุทดสอบตามมาตรฐานการผลิตวัสดุอ้างอิง ISO 17034; guide 35 สามารถทำได้โดย 2 วิธีคือ

a. Between-units homogeneity testing; สามารถทำการสุ่มตัวอย่างใน 1 batch การผลิตนั้นๆ เพื่อตรวจสอบหาปริมาณ HbA_{1c}
b. Within-unit homogeneity testing; เป็นการสุ่มตรวจสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของวัสดุทดสอบหลังการดูแบ่งตัวอย่างใส่หลอดทดลองขนาดเล็ก เพื่อตรวจสอบว่าทุกหลอดที่ดูแบ่งใส่หลอดเก็บขนาด 0.5 mL นั้น ทุกหลอดมีค่าของ HbA_{1c} ที่เท่ากันทุกหลอดในแต่ละวิธีจะสุ่มตัวอย่างจำนวน 10 หลอด วัดซ้ำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ผลการตรวจวิเคราะห์แสดงดังต่อไปนี้

1.4 นำวัสดุทดสอบที่เตรียมได้ไปใช้ในโปรแกรมการทดสอบความชำนาญ

วัสดุทดสอบ HbA_{1c} ที่เตรียมจากเลือดในสารละลาย CPDA-1 ผ่านการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวดันและความคงตัวแล้ว จะถูกนำมาใช้งานจริงโดยการส่งให้สมาชิกจำนวน 200 แห่ง และรอรับผลการตรวจวิเคราะห์สำหรับวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ที่เตรียมจากกระบวนการไกลเคชัน จะใช้งานจริงในรอบการประเมินปี 2563 หลังการจัดส่งให้สมาชิก ผลการทดสอบห้องปฏิบัติการทั้งหมด 200 แห่งถูกนำมาประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการโดยการกำหนดค่า z score ที่อยู่ในช่วง -2 ถึง 2 เท่านั้น จึงจะถือว่าห้องปฏิบัติการดังกล่าวมีผลการประเมินเป็นที่น่าพึงพอใจ จากนั้นกลุ่มห้องปฏิบัติการที่ผ่านการประเมิน จะถูกคัดเลือกมาเป็นกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการกำหนดค่าวัสดุทดสอบต่อไป โดยการหาค่า mean ของผลการทดสอบ และการคำนวณหา uncertainty โดยอาศัยการคำนวณตามข้อกำหนดใน ISO 15189:2012 Requirements for Measurement Uncertainty in the Clinical Laboratory

1.4.1 นำตัวอย่างทดสอบที่เตรียมไปใช้ในโปแกรมทดสอบความชำนาญ

การเข้าร่วมโปรแกรมการทดสอบความชำนาญระหว่างห้องปฏิบัติการ (Proficiency testing) เป็นกระบวนการควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์กับองค์กรภายนอก (External quality control) ซึ่งเป็นขั้นตอนที่จำเป็นต้องดำเนินการตามที่ระบุในข้อกำหนดของ International Standard ISO 15189: Medical laboratories-particular requirements for quality and competence Third-edition 2012-11-01 สำหรับการเข้าร่วมโปรแกรมการทดสอบความชำนาญการตรวจวัดปริมาณฮีโมโกลบิน เอวันซี ประจำปี 2562 กับ เอ็นยู เอ็มแอลซี ศูนย์ทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ บริษัท วี เมด แล็บ เซ็นเตอร์ จำกัด เพื่อทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการตรวจ HbA_{1c} นั้นทำโดยการประเมินผลผู้รับบริการเปรียบเทียบกับค่ากำหนด (Assigned value) ของแต่ละรหัสวัสดุทดสอบความชำนาญ

วัสดุทดสอบความชำนาญจัดเตรียมโดยห้องปฏิบัติการ จัดเตรียมโดยฝ่ายผลิตวัสดุทดสอบของบริษัท วี เมด แล็บ เซ็นเตอร์ จำกัด ประกอบด้วย ตัวอย่างวัสดุทดสอบที่ทราบช่วงค่า $\%HbA_{1c}$ บรรจุในหลอดพลาสติกใสหลอดละ 300 ไมโครลิตร จัดส่งให้ผู้รับบริการ 2 ตัวอย่าง ได้แก่ระดับต่ำและระดับสูง ทั้งหมดจำนวน 400 ตัวอย่างวัสดุทดสอบ โดยวัสดุทดสอบความชำนาญได้รับการตรวจสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity test) และความคงตัว (Stability test) โดยห้องปฏิบัติการ วิเคราะห์ทางสถิติตาม ISO 13528:2015 Statistical Methods for use in Proficiency testing by Interlaboratory Comparison. วัสดุถูกจัดส่งไปสมาชิกที่เข้าร่วมโครงการ 2 รอบ/ปี โดยรอบการจัดส่งเป็นดังนี้

รอบที่ 1 เดือนพฤษภาคม 2562 จำนวน 148 แห่ง

รอบที่ 2 เดือนกันยายน 2562 จำนวน 148 แห่ง

1.4.2 ผลการดำเนินการการเข้าร่วมโปรแกรมการทดสอบความชำนาญ ฯ

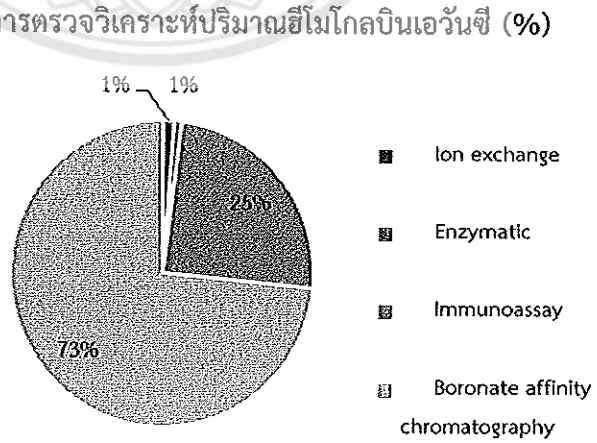
การดำเนินงาน ปี 2562 มีห้องปฏิบัติการเข้าร่วมโปรแกรม จำนวนทั้งหมด 148 แห่ง อัตราการตอบผลกลับ ดังตารางที่ 8 ผลการตรวจวิเคราะห์มีการรับส่งข้อมูลผ่านอีเมล ทั้งนี้ระบบเว็บไซต์อยู่ในช่วงรอการใช้งานจริง

ตารางที่ 8 แสดงอัตราการตอบผลกลับ จำแนกตามจำนวนหน่วยงาน และจำนวนเครื่องทั้งหมดในแต่ละรอบ

หน่วยงาน	จำนวนห้องปฏิบัติการและเครื่องที่ตอบผลกลับ / จำนวนทั้งหมด	
	รอบที่ 1 (2562)	รอบที่ 2 (2562)
โรงพยาบาลและคลินิก	132/148 (ร้อยละ 89.19)	126/148 (ร้อยละ 85.14)
จำนวนเครื่อง	133/149 (ร้อยละ 89.26)	127/149 (ร้อยละ 85.23)

รอบที่ 1 จำนวน 148 แห่ง รวมทั้งหมด 149 เครื่อง ส่งผลตอบกลับมาจำนวน 132 แห่ง จำนวน 133 เครื่อง
รอบที่ 2 จำนวน 148 แห่ง รวมทั้งหมด 149 เครื่อง ส่งผลตอบกลับมาจำนวน 126 แห่ง จำนวน 127 เครื่อง

จำนวนโรงพยาบาลที่เข้าร่วมโครงการได้แก่หลักการการตรวจวัดดังต่อไปนี้ Boronate affinity, Immunoassay, Enzymatic และ Ion-exchange การใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการผู้รับบริการจากการตอบผลกลับทั้ง 2 รอบดำเนินการพบว่าผู้รับบริการมีการใช้เครื่องมือตรวจวิเคราะห์ HbA_{1c} 4 หลักการ 16 ชนิดของเครื่องมือ คิดเป็นร้อยละของแต่ละหลักการดังแสดงในภาพที่ 18



ภาพที่ 18 แสดงหลักการและชนิดของเครื่องมือที่ห้องปฏิบัติการผู้รับบริการใช้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ HbA_{1c} ประจำปี 2562

โรงพยาบาลที่เข้าร่วมโครงการจำนวน 149 เครื่อง หลักการ Boronate affinity, Immunoassay, Ion exchange และ Enzymatic คิดเป็น 73%, 25%, 1% เละ1% ตามลำดับ การประเมินผลการทดสอบความชำนาญการตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c} ปี 2562 ประเมินโดยเปรียบเทียบผลของผู้รับบริการกับค่ากำหนด (Assigned value) ซึ่งคำนวณจากค่าพ้องกลุ่ม (Consensus value from participant results) โดยใช้สถิติ z score และ z' score

ผลการประเมิน mean, SD และ %CV แบ่งตามหลักการของเครื่องมือตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการ แสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงผลวิเคราะห์ mean, SD และ %CV แบ่งตามหลักการหลักการของเครื่องมือตรวจวิเคราะห์

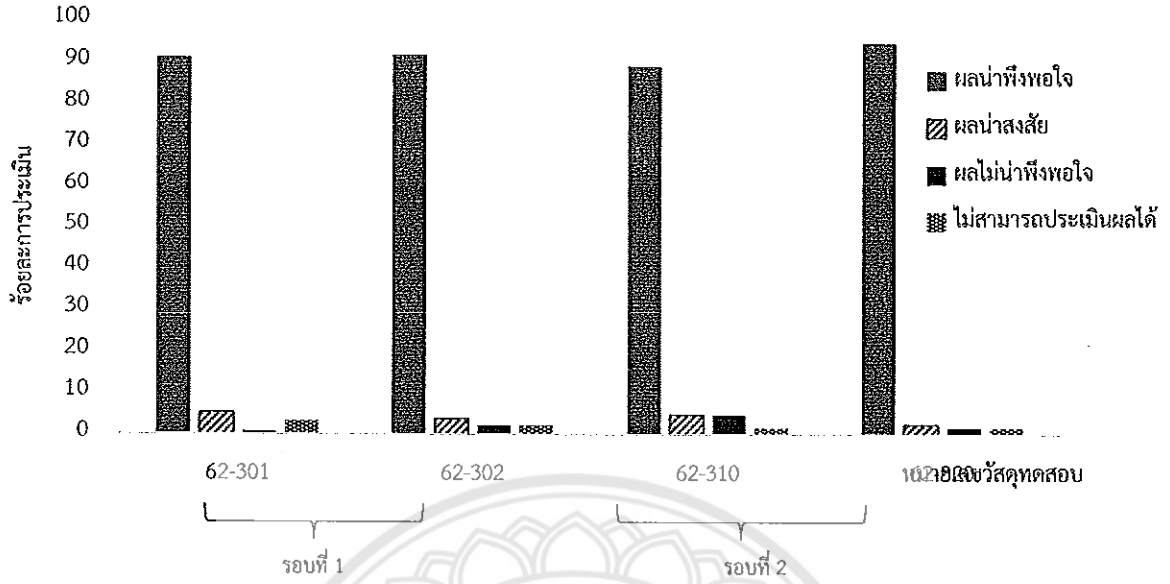
รอบที่	หลักการ	จำนวนเครื่องที่ส่งผลกลับ	ระดับสูง			ระดับกลาง		
			Mean	SD	%CV	Mean	SD	%CV
1	Boronate affinity chromatography	99	12.23	1.02	8.34	7.04	0.67	9.52
	Immunoassay	29	9.89	1.82	18.40	5.06	0.67	13.24
2	Boronate affinity chromatography	91	9.45	0.68	7.20	5.40	0.50	9.26
	Immunoassay	34	8.59	1.43	16.65	4.94	0.56	11.34

1.4.3 การประเมินผลการทดสอบความชำนาญ

การดำเนินงานปี 2562 พบห้องปฏิบัติการผู้รับบริการที่รายงานผลอยู่ในเกณฑ์เป็นที่น่าพึงพอใจ น่าสงสัย และไม่น่าพึงพอใจ ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงจำนวนห้องปฏิบัติการผู้รับบริการแยกตามการประเมินผลการทดสอบความชำนาญ

รอบการดำเนินงานปี 2562	ระดับวัสดุทดสอบความชำนาญ	จำนวนห้องปฏิบัติการ (เครื่อง) (ร้อยละของเครื่องที่ส่งผลกลับ)			
		ผลน่าพึงพอใจ (Satisfactory)	ผลน่าสงสัย (Questionable)	ผลไม่น่าพึงพอใจ (Unsatisfactory)	*ไม่สามารถประเมินผลได้
รอบที่ 1	ระดับสูง	121 (90.98)	7 (5.26)	1 (0.75)	3 (2.26)
	ระดับกลาง	122 (91.73)	5 (3.76)	3 (2.26)	3 (2.26)
รอบที่ 2	ระดับสูง	113 (88.98)	6 (4.72)	6 (4.72)	2 (1.57)
	ระดับกลาง	120 (94.49)	3 (2.36)	2 (1.57)	2 (1.57)



รูปที่ 19 แสดงร้อยละการประเมิน ผลการทดสอบความชำนาญการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ HbA_{1c} ปี 2562

รอบที่ 1;

จำนวน 148 แห่ง รวมทั้งหมด 149 เครื่อง ส่งผลตอบกลับมาจำนวน 132 แห่ง จำนวน 133 เครื่อง พบว่าวัสดุทดสอบมีผลการประเมินเป็นที่น่าพึงพอใจ เป็นดังนี้

- ระดับสูง จำนวน 121 เครื่อง (90.98%)
- ระดับกลาง จำนวน 122 เครื่อง (91.73%)

รอบที่ 2;

จำนวน 148 แห่ง รวมทั้งหมด 149 เครื่อง ส่งผลตอบกลับมาจำนวน 126 แห่ง จำนวน 127 เครื่อง พบว่าวัสดุทดสอบมีผลการประเมินเป็นที่น่าพึงพอใจ เป็นดังนี้

- ระดับสูง จำนวน 113 เครื่อง (88.98%)
- ระดับกลาง จำนวน 120 เครื่อง (94.49%)

สมาชิกที่มีผลการเป็นที่น่าพึงพอใจในแต่ละรอบปี จะนำมาเป็นกลุ่มตัวอย่างในการคำนวนการกำหนดค่า (Characterization) และการคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวัด (uncertainty)

1.4.4 กำหนดค่า (Characterization) และการคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวัด (uncertainty)

การหาค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวัด หาได้จากการคัดเลือกสมาชิกที่ผ่านเกณฑ์การประเมิน (Satisfactory Result) เพื่อใช้ข้อมูลการตรวจวิเคราะห์หาค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวัด หรือ

uncertainty ผลการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวัดหาปริมาณ HbA_{1c} ปี 2563 แสดงดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ด้วยหลักการ Boronate affinity และ Immunoassay

รอบ	Lot No.	Boronate affinity			Immunoassay		
		Mean	U	Mean±U	Mean	U	Mean±U
1	301	12.32	1.86	11.08 -13.05	10.00	1.89	8.74 – 11.26
	302	6.97	1.66	5.86 -8.08	5.06	1.66	3.95 – 6.17
2	310	9.33	1.35	8.43-10.23	8.43	1.37	7.52 – 9.34
	320	5.38	0.31	5.17- 5.59	4.82	0.32	4.60 – 5.03

Uncertainty (U) คือค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวัด

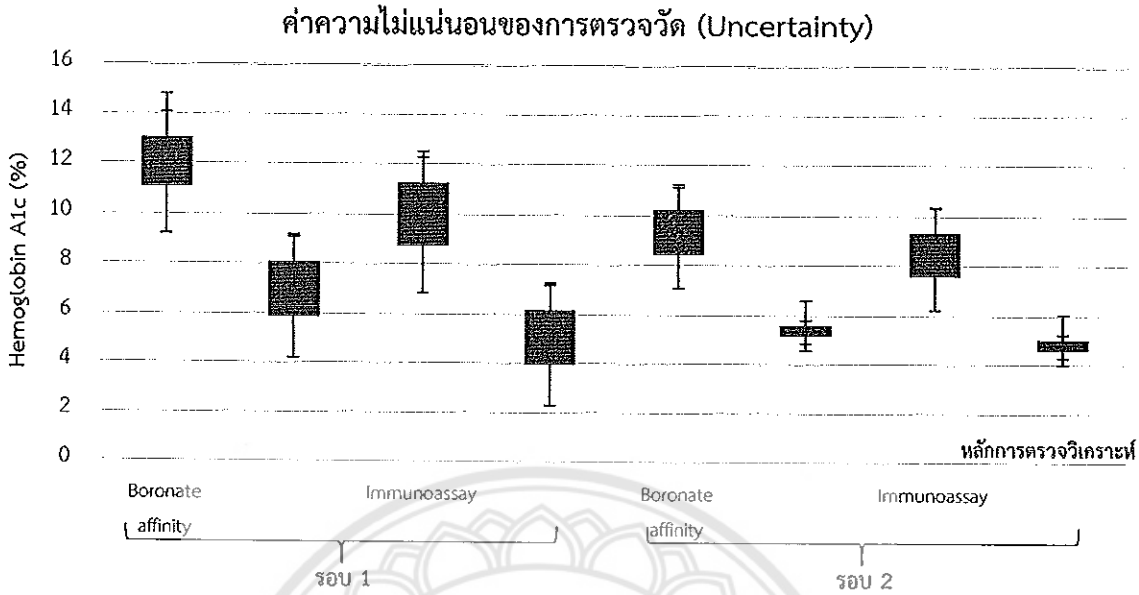
รอบที่ 1;

หลักการ Boronate affinity ให้ค่าความไม่แน่นอนเท่ากับ 1.86 (62-301) และ 1.66 (62-302) พบว่าวัสดุทดสอบหมายเลข 62-301 จะมีช่วงค่าที่ 11.08 – 13.05 % และ วัสดุทดสอบหมายเลข 62-302 จะมีช่วงค่าที่ 5.86 – 8.08 % หลักการ Immunoassay ให้ค่าความไม่แน่นอนเท่ากับ 1.89 (62-301) และ 1.66 (62-302) พบว่าวัสดุทดสอบหมายเลข 62-301 จะมีช่วงค่าที่ 8.74 - 11.26% และ วัสดุทดสอบหมายเลข 62-302 จะมีช่วงค่าที่ 3.95 - 6.17%

รอบที่ 2;

หลักการ Boronate affinity ให้ค่าความไม่แน่นอนเท่ากับ 1.35 (62-310) และ 0.31 (62-320) พบว่าวัสดุทดสอบหมายเลข 62-310 จะมีช่วงค่าที่ 8.43 – 10.23% และ วัสดุทดสอบหมายเลข 62-320 จะมีช่วงค่าที่ 5.17 – 5.59% หลักการ Immunoassay ให้ค่าความไม่แน่นอนเท่ากับ 1.37 (62-310) และ 0.32 (62-320) พบว่าวัสดุทดสอบหมายเลข 62-310 จะมีช่วงค่าที่ 7.52 – 9.34% และ วัสดุทดสอบหมายเลข 62-320 จะมีช่วงค่าที่ 4.60 – 5.03%

เมื่อเปรียบเทียบผลการประเมินวัสดุทดสอบจากฝ่ายทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ศูนย์เอ็นยู เอ็มแอลซี บริษัทวี เมด แล็บ เซ็นเตอร์ จำกัด และผลการประเมินห้องปฏิบัติการที่ผ่านการประเมินการทดสอบความชำนาญ มีค่า Z score ผ่านตามเกณฑ์การประเมิน $-2 < |Z\ score| < 2$ แล้วนำค่าความไม่แน่นอนมาเปรียบเทียบผลวัสดุทดสอบพบผลทดสอบดังภาพที่ 20



Bar graph แสดงค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวัดในแต่หลักการ

ภาพที่ 20 ภาพแสดงค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวัด

1.4.5 สาเหตุและแนวทางแก้ไข สำหรับห้องปฏิบัติการผู้รับบริการที่มีผลการตรวจวิเคราะห์เป็นที่ไม่น่าพึงพอใจ

พบห้องปฏิบัติการผู้รับบริการได้รับการประเมินผลไม่น่าพึงพอใจ (Unsatisfactory Result) มีทั้งได้ค่าต่ำกว่าและค่าสูงกว่าค่ากำหนด ซึ่งอาจมีสาเหตุความผิดพลาดและแนวทางการแก้ไขดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ตารางแสดงสาเหตุความผิดพลาดและแนวทางการแก้ไข

สาเหตุความผิดพลาด	แนวทางแก้ไข
1. วิธีการตรวจไม่ถูกต้อง	- ทบทวนวิธีการตรวจให้ตรงตามที่บริษัทกำหนด - ตรวจสอบอุณหภูมิห้องให้อยู่ในช่วงที่เครื่องสามารถทำงานได้ดี
2. การเก็บรักษาน้ำยาในสภาวะที่ไม่เหมาะสมหรือใช้น้ำยาหมดอายุ	- เก็บน้ำยาในอุณหภูมิที่เหมาะสม และนำมาไว้ให้มีอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิที่จะทำการวิเคราะห์ก่อนการตรวจวิเคราะห์ - การตรวจที่ใช้แถบทดสอบไม่ควรเก็บในสภาวะที่มีความชื้น - ควรตรวจสอบอายุของน้ำยา/แถบทดสอบ - ควรตรวจสอบระยะเวลาในการเปิดใช้น้ำยา/แถบตรวจ ไม่ควรเกินตามที่บริษัทกำหนด
3. การผสมวัสดุทดสอบความชำนาญไม่เป็นเนื้อเดียวกัน	- ควรผสมตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน และควรระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศขณะผสมตัวอย่าง

สาเหตุความผิดพลาด	แนวทางแก้ไข
4. เก็บวัสดุทดสอบความชำนาญในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม	- ควรเก็บวัสดุทดสอบความชำนาญตามเอกสารคำแนะนำที่แนบมาพร้อมกับตัวอย่าง (2-8 °C) และควรวางไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนการตรวจวิเคราะห์
5. เครื่องมือ	- ควรได้รับการบำรุงรักษาตามที่บริษัทกำหนด - ควรมีการสอบเทียบเครื่องมือประจำปี
6. การควบคุมคุณภาพ	- ควรทำ IQC ตามระยะเวลาที่กำหนด ในระดับและความถี่ตามกำหนด

การศึกษาที่ 2
เพื่อพัฒนาระบบการประเมินผลข้อมูลตามมาตรฐาน ISO 13528 สำหรับการตรวจวิเคราะห์ HbA_{1c} ผ่านเว็บไซต์อย่างเต็มรูปแบบ

ระบบเว็บไซต์สามารถใช้งานได้ทั้งแอดมิน (admin) และผู้รับบริการ (user) โดยแอดมินจะดำเนินการสมัครสมาชิกให้กับผู้รับบริการ หลังจากนั้นแอดมินจะแจ้ง ชื่อเข้าใช้งาน (username) และรหัสผ่าน (password) ให้แก่ผู้รับบริการใช้ในการเข้าสู่ระบบเพื่อลงผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณฮีโมโกลบิน เอวันซี แอดมินสามารถตั้งค่าแบบฟอร์มการลงผลการตรวจวิเคราะห์ได้ สามารถเพิ่มเครื่องที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ และอัพโหลดเอกสารรายงานผลเบื้องต้น รายงานประจำรอบ และรายงานผลประจำปีลงในระบบเว็บไซต์ให้ผู้รับบริการสามารถดาวน์โหลดได้ในระบบ การพัฒนาโปรแกรมซอฟต์แวร์ขึ้นมาจากเดิมที่มีอยู่ มีหลักการในการดำเนินงานตามหลักของวิศวกรรมซอฟต์แวร์ ในเรื่องของกระบวนการผลิตซอฟต์แวร์ โดยมีรายละเอียดการดำเนินงาน ดังนี้

1. Software specification คือ นิยามหน้าที่ต่าง ๆ ที่ต้องมีในซอฟต์แวร์ และระบุข้อจำกัดต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนาซอฟต์แวร์

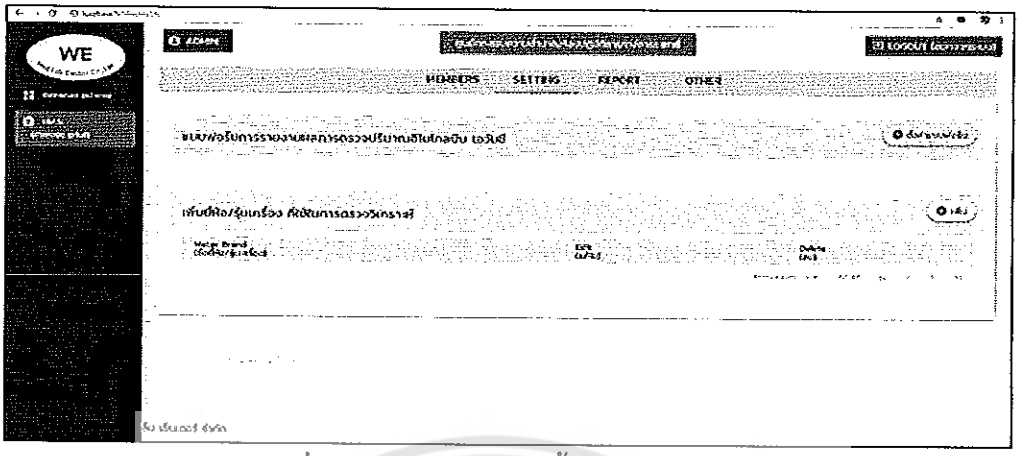
2. Software Design and Implementation คือ ทำการสร้าง/พัฒนาซอฟต์แวร์ให้ตรงกับข้อกำหนด (specification)

3. Software validation คือทำการตรวจสอบความถูกต้องของซอฟต์แวร์เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าซอฟต์แวร์ ที่ผลิตขึ้นได้ตรงกับความต้องการของผู้ใช้งาน

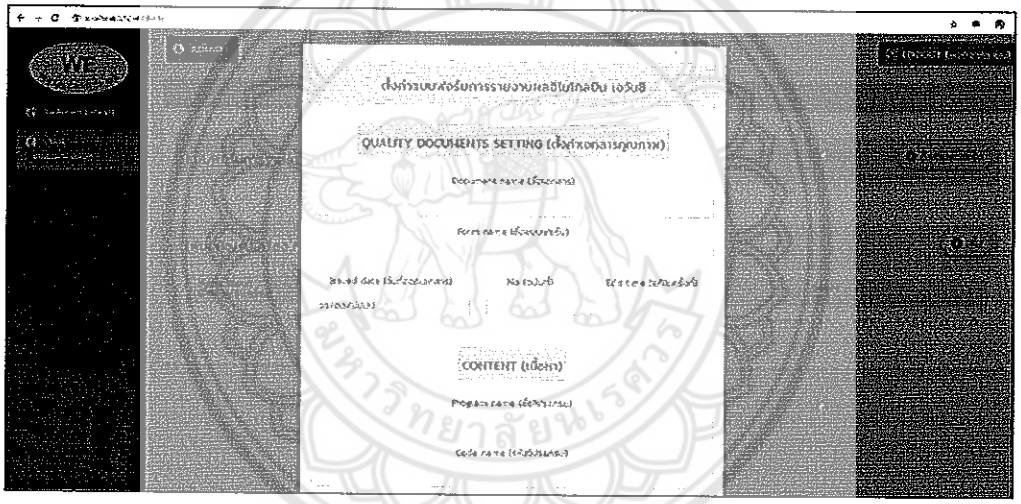
4. Software evolution ในทางปฏิบัติเมื่อซอฟต์แวร์ใช้งานได้ระยะหนึ่งแล้ว ผู้ใช้อาจมีความต้องการเพิ่มเติมหรือเปลี่ยนแปลงความต้องการบางอย่าง

ข้อมูลเบื้องต้นยังอยู่ในกระบวนการทดลองใช้งานจากผู้ที่เกี่ยวข้อง และการประเมินโดยผู้เชี่ยวชาญ และจะนำมาใช้จริงในปี 2563 ตัวอย่างหน้าเว็บไซต์ที่สร้างขึ้น

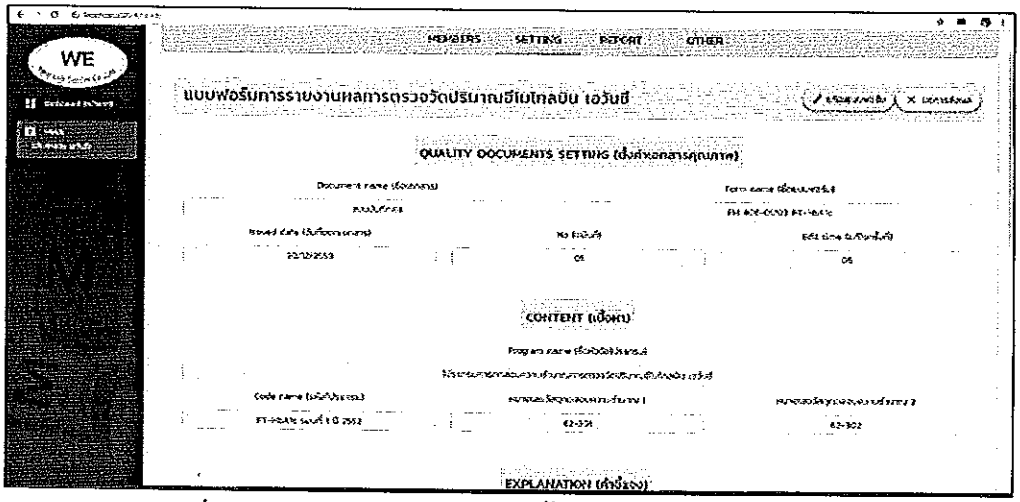
Mockup โปรแกรมการทดสอบความชำนาญการตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c} (แอดมิน)



ภาพที่ 21 หน้าจอแสดงการตั้งค่าสำหรับแอดมิน

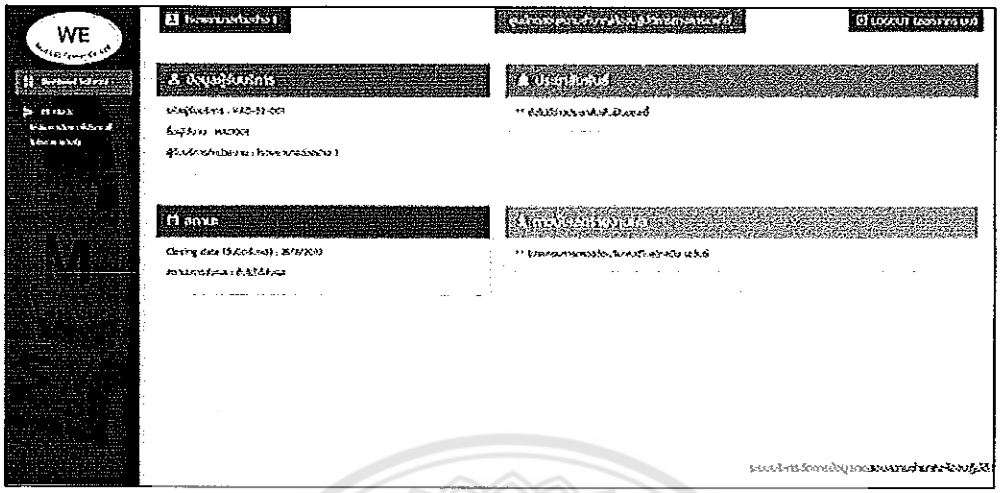


ภาพที่ 22 หน้าจอแสดงรายละเอียดข้อมูลที่แอดมินสามารถตั้งค่าลงไปในแบบฟอร์มการรายงานผลได้

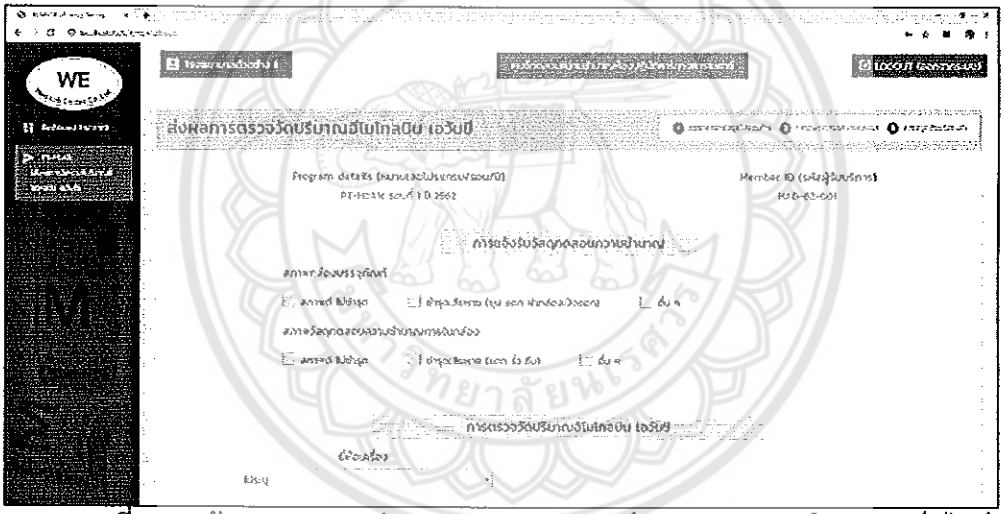


ภาพที่ 23 หน้าจอแสดงตัวอย่างการตั้งค่าแบบฟอร์มการรายงานผล

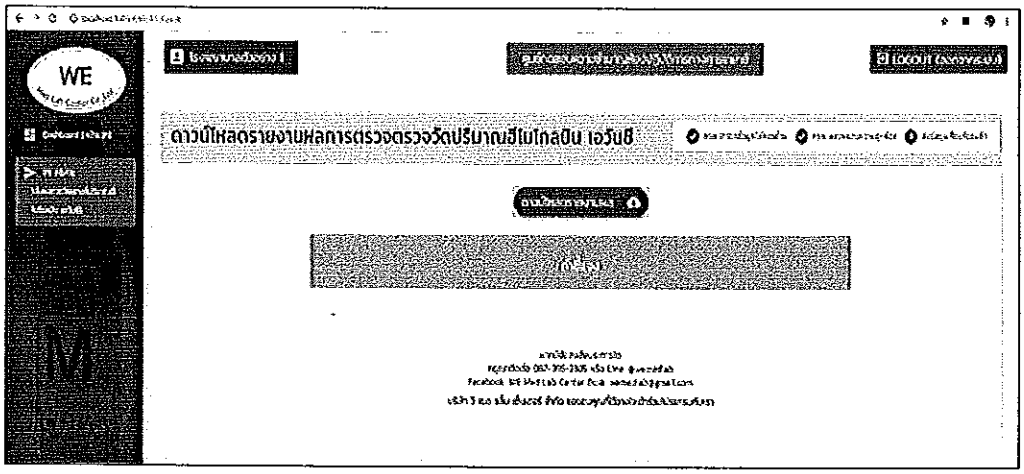
Mockup โปรแกรมการทดสอบความชำนาญการตรวจวัดปริมาณ HbA_{1c} (ผู้รับบริการ)



ภาพที่ 24 หน้าจอแสดงข้อมูลของผู้รับบริการ ข่าวประชาสัมพันธ์



ภาพที่ 25 หน้าจอแสดงการส่งผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ HbA_{1c} ในระบบเว็บไซต์



ภาพที่ 26 หน้าจอแสดงเมื่อกดยืนยันการส่งผลเรียบร้อยแล้ว สามารถดาวน์โหลดรายงานเก็บได้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาการพัฒนาวัสดุอ้างอิงสำหรับตรวจวิเคราะห์ HbA_{1c} โดยศึกษาคุณสมบัติของวัสดุทดสอบที่เตรียมจากเลือดในสารละลาย CPDA-1 กับ HbA_{1c} ที่เตรียมจากกระบวนการไกลเคชัน โดยวัสดุทดสอบที่เตรียมจากเลือดในสารละลาย CPDA-1 เป็นวิธีที่ใช้ในการผลิตวัสดุทดสอบในปัจจุบัน แต่ยังมีข้อจำกัดของการขนส่งเนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดแดงระหว่างการขนส่ง เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่สูงจัดในบางพื้นที่ที่ขนส่ง อีกทั้งการผลิตวัสดุอ้างอิงสำหรับตรวจวิเคราะห์ HbA_{1c} ในระดับความเข้มข้นสูงๆมักพบปัญหาคือไม่สามารถผลิตได้เนื่องจากมีข้อจำกัดในการเจาะเก็บเลือดจากผู้ป่วยเบาหวาน ทำให้นักวิจัยมีการคิดค้นวิธีใหม่หรือการจับกันของน้ำตาลและฮีโมโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดง หรือการพัฒนากรรมวิธีการเตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ที่เตรียมจากเลือดผ่านกระบวนการไกลเคชัน นำมาสู่กระบวนการผลิต HbA_{1c} ในระดับความเข้มข้นสูงๆได้

การศึกษาคุณสมบัติและอายุของตัวอย่างเลือด

การศึกษาคุณสมบัติและอายุของตัวอย่างเลือด เพื่อใช้เตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c} โดยใช้เลือดเหลือใช้จากธนาคารเลือดปริมาตร 300-350 mL ใน citrate phosphate dextrose adenine-one (CPDA-1) ที่ผ่านการคัดกรองโรคติดต่อเบื้องต้น และมีคุณสมบัติต่อไปนี้ เลือดมีสีแดง ไม่คล้ำ เขียวหรือดำ อายุของเซลล์ต้องไม่หมดอายุเกิน 2-3 เดือน ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมีค่าประมาณ 38-40% ไม่เกิดการแตกของเซลล์ (Hemolysis) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ไม่มีฟองกาศปรากฏ และไม่มีลิ่มเลือดปรากฏ เลือดที่ผ่านการเกณฑ์การประเมินแล้วทั้งตัวอย่างเลือดที่ยังไม่หมดอายุและตัวอย่างเลือดที่หมดอายุเป็นระยะเวลามากกว่า 2 เดือน หลังการนำมาปั่นล้าง จะทำให้ต้องใช้จำนวนครั้งในการปั่นล้างมากกว่า 3 ครั้ง และปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เก็บได้ลดลง ส่งผลต่อต้นทุนการผลิตเนื่องจากต้องใช้สารเคมีในการล้างปริมาณสูงและตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดแดงที่จะใช้ในการเตรียมวัสดุทดสอบมีน้อยได้ ดังนั้นตัวอย่างเลือดควรหมดอายุไม่เกิน 2 เดือนที่จะสามารถนำมาใช้ในการเตรียมวัสดุทดสอบ

การเตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ในสารละลาย CPDA-1

การเตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ในสารละลาย CPDA-1 โดยการนำเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ได้จากการล้างด้วย 0.85% Normal saline (NSS) เก็บเซลล์เม็ดเลือดแดงในสารละลาย CPDA-1 ในอัตราส่วนที่เหมาะสม เก็บตัวอย่างวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ที่อุณหภูมิ 2-8 °C วัสดุทดสอบทั้ง 2 ระดับผ่านการประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวของวัสดุทดสอบ HbA_{1c} และจะถูกนำไปใช้ในโปรแกรมทดสอบความชำนาญฯต่อไป

การเตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ด้วยกรรมวิธีการไกลเคชัน

สำหรับการเตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ด้วยกรรมวิธีการไกลเคชัน เพื่อพัฒนากรรมวิธีการเตรียมให้มีคุณสมบัติที่ดีกว่าการเตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ในสารละลาย CPDA-1 โดยศึกษาสภาวะต่างๆในการเตรียมวัสดุทดสอบให้มีค่า HbA_{1c} ที่สูงขึ้น มีความคงตัวสูง ไม่เกิดการแตกของเซลล์ระหว่างการขนส่ง โดยศึกษา ระยะเวลาการบ่ม ความเข้มข้นของน้ำตาล อุณหภูมิที่ สภาวะการเก็บตัวอย่างหลังการไกลเคชัน เป็นต้น การเตรียมวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ผ่านกระบวนการไกลเคชัน การใช้เซลล์เม็ดเลือดแดง จากเลือดที่หมดอายุแล้วล้างจนกว่าสารละลายสวนบนใส ปั่นแยกพลาสมาแล้วเก็บเซลล์เม็ดเลือดแดง (red blood cell) บ่มกับน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 150 mM ที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้สภาวะการปลอดเชื้อ เป็นระยะเวลา 9-15 ชั่วโมง ระยะเวลาดังกล่าวสามารถรักษาปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นไม่ให้เกิด hemolysis และสามารถเพิ่มระดับของ HbA_{1c} ให้สูงขึ้นอีกด้วย ในกระบวนการไกลเคชันจะเกิดขึ้นได้เมื่อมี อุณหภูมิ ความเข้มข้นของน้ำตาล และสารตั้งต้นที่เหมาะสม ไกลเคชันจะเกิดขึ้นจนกระทั่งเซลล์เม็ดเลือดแดงแตกหรือ hemolysis ดังนั้นกระบวนการหยุดปฏิกิริยาจึงมีความสำคัญ เพื่อรักษาระดับค่าของ HbA_{1c} และรักษาค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นให้มีคงที่ตลอดระยะเวลาการตรวจวัด ในการศึกษาจึงเก็บรักษาผลการไกลเคชัน ที่มีระดับ HbA_{1c} ที่ ให้มีระดับคงที่หรือมีความคงตัว (stable) สภาวะที่ใช้ในการจัดเก็บจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง ในการศึกษาจึงทดสอบการจัดเก็บผลิตภัณฑ์หลังการไกลเคชัน ที่อุณหภูมิ 2-8 °C สามารถรักษาระค่าของ HbA_{1c} และปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นคงที่ได้เป็นระยะเวลานานถึง 3 เดือน โดยประมาณ ศึกษาผลของอุณหภูมิและความชื้นต่อการตรวจวิเคราะห์ โดยจำลองการส่งวัสดุทดสอบไปยังสมาชิกหรือห้องปฏิบัติการอื่นๆ เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิและความชื้น หลังการนำตัวอย่างใส่ในกล่องบรรจุภัณฑ์เสมือนการเตรียมส่งห้องปฏิบัติการ พบว่าการขนส่งแบบยาเย็นเป็นระยะเวลา 3 วันสามารถรักษาค่าความคงตัวของวัสดุทดสอบ HbA_{1c} และค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นที่ยังคงให้ผลทดสอบเป็นจริง หลังจากนั้นนำวัสดุทดสอบไปมดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวตามสถิติ ISO 17034:Guide35 พบว่าวัดุทดสอบ HbA_{1c} มีความเป็นเนื้อเดียวกันและผ่านการทดสอบความคงตัวเป็นระยะเวลา 3 เดือน

ผลการประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการจากวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ที่เตรียมในสารละลาย CPDA-1 และการกำหนดค่าวัสดุทดสอบ

การกำหนดค่าวัสดุทดสอบ คณะผู้วิจัยได้ถ่ายทอดเทคโนโลยีและจัดเตรียมวัสดุทดสอบให้กับฝ่ายวิจัยและพัฒนาวัสดุทดสอบ ของบริษัท วี เมด แล็บ เซ็นเตอร์ จำกัด ประกอบด้วย วัสดุทดสอบ HbA_{1c} ที่ทราบช่วงค่า $\%HbA_{1c}$ บรรจุในหลอดพลาสติกใสหลอดละ 300 ไมโครลิตร จัดส่งให้ผู้รับบริการ 2 ตัวอย่าง ได้แก่ระดับต่ำและระดับสูง ทั้งหมดจำนวน 400 ตัวอย่างวัสดุทดสอบ โดยวัสดุทดสอบความชำนาญได้รับการตรวจสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity test) และความคงตัว (Stability test) โดยห้องปฏิบัติการ วิเคราะห์ทางสถิติตาม ISO 17043 - 13528:2015 Statistical Methods for use in Proficiency testing by Interlaboratory Comparison วัสดุถูกจัดส่งไปสมาชิกที่เข้าร่วมโครงการ 2 รอบ/ปี รอบที่ 1 เดือนพฤษภาคม 2562 จำนวน 148

แห่ง และรอบที่ 2 เดือนกันยายน 2562 จำนวน 148 แห่ง ผลการประเมินจากศูนย์ทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ รอบที่ 1 จำนวน 132 แห่ง จำนวน 133 เครื่อง พบว่าวัสดุทดสอบมีผลการประเมินเป็นที่น่าพึงพอใจ ที่ระดับสูง คิดเป็น 90.98% และระดับกลาง คิดเป็น 91.73% รอบที่ 2 สมาชิกจำนวน 126 แห่ง จำนวน 127 เครื่อง พบว่าวัสดุทดสอบมีผลการประเมินเป็นที่น่าพึงพอใจ ที่ระดับสูง คิดเป็น 88.98% ที่ระดับกลาง คิดเป็น 94.49% ผลที่ผ่าน z score นำมาคำนวณ เพื่อกำหนดค่า (Characterization) ของวัสดุทดสอบ HbA_{1c} และการคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวัด (uncertainty) พบว่า

การตรวจวิเคราะห์รอบ รอบที่ 1 ด้วยหลักการ Boronate affinity วัสดุทดสอบหมายเลข 62-301 จะมีช่วงค่า HbA_{1c} ที่ 11.08 – 13.05 % ให้ค่าความไม่แน่นอนเท่ากับ 1.86 และวัสดุทดสอบหมายเลข 62-302 จะมีช่วงค่า HbA_{1c} ที่ 5.86 – 8.08 % ให้ค่าความไม่แน่นอนเท่ากับ 1.86 และหลักการ Immunoassay ให้ค่าความไม่แน่นอนเท่ากับ 1.89 และ 1.66 ดังนั้นวัสดุทดสอบหมายเลข 62-301 จะมีช่วงค่า HbA_{1c} ที่ 8.74 - 11.26% และวัสดุทดสอบหมายเลข 62-302 จะมีช่วงค่า HbA_{1c} ที่ 3.95 - 6.17% การตรวจวิเคราะห์รอบที่ 2 ด้วยหลักการ Boronate affinity ให้ค่าความไม่แน่นอนเท่ากับ 1.35 (62-310) และ 0.31 (62-320) พบว่าวัสดุทดสอบหมายเลข 62-310 จะมีช่วงค่าที่ 8.43 – 10.23% และ วัสดุทดสอบหมายเลข 62-320 จะมีช่วงค่าที่ 5.17 – 5.59% และหลักการ Immunoassay ให้ค่าความไม่แน่นอนเท่ากับ 1.37 (62-310) และ 0.32 (62-320) พบว่าวัสดุทดสอบหมายเลข 62-310 จะมีช่วงค่าที่ 7.52 – 9.34% และ วัสดุทดสอบหมายเลข 62-320 จะมีช่วงค่าที่ 4.60 – 5.03%

ค่า uncertainty จากวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ในระดับสูง ให้ค่า uncertainty ที่สูงกว่าระดับกลาง อาจเนื่องจาก interference ของวัสดุทดสอบที่เตรียมจากเลือดผู้ป่วยเบาหวาน มีการใช้ยาในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเอง ส่งผลให้เกิดผลกระทบต่อการตรวจวิเคราะห์ หรืออาจเกิดจากการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงในระหว่างการขนส่ง ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการตรวจวิเคราะห์เป็นเท็จได้ การเตรียมวัสดุทดสอบในระดับสูงมักมีปัญหาเหล่านี้เกิดขึ้นเสมอ การประเมินในรอบ ปี 2563 จึงมีการพัฒนาวัสดุทดสอบขึ้นด้วยกรรมวิธีการไกลเคชันและจัดส่งวัสดุทดสอบให้กับสมาชิกเพื่อกำหนดค่า และศึกษาค่า uncertainty ของวัสดุทดสอบ จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าวัสดุทดสอบที่เตรียมด้วยกรรมวิธีการไกลเคชันมีความคงตัวสูงกว่าวิธีเดิม และคาดว่าจะสามารถนำมาใช้แทนการเตรียมด้วยวิธีเดิมในอนาคตได้

จากการวิจัยพบว่าสามารถผลิตวัสดุทดสอบที่มี HbA_{1c} ในระดับสูงได้ ใช้กระบวนการไกลเคชันแทนการเจาะเก็บเลือดจากผู้ป่วย ลดการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงอันเป็นสาเหตุของการตรวจวิเคราะห์ที่ทำให้มีผลของค่าความไม่แน่นอนลดลงได้ วัสดุทดสอบที่เตรียมขึ้นผ่านการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว ตามมาตรฐานการผลิตวัสดุอ้างอิง ISO 17034: Guide 35 หลังจากนั้นวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ที่เตรียมในสารละลาย CPDA-1 จะใช้เป็นต้นแบบผลิตภัณฑ์ระดับอุตสาหกรรมที่ใช้ในโปรแกรมทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ปี 2562 ผ่าน PT provider บริษัท วี เมด แล็บ เซ็นเตอร์ จำกัด และการผลิตวัสดุทดสอบ HbA_{1c} ด้วย

กรรมวิธีไกลเคชัน ผ่านการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวตามสถิติ ISO 17034:Guide35 ซึ่งจะนำไปผลิตในระดับอุตสาหกรรมเพื่อใช้ในการประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ในปีงบประมาณ 2563

การพัฒนาระบบรับ-ส่งข้อมูลผ่านระบบเว็บไซต์

การพัฒนาระบบเว็บไซต์โปรแกรมการตรวจวัดปริมาณฮีโมโกลบินเอวันซีมีวัตถุประสงค์เพื่อ ต่อยอดระบบเว็บไซต์ จากระบบเว็บไซตสำหรับโปรแกรมทดสอบความชำนาญการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลในเลือดด้วยเครื่องตรวจแบบพกพา มีการออกแบบหน้าเว็บไซต์การพัฒนาวัสดุทดสอบความชำนาญและวัสดุอ้างอิงชนิดน้ำเหลืองสำหรับการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินเอวันซีตามมาตราฐาน ISO/IEC 17043 และ ISO 17034 มีการนำเข้าข้อมูล การรวบรวมผลได้เป็น PDF File การออกแบบหน้าเว็บไซต์การพัฒนาวัสดุทดสอบความชำนาญและวัสดุอ้างอิงชนิดน้ำเหลืองสำหรับการตรวจวิเคราะห์ฟรุกโตซามินตามมาตราฐาน ISO/IEC 17043 และ ISO 17034 และส่งรายงานผลการวิเคราะห์ ออกรายงานให้ผู้ใช้

ดำเนินการพัฒนาทั้งหมด 4 ระยะ โดยระบบเว็บไซต์สามารถใช้งานได้ทั้งแอดมิน (admin) และผู้รับบริการ (user) โดยแอดมินจะดำเนินการสมัครสมาชิกให้กับผู้รับบริการ หลังจากนั้นแอดมินจะแจ้ง ชื่อเข้าใช้งาน (username) และรหัสผ่าน (password) ให้แก่ผู้รับบริการใช้ในการเข้าสู่ระบบเพื่อลงผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณฮีโมโกลบิน เอวันซี แอดมินสามารถตั้งค่าแบบฟอร์มการลงผลการตรวจวิเคราะห์ได้ สามารถเพิ่มเครื่องที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ และอัพโหลดเอกสารรายงานผลเบื้องต้น รายงานประจำรอบ และรายงานผลประจำปีลงในระบบเว็บไซต์ให้ผู้รับบริการสามารถดาวน์โหลดได้ในระบบ การใช้งานระบบเว็บไซต์สำหรับแอดมิน ผู้รับบริการสามารถลงผลการตรวจวิเคราะห์ในระบบออนไลน์ได้ และสามารถดาวน์โหลดการรายงานผลได้ในระบบ การใช้งานระบบเว็บไซต์สำหรับผู้รับบริการ ทั้งนี้ระบบเว็บไซต์ออนไลน์อยู่ในขั้นตอนแก้ไขและตรวจสอบ ตามคำแนะนำของผู้ตรวจสอบโปรแกรม พร้อมทั้งได้มีการวางแผนการใช้งานจริงของระบบเว็บไซต์เพื่อทดสอบการใช้งานของระบบในเดือนธันวาคมประกอบกับมีการทำแบบประเมินการใช้งานเว็บไซต์ เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาระบบเว็บไซต์ต่อไปในอนาคตให้ดียิ่งขึ้น

บรรณานุกรม

1. Wichai A, Suwat C, Pattapong K, Savitree A, Surasak T, Panwadee P, Prevalence of Diabetes and Relationship with Socioeconomic Status in the Thai Population: National Health Examination Survey. 2018: 2004–2014.
2. Han W, Shengqi Y, Zhangqin H, Jian H, Xiaoyi W. Type 2 diabetes mellitus prediction model based on data mining. Informatics in Medicine Unlocked. 2018(10):100–107.
3. American Diabetes Association Standards of Medical Care in Diabetesd. 2017. [Internet]. [cited 2019 Feb, 15]. Available from: [https://care.diabetesjournals.org/content/diacare/suppl/2016/12/15/40.Supplement_1.DC1/DC_40_S1_final.pdf]
4. Yong-ho L, Mi HK, Kwang JK, Eun YL, Daham K, Byung-WL, Eun SK, Bong SC, Hyun CL, Inverse Association between Glycated Albumin and Insulin Secretory Function May Explain Higher Levels of Glycated Albumin in Subjects with Longer Duration of Diabetes. PLOS ONE, 2014(9): 108-772.
5. Norihiro F, Jun H. Glycated albumin and diabetes mellitus. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). 2013 (51): 5509-5514.
6. Daisuke S, Asami M, Toshiyuki I, Yohei S, Ko I. Complications in Infants of Diabetic Mothers Related to Glycated Albumin and Hemoglobin Levels During Pregnancy. Pediatrics and Neonatology, 2016 (57): 496-500.
7. Kim EI. Terry KS. Abhishek V. Association of fructosamine to indices of dyslipidemia in older adults with type 2 diabetes. Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews. 2011 (5): 179-182.
8. Rodríguez SS, Rodríguez J, Camiña F. Corrected Fructosamine improves both correlation with HbA_{1C} and diagnostic performance. Clinical Biochemistry. 2017 (50): 110–115.
9. Verena G, Ishwarlal J, Fructosamine. StatPearls Publishing. 2017.

10. Martina M, Renata P, Elisa D, Gian LS, Giuseppe L, Gian CG, Andrea M, Evaluation of biological variation of glycated albumin (GA) and fructosamine in healthy subjects. Clinica Chimica Acta. 2013 (423): 1-4.
11. ISO 13528 Second-edition 2015. [cited 2019 Feb, 15]. Available from: [https://www.li.mahidol.ac.th/newbooks-and-annotation/product/iso-13528-2015-second-edition-statistical-methods-for-use-in-proficiency-testing-by-interlaboratory-comparison/]
12. ISO 17034, 2016 [cited 2018 Nov. 22]. Available from: [www. iso.org.]
13. Charun Y. National Institute of Metrology, Thailand (NIMT). 2018.
14. Wongsri P. Preparation quality control material for hemoglobin A_{1c} testing from blood samples. M.S. Thesis in Medical Technology. 2017.
15. Smith RJ, Koenig RJ, Binnerts A, Soeldne JS, Aoki TT, Regulation of hemoglobin A_{1c} formation in human erythrocytes in vitro. Effects of physiologic factors other than glucose. J Clin Invest. 1982 (69): 1164–1168.
16. Selvaraj N, Zachariah B, Sathiyapriya V. Effect of lipid peroxides and antioxidants on glycation of hemoglobin: An in vitro study on human erythrocytes. Clinica Chimica Acta. 2006(366):190-195.
17. Izabela SB. Grzegorz B. Ascorbic acid and protein glycation *in vitro*. Chemico-Biological Interactions. 2015 (24):154-162.
18. Zeba S, Mohd IM, Saheem A. D-Ribose induced glycoxidative insult to hemoglobin protein: An approach to spot its structural perturbations. International Journal of Biological Macromolecules. 2018(112): 134-147.
19. Rudolf F, Enzo C, Ram HN, Menachem S, Timothy SK, Edward M. DAF in diabetic patients is subject to glycation/inactivation at its active site residues. Molecular Immunology; 2018: 246–252.
20. Javad B, Adeleh D, Ali AS. Honey bee venom decreases the complications of diabetes by preventing hemoglobin glycation. Journal of Molecular Liquids.2014(199): 371–375.

21. Izabela SB, Grzegorz B. Ascorbic acid and protein glycation *in vitro*. Chemico-Biological Interactions.2015(240): 154-162.

22. Marika V, Mariacristina P, Arianna M, Lucia G, Andrea M, Cinzia M, Francesco F, Fiorella MA, Flavia P, A quick, simple method for detecting circulating fluorescent advanced glycation end-products: Correlation with in vitro and in vivo non-enzymatic glycation. Metabolism clinical and experimental.2017(71): 64 – 69.

23. Sadaf F, Tamanna A, Nabeel A, Asimul I, Priyankar S. Non-enzymatic glycation enhances human serum albumin binding capacity to sodium fluorescein at room temperature: A spectroscopic analysis. Clinica Chimica Acta. 2017(469) 180–186.