



แผนกพยาธิวิทยา
โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา

วิธีปฏิบัติงาน
เรื่อง

การตรวจ HbA1c

WI-LAB-036

แก้ไขครั้งที่ 2

ผู้จัดทำ

(นายสิปพนธ์ ศรีวะรมย์)

ผู้จัดการวิชาการเคมีคลินิก

1 กุมภาพันธ์ 2566

ผู้ทบทวน ร.ท.หญิง

(อรกาญญา ทรงทอง)

ผู้จัดการคุณภาพ

1 กุมภาพันธ์ 2566

ผู้อนุมัติ


พ.อ.

(ฉัตรมงคล คนขยัน)

หัวหน้าห้องปฏิบัติการ

1 กุมภาพันธ์ 2566

วันที่ประกาศใช้: 1 กุมภาพันธ์ 2566

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษัตริย์สระรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HbA1c	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-036	หน้า 1 จาก 26 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

1. วัตถุประสงค์ของการทดสอบ(purpose of examination)

- 1.1 เพื่อตรวจเชิงปริมาณวิเคราะห์หาระดับ HbA1c ในตัวอย่างเลือดด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ cobas c 501 ร่วมกับน้ำยา Tina-quant Hemoglobin A1c Gen.3 - Hemolysate and Whole Blood Application
- 1.2 เพื่อติดตามการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดผู้ป่วย สามารถใช้ระดับ HbA1c ประเมินระดับน้ำตาลในเลือด (glycemic status) ของผู้ป่วยย้อนหลังได้ 2 – 3 เดือน
- 1.3 เพื่อตรวจติดตามผลการรักษาโรคเบาหวานซึ่งมักจะเจาะเลือดตรวจ HbA1c ทุก 3-4 เดือน หรืออย่างน้อยปีละ 2 ครั้งถ้าผู้ป่วยสามารถควบคุมระดับน้ำตาลให้อยู่ในเกณฑ์ได้อย่างต่อเนื่อง
- 1.4 เพื่อประเมินความเสี่ยงต่อการเกิดโรคแทรกซ้อน เนื่องจากผู้ป่วยเบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ไม่ดีและมีระดับ HbA1c สูง จะมีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดความผิดปกติในระดับหลอดเลือดขนาดเล็ก (microvascular complications) ซึ่งนำไปสู่ความผิดปกติหรือภาวะแทรกซ้อนเพิ่มมากขึ้น ได้แก่ การเกิดจอประสาทตาเสื่อม(retinopathy) หน่วยไตเสื่อม(nephropathy) ภาวะหน่วยประสาทเสื่อม (neuropathy) และการพบสารอัลบูมินในปัสสาวะปริมาณน้อย(microalbuminuria)
- 1.5 เพื่อคัดกรองและช่วยวินิจฉัยโรคเบาหวาน

2. หลักการและวิธีการของขั้นตอนที่ใช้สำหรับการทดสอบ (principle and method of procedure used for examinations)

- 2.1 หลักการ(Principle): น้ำยา A1C-3 ใช้หลักการ competitive turbidimetric inhibition immunoassay (TINIA)


วิธีวิเคราะห์นี้ใช้ TTAB (Tetradecyltrimethylammonium) ซึ่งเป็นdetergent ในน้ำยา hemolyzing เพื่อกำจัดการรบกวนจากเม็ดเลือดขาว (TTAB จะไม่ทำลายเม็ดเลือดขาว) ไม่มีความจำเป็นในการเตรียมตัวอย่างเพื่อกำจัดฮีโมโกลบินเอวันซีที่ไม่เสถียร(labile HbA1c)

ฮีโมโกลบินทุกชนิดที่จับกับกลูโคสที่ปลายด้านเอ็น (N-terminal) ของสายเบต้า (β -chain) และมี antibody-recognizable regions เหมือนกับฮีโมโกลบินเอวันซี จะถูกตรวจวัดโดยการทดสอบนี้ ดังนั้นผู้ป่วยที่มีภาวะโลหิตเป็นพิษ (uremia) และผู้ที่มีความผิดปกติของฮีโมโกลบินที่พบบ่อย (HbAS, HbAC, HbAE) จึงสามารถใช้วิธีนี้ตรวจวิเคราะห์หาระดับ HbA1c ได้

2.1.1 หลักการวัดค่า Hemoglobin A1c

การตรวจวัดค่า HbA1c ใช้หลักการ turbidimetric inhibition immunoassay (TINIA) สำหรับ hemolyzed whole blood

- เมื่อตัวอย่าง hemolyzed whole blood ถูกเติมด้วยด้วยน้ำยา R1 (buffer/antibody) ทำให้ Glycohemoglobin (HbA1c) ในตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ anti-HbA1c antibody เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ antigen-antibody ที่ละลายน้ำได้ เนื่องจาก specific HbA1c antibody site มีเพียงหนึ่งเดียวในโมเลกุลของ HbA1c การก่อตัวของสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่ละลายน้ำจึงไม่เกิดขึ้น
- เมื่อเติมน้ำยา R3 (buffer/polyhapten) การเกิดปฏิกิริยาจะเริ่มขึ้น :

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษัตริย์สุวรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HbA1c	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-036	หน้า 2 จาก 26 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

โดย polyhapten ทำปฏิกิริยากับ anti-HbA1c antibodies ส่วนเกินเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน antibody-polyhapten ที่ไม่ละลายน้ำ เกิดเป็นความขุ่นขึ้นมาให้ตรวจวัดได้ ซึ่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวถูกวัดที่ความยาวคลื่น 340 nm และวัด blank ที่ 660 nm ซึ่งจะเป็นสัดส่วนผกผันกับปริมาณ HbA1c ในตัวอย่าง

2.2.2 หลักการวัดค่า Total Hemoglobin : Photometric measurement

Hemoglobin ที่ได้รับปลดปล่อยใน hemolyzed sample ถูกเปลี่ยนเป็นสารอนุพันธ์ที่มีคุณสมบัติดูดกลืนแสงซึ่งจะถูกวัดแบบ bichromatic ที่ความยาวคลื่น 660/376 nm ในช่วง preincubation phase (sample + R1) ของ immunological reaction ตามรายละเอียดข้างต้นในข้อ 2.1.1 โดยไม่จำเป็นต้องใช้ Hb reagent แยกต่างหาก

2.2.3 สมการในการคำนวณของวิธีวิเคราะห์

ผลลัพธ์สุดท้ายจะแสดงเป็นค่า mmol/mol HbA1c หรือ % HbA1c ซึ่งคำนวณจาก HbA1c/Hb ratio ดังนี้

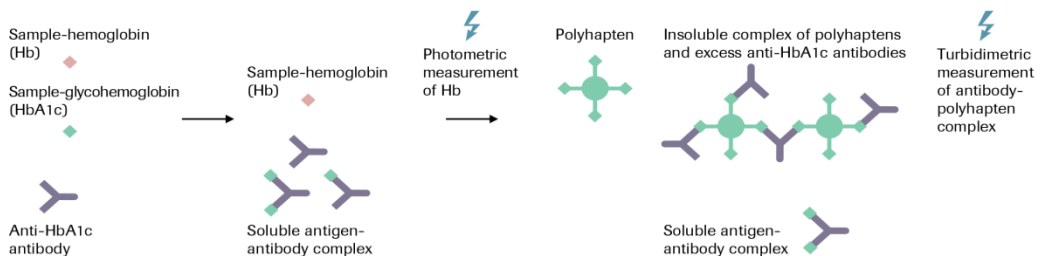
Protocol 1 (mmol/mol HbA1c acc. to IFCC):

$$\text{HbA1c (mmol/mol)} = (\text{HbA1c/Hb}) \times 1000$$

Protocol 2 (% HbA1c acc. to DCCT/NGSP):

$$\text{HbA1c (\%)} = (\text{HbA1c/Hb}) \times 91.5 + 2.15$$

Test principle: competitive turbidimetric inhibition immunoassay (TINIA) for hemolyzed whole blood



Hemolysate preparation

The whole blood sample is hemolyzed using a detergent-containing reagent. The hemolyzing step can either be performed automatically on the instrument or manually using hemolyzing reagent.

Preincubation phase – Photometric measurement of total Hb


The liberated hemoglobin in the hemolyzed sample is converted to a stable derivative which is measured photometrically during the preincubation phase of the immunological reaction. Glycohemoglobin (HbA1c) in the sample reacts with the anti-HbA1c antibody to form soluble antigen-antibody complexes.

Start of turbidimetric reaction – Measurement of HbA1c

The polyhapten in the reagent react with excess anti-HbA1c antibodies and form an insoluble antibody-polyhapten complex. This complex can be measured turbidimetrically: the higher the HbA1c concentration, the lower the turbidity.

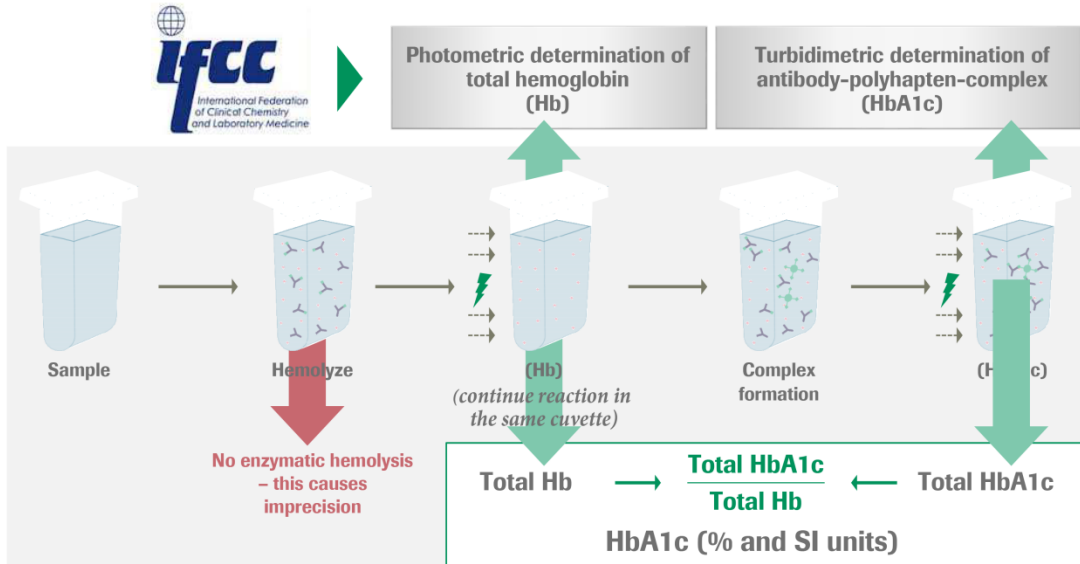


Life needs answers

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณสีเวรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HbA1c	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-036	หน้า 3 จาก 26 หน้า
แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566	

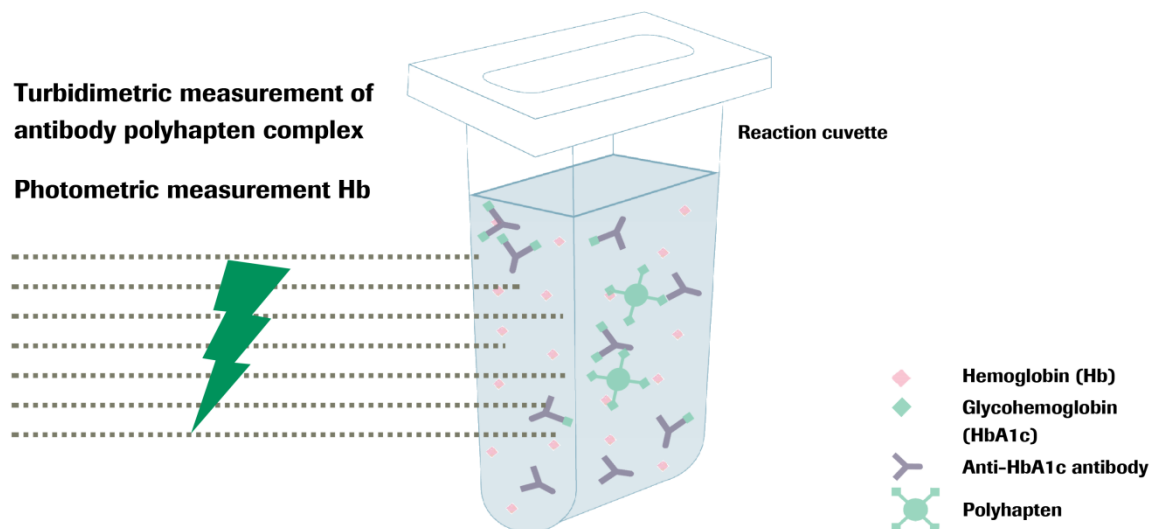
Tina-quant® HbA1c from Roche

Twin testing in the same cuvette provides excellent results




Tina-quant® HbA1c from Roche

Assay principle



เอกสารควบคุม มีอายุการใช้งาน 1 ปี นับจากวันที่ปรับปรุงแก้ไขครั้งสุดท้าย

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HbA1c	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-036	หน้า 4 จาก 26 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

2.3 วิธีการที่ใช้(method) : ใช้วิธี Roche TinaQuant III (immunoturbidimetric Gen.3)

การสอบกลับ(Traceability) : วิธีการนี้ได้รับการกำหนดมาตรฐานเทียบกับ approved IFCC reference method สำหรับการวัด HbA1c ในเลือดมนุษย์และสามารถเชื่อมโยงไปยังผลลัพธ์ที่สอบกลับไปยัง DCCT / NGSP ได้โดยการคำนวณ

หมายเหตุ :-

- การทำ HbA1c standardization ในระดับสากล เป็นความร่วมมือระหว่างองค์กร IFCC และ NGSP (NGSP เป็นองค์กรที่ก่อตั้งโดย AACC) โดย IFCC นั้นดูแลในเรื่องสารอ้างอิงมาตรฐานและวิธีอ้างอิงมาตรฐาน ส่วน NGSP นั้นดำเนินการ ในระดับ Routine Clinical Laboratory จะต้องนำ product calibrator มาใช้ calibrate เครื่องมือ/น้ำยา/อุปกรณ์ ซึ่ง product calibrator นี้สอบกลับได้ถึง IRMM 466/467 ซึ่งเป็น Primary reference material ของ IFCC Reference System ส่วนวิธีอ้างอิงมาตรฐานของ IFCC มี 2 วิธี ได้แก่ HPLC-ES/MS และ HPLC-CE) ซึ่งเป็นวิธีที่ถูกรบกวนน้อยกว่าวิธีอื่นๆ

- HbA1c คือ hemoglobin A ที่มีโมเลกุลของ glucose มาจับกับ N-terminal valine ของ β -chain

- ค่าย่อต่างๆ

American Diabetes Association (ADA)

American Association for Clinical Chemistry (AACC)

International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC)

The Diabetes Control and complications Trial (DCCT)

National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP)

College of American Pathologists (CAP)

High performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ES/MS)

High performance liquid chromatography-capillary electrophoresis with UV detection (HPLC-CE with UV detection)

3. ลักษณะทางประสิทธิภาพ (performance characteristics)

คุณลักษณะทางประสิทธิภาพของการทดสอบ HbA1c ต่อไปนี้อ้างอิงจากใบแทรกน้ำยา A1C-3 (PI-LAB-036) ในหัวข้อ Specific performance data เป็นรายงานผลการตรวจสอบประสิทธิภาพในตัวอย่างชนิดต่างๆ ดังนี้

3.1 คุณลักษณะด้านความแม่นยำ(Precision) : เป็นการตรวจสอบความแม่นยำโดยใช้ตัวอย่างตรวจจาก

มนุษย์และสารวัสดุควบคุมคุณภาพ ตามข้อกำหนดของ CLSI (Clinical and Laboratory Standards

Institute) EP5 ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง cobas c 501 ร่วมกับน้ำยา A1C-3 โดยใช้วิธีการตรวจวัดค่า

HbA1c ซ้ำแบบ within-run (repeatability) และ between-run (intermediate precision) ได้ผล

ดังนี้



แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษัตริย์สุวรา	
วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HbA1c	
รหัสเอกสาร : WI-LAB-036	หน้า 5 จาก 26 หน้า
แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

Whole Blood Application:

a) Repeatability, n = 21 (ตรวจวิเคราะห์ซ้ำ 21 ครั้งในรอบการทดสอบเดียวกัน)

Samples	Mean %HbA1c	SD %	CV %	CV _A (Allowable CV) %	ผลการตรวจสอบ เทียบกับเกณฑ์
PreciControl HbA1c norm	5.3	0.07	1.3	≤1.88	Pass
PreciControl HbA1c path	9.9	0.11	1.1	≤1.50	Pass
Human sample 1	4.4	0.07	1.6	≤2.27	Pass
Human sample 2	5.6	0.09	1.6	≤1.78	Pass
Human sample 3	8.0	0.08	1.0	≤1.50	Pass
Human sample 4	10.6	0.11	1.1	≤1.50	Pass

b) Intermediate precision, 2 aliquots ต่อ run, 2 run ต่อวัน, ทำติดต่อกัน 21 วัน

Samples	Mean %HbA1c	SD %	CV %	CV _A (Allowable CV) %	ผลการตรวจสอบ เทียบกับเกณฑ์
PreciControl HbA1c norm	5.3	0.08	1.4	≤2.51	Pass
PreciControl HbA1c path	9.9	0.15	1.5	≤2.00	Pass
Human sample 1	4.4	0.09	1.9	≤3.03	Pass
Human sample 2	5.6	0.11	2.0	≤2.38	Pass
Human sample 3	8.0	0.11	1.4	≤2.00	Pass
Human sample 4	10.6	0.16	1.5	≤2.00	Pass

เกณฑ์การยอมรับค่า imprecision

a) Within-run CV ≤ 0.25TEa

- CV ≤ 1.5% เมื่อ HbA1c > 6.7% เช่น เมื่อ HbA1c = 9.9%
- CV ≤ 1.78% เมื่อ HbA1c = 5.6% (คำนวณจาก $0.4 \times 100 / 4 \times 5.6$)

b) Between-run CV ≤ 0.33TEa เช่น

- CV ≤ 2% เมื่อ HbA1c > 6.7% เช่น เมื่อ HbA1c = 9.9%
- CV ≤ 2.38% เมื่อ HbA1c = 5.6% (คำนวณจาก $0.4 \times 100 / 3 \times 5.6$)

สำหรับ HbA1c (NGSP)(%) กำหนดใช้ค่า TEa = ± 6% > 6.7%, ± 0.4 ≤ 6.7%
(อ้างอิงจาก RCPA Allowable Limits of Performance for Biochemistry)

หมายเหตุ

- CAP กำหนดค่า Allowable Total Error (TEa) ของการตรวจวิเคราะห์ HbA1c ไว้ที่ ± 6.0% เช่นกัน แต่ไม่ได้ระบุ เงื่อนไขให้ปรับขยายค่า %TEa เมื่อค่า HbA1c ต่ำกว่าค่าเป้าหมายในการรักษาและควบคุมเบาหวาน (HbA1c < 7.0%) ซึ่งมีความสำคัญทางคลินิกน้อย
- เนื่องจากการคำนวณทางสถิติเพื่อให้ได้ค่า HbA1c ที่แพทย์ยอมรับได้เพื่อใช้ในการดูแลรักษาผู้ป่วยเบาหวานในทางคลินิกนั้น จะต้องแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของค่า HbA1c ในการติดตามดูแลผู้ป่วยนั้น เกิดจากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในตัวผู้ป่วยจริงๆ ไม่ใช่เกิดจากความ

เอกสารควบคุม มีอายุการใช้งาน 1 ปี นับจากวันที่ปรับปรุงแก้ไขครั้งล่าสุด



แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา	
วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HbA1c	
รหัสเอกสาร : WI-LAB-036	หน้า 6 จาก 26 หน้า
แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

แปรปรวนหรือความไม่แม่นยำของการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งแสดงด้วยการคำนวณหาค่า reference change value (RCV) หรือ critical difference ซึ่งผลจากการทดสอบด้วยการคำนวณพบว่าค่า intra-laboratory CV <2% และ inter-laboratory CV <3% เป็นค่าที่ AACC และ ADA แนะนำว่ามีความเหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ค่า HbA1c

- จากการคำนวณหาค่า reference change value (RCV) ที่ค่า HbA1c= 7% พบว่า CV ≤2% สามารถที่จะให้ค่าความเชื่อมั่น 95% สำหรับค่า HbA1c ที่แตกต่างกันราว 0.5% ได้
- ค่า HbA1c 7% เป็นค่าที่มีความสำคัญทางคลินิกที่แพทย์ใช้เป็นค่าเป้าหมายในการรักษาว่าต้องการให้ <7% และหาก >7% จะใช้ในการพิจารณาตัดสินใจปรับเปลี่ยนการรักษา ส่วนค่าที่ 6.5% เป็นค่าในการวินิจฉัยโรคเบาหวาน ดังนั้นหากการตรวจวิเคราะห์มีความแปรปรวนหรือความไม่แม่นยำ >0.5% ย่อมจะทำให้แพทย์ดูแลรักษาผู้ป่วยคลาดเคลื่อนไปด้วย ดังนั้นการที่ห้องปฏิบัติการของแผนกพยาธิวิทยา รพ.ค่ายกฤษณ์สีวะรา เลือกค่า TEa = ± 0.4 เมื่อ HbA1c ≤ 6.7% และ TEa = ±6% เมื่อ HbA1c > 6.7% ของ RCPA จึงเห็นว่ามีเหมาะสมทั้งการนำไปใช้เป็นเกณฑ์ในการควบคุมคุณภาพผลการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการ และการนำผลวิเคราะห์ HbA1c ไปใช้ทางคลินิกที่ดูแลรักษาผู้ป่วยเบาหวาน

3.2 คุณลักษณะด้านความถูกต้อง (Accuracy) เมื่อเปรียบเทียบวิธีการทดสอบ (Method comparison) การประเมินข้อมูลเปรียบเทียบวิธีการทดสอบเป็นไปตามเกณฑ์การรับรองของ NGSP ค่าเฉลี่ยของความแตกต่างระหว่างสองวิธี และช่วงความเชื่อมั่นที่ 95% ของความแตกต่างในช่วง 4-10 % (DCCT/NGSP) ที่ได้รับการตรวจสอบ 95 % ของความแตกต่างระหว่างค่าที่ได้สำหรับแต่ละตัวอย่างด้วยวิธีการทั้งสองวิธีอยู่ในช่วงที่กำหนดโดยช่วงความเชื่อมั่น 95% ล่างและบนของความแตกต่าง

สำหรับ Whole Blood Application

3.2.1 % HbA1c (DCCT/NGSP) values for human blood samples obtained on a Roche/Hitachi cobas c 501 analyzer using the Tina-quant Hemoglobin A1c Gen.3 reagent with the whole blood application (y) were compared with those determined using the corresponding reagent with the hemolysate application on a COBAS INTEGRA 800 analyzer (x).

Sample size (n) = 80

Mean difference 0.07 % HbA1c

Lower 95 % confidence interval of differences -0.27 % HbA1c

Upper 95 % confidence interval of differences 0.42 % HbA1c

The sample concentrations were between 4.7 % and 9.8 % (DCCT/NGSP values).

3.2.2 % HbA1c (DCCT/NGSP) values for human blood samples obtained on a Roche/Hitachi cobas c 501 analyzer using the Tina-quant Hemoglobin A1c Gen.3 reagent with the whole blood application (y) were compared with those determined using the Tina-quant Hemoglobin A1c Gen.2 reagent with the whole blood application (x).



แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา	
วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HbA1c	
รหัสเอกสาร : WI-LAB-036	หน้า 7 จาก 26 หน้า
แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

Sample size (n) = 82

Mean difference 0.07 % HbA1c

Lower 95 % confidence interval of differences -0.50 % HbA1c

Upper 95 % confidence interval of differences 0.65 % HbA1c

The sample concentrations were between 5.0 % and 9.9 % (DCCT/NGSP values).

3.2.3 % HbA1c (DCCT/NGSP) values for human blood samples obtained on a Roche/Hitachi cobas c 501 analyzer using the Tina-quant Hemoglobin A1c Gen.3 reagent with the whole blood application (y) were compared with those determined using the Tina-quant Hemoglobin A1c Gen.2 reagent with the hemolysate application on a COBAS INTEGRA 800 analyzer (x).

Sample size (n) = 80

Mean difference -0.09 % HbA1c

Lower 95 % confidence interval of differences -0.46 % HbA1c

Upper 95 % confidence interval of differences 0.28 % HbA1c

The sample concentrations were between 4.7 % and 9.8 % (DCCT/NGSP values).

3.3 Analytical specificity for Whole Blood and Hemolysate Application

Hb derivatives	Labile HbA1c (pre-HbA1c), acetylated Hb, and carbamylated Hb do not affect the assay results.
Hb variants	Specimens containing high amounts of HbF (> 10 %) may yield lower than expected HbA1c results.

4. ชนิดตัวอย่าง (type of sample)

ชนิดตัวอย่างที่ใช้ได้	อุณหภูมิ	ความคงตัว
เลือดครบส่วนที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด	15-25 °C	3 วัน
Li-heparin, K2-EDTA, K3-EDTA,	2-8 °C	7 วัน
Fluoride/Na2-EDTA, Na-Heparin และ Fluoride/potassium oxalate	(-15)-(-25) °C	6 เดือน - แช่แข็งได้เพียงครั้งเดียว - ต้องผสมให้เข้ากันหลังจาก ละลายก่อนนำไปวิเคราะห์

5. การเตรียมผู้ป่วย (patient preparation)

5.1 ควรบริโภคอาหารตามพฤติกรรมปกติในช่วง 2 สัปดาห์ก่อนตรวจ

5.2 การตรวจ HbA1c ไม่จำเป็นต้องอดอาหารก่อนเจาะเก็บตัวอย่างเลือด แต่ถึงแม้ว่าเวลาที่เก็บตัวอย่างเลือดหรืออาหารที่รับประทานจะไม่มีผลกระทบต่อระดับของ HbA1c แต่ความขุ่นของไขมัน(chylomicrons) ในอาหารอาจมีผลกระทบต่อคุณภาพวิธีวิเคราะห์นี้รวมถึงรายการทดสอบอื่นๆ การอดอาหาร 8-16



แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษัตริย์สุวรา	
วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HbA1c	
รหัสเอกสาร : WI-LAB-036	หน้า 8 จาก 26 หน้า
แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

ชั่วโมง จะทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์รายการทดสอบอื่นๆที่ใช้ตัวอย่างเลือดจากการเจาะเก็บครั้งเดียวกัน มีความถูกต้องน่าเชื่อถือกว่า

6. ประเภทของภาชนะและสารเติมแต่ง (type of container and additives)

- 6.1 ประเภทของภาชนะและสารเติมแต่งซึ่งใช้บรรจุตัวอย่างเริ่มต้นที่ส่งตรวจหา HbA1c ได้แก่
 - 6.1.1 หลอดบรรจุเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA Blood Collection tube (ฝาปิดหลอดสีม่วง) มี K₂-EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง ขนาดบรรจุ 2-3 mL เป็นภาชนะบรรจุหลักที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างในการส่งตรวจ HbA1c ในงานประจำวัน
 - 6.1.2 หลอดบรรจุเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด Li-Heparin Blood Collection tube (ฝาปิดหลอดสีเขียว) มี Lithium Heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง ขนาดบรรจุ 3 mL ปกติจะไม่ใช้เก็บตัวอย่างสำหรับตรวจ HbA1c ในงานประจำวัน จะใช้เฉพาะในกรณีที่ส่งตรวจ HbA1c แต่ไม่ได้เก็บตัวอย่างเลือดในภาชนะบรรจุตาม ข้อ 6.1.1 เท่านั้น
 - 6.1.3 Sterile Sodium Fluoride/EDTA blood collection tube (ฝาปิดหลอดสีเทา) มี Sodium Fluoride (NaF) เป็นสารป้องกันการสลาย Glucose โดยการกีดการทำงานของเอนไซม์ในระบบ glycolysis มี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง ขนาดบรรจุ 2-3 mL ปกติจะไม่ใช้เก็บตัวอย่างสำหรับตรวจ HbA1c ในงานประจำวัน แต่จะใช้เฉพาะในกรณีที่ส่งตรวจ HbA1c แต่ไม่ได้เก็บตัวอย่างเลือดในภาชนะบรรจุตาม ข้อ 6.1.1 เท่านั้น
- 6.2 ประเภทของภาชนะและสารเติมแต่งซึ่งใช้บรรจุตัวอย่างนำเข้าเครื่องตรวจวิเคราะห์
 - 6.2.1 หลอดบรรจุตัวอย่างเลือดเริ่มต้นขนาด 13x75 mm. ในข้อ 6.1 นำเข้าเครื่องตรวจได้เลย
 - 6.2.2 หลอดชนิดไม่มีสารกันเลือดแข็ง(Plain tube) ใช้บรรจุตัวอย่างที่แบ่งมาจากหลอดบรรจุตัวอย่างเริ่มต้น ต้องการปริมาณตัวอย่างไม่น้อยกว่า sample dead volume (1000 ไมโครลิตร)
 - 6.2.3 Hitachi cup เป็น sample cup ที่ใช้บรรจุตัวอย่างตรวจที่เป็นสารวัสดุควบคุมคุณภาพและสารมาตรฐานเท่านั้น ต้องการปริมาณตัวอย่างไม่น้อยกว่า sample dead volume (100 ไมโครลิตร) ในขณะที่ ตัวอย่างที่ต้องการใช้ในการวิเคราะห์ตามปกติ(normal sample volume) = 5 ไมโครลิตร

7. เครื่องมืออุปกรณ์ที่จำเป็นและสารเคมี (required equipment and reagents)

- 7.1 เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ : ใช้เครื่อง cobas c 501 ซึ่งเชื่อมต่อกับเครื่อง cobas e 601, Control unit และ Core unit เป็นระบบวิเคราะห์ที่เรียกชื่อว่า cobas 6000 analyzer series ทุกส่วนเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Roche Diagnostic ประเทศเยอรมัน
- 7.2 น้ำยาตรวจวิเคราะห์ :
 - 7.2.1 ใช้ น้ำยา Tina-quant Hemoglobin A1c Gen.3 Cat. No. 05336163 190 เป็น cassette ชุดน้ำยาสำเร็จรูปพร้อมใช้งาน(ready-to-use) ผลิตภัณฑ์ยี่ห้อ Roche โดย 1 cassette ตรวจได้ 150 Tests เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C วางให้ตั้งตรง จะมีอายุการใช้งานจนถึงวันหมดอายุที่ระบุข้าง cassette เมื่อเปิดใช้งานบนเครื่อง cobas c 501 แล้วจะมีอายุการใช้งาน 4 สัปดาห์ องค์ประกอบของสารเคมีในน้ำยา มีดังนี้
R1 Antibody Reagent

เอกสารควบคุม มีอายุการใช้งาน 1 ปี นับจากวันที่ปรับปรุงแก้ไขครั้งล่าสุด



แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษัตริย์สระรา	
วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HbA1c	
รหัสเอกสาร : WI-LAB-036	หน้า 9 จาก 26 หน้า
แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

MES buffer: 0.025 mol/L; TRIS buffer: 0.015 mol/L, pH 6.2;
HbA1c antibody (ovine serum): ≥ 0.5 mg/mL; detergent; stabilizers;
preservatives

R3 Polyhapten Reagent

MES buffer: 0.025 mol/L; TRIS buffer: 0.015 mol/L, pH 6.2;
HbA1c polyhapten: ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$; detergent; stabilizers; preservatives

R1 is in position A and R3 is in position C. Position B contains H₂O for technical reasons

7.2.2 Hemolyzing Reagent Gen.2 Cat. No. 04528182 190 เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C วางให้ตั้งตรง จะมีอายุการใช้งานจนถึงวันหมดอายุที่ระบุข้าง cassette เมื่อเปิดใช้งานบนเครื่อง cobas c 501 แล้วจะมีอายุการใช้งาน 4 สัปดาห์

7.3 สารปรับแต่งมาตรฐาน(calibrator) : C.f.a.s. HbA1c Cat. No. 04528417 190 อยู่ในรูปผงแห้งที่มีส่วนประกอบดังนี้

Analyte	Origin
Hemoglobin	Sheep blood
HbA1c	Human blood

โดยบรรจุขวดละ 2.0 mL เก็บที่ 2-8 °C ได้นานตามที่ระบุไว้บนฉลากและมีค่า Assigned Value อยู่ในเอกสารที่แนบมากับ Lot น้ำยา หลังจากละลาย Calibrator แล้ว สามารถเก็บรักษาที่ 15-25 °C นาน 8 ชั่วโมง, ที่ 2-8 °C นาน 2 วัน และที่อุณหภูมิ (-15) – (-25) °C ได้นาน 3 เดือน

7.4 สารวัสดุควบคุมคุณภาพPreciControl HbA1c norm, PreciControl HbA1c path ผลิตภัณฑ์ยี่ห้อ Roche ขนาดบรรจุขวดละ 1 mL มีลักษณะเป็นของเหลวพร้อมใช้งาน ใช้ตรวจวิเคราะห์ทันทีหลังจากทำ daily maintenance เครื่อง cobas c 501 แล้วเสร็จในช่วงเวลาประมาณ 15.00-18.00 น. ของแต่ละวัน ขวดที่ยังไม่เปิดใช้ให้เก็บรักษาสารวัสดุควบคุมคุณภาพนี้ไว้ที่ อุณหภูมิ 2-8°C เมื่อเปิดใช้แล้วให้เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C จะมีอายุการใช้งาน 28 วัน แต่ถ้าเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ (-15) – (-25) °C จะมีอายุการใช้งานไม่เกิน 12 สัปดาห์ (3 เดือน)

7.5 Auto pipette, Volumetric pipette 2 mL และ Pipette tip สำหรับใช้เตรียมสารละลาย calibrator ที่อยู่ในรูปแบบเป็นผงแห้ง (Lyophilize)

7.6 Distilled water สำหรับใช้ละลาย calibrator

7.7 ภาชนะที่จะใช้บรรจุตัวอย่างตรวจที่แบ่งมา ได้แก่ Sample cup(Hitachi cup) Cat No. 10394246001, Plastic plain tube

7.8 Rack ที่ใช้งานมี 4 ชนิด

7.8.1 Rack สีดำ สำหรับวาง calibrator

7.8.2 Rack สีขาว สำหรับวาง control

7.8.3 Rack สีแดงคาดสีชมพู สำหรับวางตัวอย่างที่เป็น Routine และ STAT

7.8.4 Rack สีเขียว ใช้เพื่อบำรุงรักษาเครื่อง



แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา	
วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HbA1c	
รหัสเอกสาร : WI-LAB-036	หน้า 10 จาก 26 หน้า
แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

8. สิ่งแวดล้อมและการควบคุมความปลอดภัย (environmental and safety controls)

- 8.1 ต้องสวมถุงมือยางและเสื้อคลุมขณะปฏิบัติงานเพื่อป้องกันการติดเชื้อบางชนิดที่อาจปนเปื้อนมากับตัวอย่างตรวจ
- 8.2 น้ำยามีส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิวหรือสารทำความสะอาดที่อาจระคายเคืองหรือสัมผัสกับผิวหนังโดยตรง

9. ขั้นตอนการสอบเทียบ (calibration procedures)

9.1 ข้อกำหนดในการสอบเทียบ

- 9.1.1 ทำการสอบเทียบแบบ Hb and HbA1c: full calibration กับน้ำยา A1C-3 และ Hemolyzing Reagent Gen.2 ที่ใช้งานร่วมกับเครื่องตรวจวิเคราะห์ cobas c 501 เมื่อ
 - 1) เปิดใช้งานน้ำยา A1C-3 ครั้งแรก
 - 2) น้ำยา A1C-3 เปลี่ยนรุ่นการผลิต(Lot) ใหม่
 - 3) Renewed calibration หลังจากเปิดใช้งานน้ำยา A1C-3 ครบ 29 วัน
 - 4) มีการทำ preventive maintenance รอบใหญ่หรือมีการเปลี่ยนชิ้นส่วนอะไหล่ที่มีผลกระทบต่อค่าการวัด และเมื่อผล IQC และหรือ EQA/PT บ่งชี้ว่ามี systematic error ที่ต้องแก้ไขปัญหาด้วยการสอบเทียบใหม่ (renewed calibration)

9.1.2 การตรวจวัดค่าสารสอบเทียบเพื่อสร้าง Standard curve

9.1.2.1 สำหรับการสอบเทียบค่าการวัด Hemoglobin ใช้สารมาตรฐานจำนวน 2 ระดับ (S1 – S2 : C.f.a.s. HbA1c) ทำซ้ำอัตโนมัติระดับละ 2 ครั้งเพื่อหาค่าเฉลี่ย

9.1.2.2 สำหรับการสอบเทียบค่าการวัด HbA1c ใช้สารมาตรฐานจำนวน 6 ระดับ(S1 – S6 : C.f.a.s. HbA1c) ทำซ้ำอัตโนมัติระดับละ 2 ครั้งเพื่อหาค่าเฉลี่ย

9.2 วิธีการสอบเทียบ

9.2.1 ตรวจสอบรุ่นการผลิต (Lot) ของ C.f.a.s. HbA1c Cat. No. 04528417 190 ที่เตรียมจะใช้งาน โดย Lot ที่จะใช้งานต้องตรงกับ Lot ที่เคย download ข้อมูลการกำหนดค่าความเข้มข้นของ HbA1c เก็บไว้ในเครื่อง cobas c 501 ถ้าหาก Lot ที่จะใช้งานไม่ตรงกับ Lot ที่มีอยู่ในเครื่อง ให้ download ข้อมูล C.f.a.s. HbA1c Lot ใหม่ในขณะที่เครื่องอยู่ในสถานะ Standby โดยปฏิบัติตามหัวข้อ “การตรวจสอบ lot และการ download calibrator” ในคู่มือปฏิบัติงานเรื่อง Operator's manual cobas 6000 analyzer series (MN-LAB-065)

9.2.2 นำขวดที่บรรจุผง C.f.a.s. HbA1c มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10-20 นาที แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 2 mL โดยใช้ Volumetric pipette ปิดฝาขวดให้สนิท ตั้งขวดทิ้งไว้ 10-20 นาที เมื่อครบเวลาให้ผสมให้เข้ากันโดยการแกว่งสารละลายร่วมกับหมุนขวดเบาๆ ให้เป็นวงกลมโดยไม่ให้เกิดฟองอากาศ ห้ามผสมด้วยเครื่อง Mixer จากนั้นวางขวดคว่ำไว้อีก 5-10 นาที เมื่อครบเวลาให้ผสมให้เข้ากันจนส่วนที่เป็นผงละลายหมดแล้วจึงหงายขวดตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีกประมาณ 15-30 นาที เพื่อให้สารที่ละลายช้าละลายให้สมบูรณ์ เสร็จแล้วผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันอีกครั้งก่อนนำไปใช้งานที่อุณหภูมิห้อง หรือแบ่งเก็บที่อุณหภูมิ (-25 °C) – (-20 °C) ใน Hitachi cup 300-500 ไมโครลิตร /cup กรณีมีการนำ C.f.a.s. ที่เก็บแช่แข็งไว้มาใช้งานให้นำออกมาตั้งทิ้งไว้ที่



แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษัตริย์สระรา	
วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HbA1c	
รหัสเอกสาร : WI-LAB-036	หน้า 11 จาก 26 หน้า
แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

อุณหภูมิห้องประมาณ 10-20 นาที หรือจนกว่าจะหายเย็น แล้วจึงผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนการนำเข้าเครื่องตรวจวิเคราะห์

9.2.3 บรรจุ C.f.a.s HbA1c ที่ละลายจนพร้อมใช้งานแล้วประมาณ 300-500 ไมโครลิตรลงใน Sample cup(Hitachi cup) จำนวน 1 cup ใส่ลงในช่องที่ติดฉลากว่า “CF-A1C” ของ Rack สีดำ แล้วทำการ calibrate น้ำยา A1C-3 โดยการปฏิบัติตามหัวข้อ “การทำ calibration” ในคู่มือปฏิบัติงานเรื่อง Operator s manual cobas 6000 analyzer series(MN-LAB-065)

10. ขั้นตอนของกระบวนการ (procedural steps)

10.1 วิธีการเตรียมเครื่องมือ น้ำยา และตัวอย่างตรวจ ก่อนการตรวจวิเคราะห์

10.1.1 วิธีการเตรียมเครื่องมือ

10.1.1.1 เครื่องตรวจวิเคราะห์จะทำ Daily begin เวลา 05.00 น. โดยอัตโนมัติ

10.1.1.2 ลงชื่อเข้า(Operator ID) และรหัสผ่าน(Password) เพื่อเข้าใช้งานระบบ (logon)เครื่องตรวจวิเคราะห์ cobas 6000

10.1.1.3 ตรวจสอบปริมาณน้ำยา Auxiliary ที่บรรจุในรูปแบบ cassette ได้แก่ NaOH-D cassette, SMS cassette, 9%NaCl cassette ที่เหลือในเครื่อง ถ้าปริมาณน้ำยาต่ำกว่าระดับที่กำหนดไว้ หน้าจอจะแสดงพื้นหลังรายการน้ำยานั้นเป็นสีม่วง ให้ใส่น้ำยา cassette ใหม่เข้าไปแทน

10.1.1.4 ตรวจสอบปริมาณและเติมน้ำยา Auxiliary อื่นๆ ได้แก่ NaOH-D, Cell Detergent 1, Acid Wash Solution, Cell Detergent 2 ถ้าปริมาณน้ำยาต่ำกว่าระดับที่กำหนดไว้ หน้าจอจะแสดงพื้นหลังรายการน้ำยานั้นเป็นสีม่วง ให้ใส่น้ำยาขวดใหม่เข้าไปแทน

10.1.2 วิธีการเตรียมน้ำยา (reagent preparation)

10.1.2.1 นำ Cassette น้ำยา A1C-3 และ Hemolyzing Reagent Gen.2 ออกจากตู้เย็น แกะพลาสติกออก ระวังไม่ให้มือหรือน้ำสัมผัสแถบ barcode (กรณีมีน้ำยาเหล่านี้อยู่ในเครื่องแล้ว ให้ข้ามขั้นตอนนี้ไป)

10.1.2.2 เขียนวันเปิดใช้บน Cassette น้ำยา A1C-3และ Hemolyzing Reagent Gen.2 ก่อนนำเข้าเครื่อง และลงบันทึกการเปิดใช้น้ำยาแต่ละ Cassette ในแบบบันทึกการนำออกมาใช้งานน้ำยา สารมาตรฐาน วัสดุอ้างอิง สารควบคุม และสิ่งอุปกรณ์อื่นๆ (FM-LAB- 187)

10.1.2.3 นำ Cassette น้ำยา A1C-3และ Hemolyzing Reagent Gen.2 ใส่เครื่อง โดยหัน barcode ไปทางด้านขวา สอดเข้าตรง cassette loading port ดันเข้าไปเบาๆ ให้สุด ห้ามใส่น้ำยาเข้าไปในเครื่องขณะเครื่องอยู่ในสถานะ preparation เครื่องจะเจาะรูที่ฝาน้ำยาและนำไปเก็บใน reagent disk พร้อมกับ register น้ำยาโดยอัตโนมัติ โปรแกรมของระบบเครื่องมือจะเริ่มนับอายุของน้ำยาถอยหลังจนถึงวันหมดอายุที่กำหนดไว้ 4 สัปดาห์

10.1.3 การเตรียมตัวอย่างตรวจ

เอกสารควบคุม มีอายุการใช้งาน 1 ปี นับจากวันที่ปรับปรุงแก้ไขครั้งล่าสุด



แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษัตริย์สระรา	
วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HbA1c	
รหัสเอกสาร : WI-LAB-036	หน้า 12 จาก 26 หน้า
แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

- 10.1.3.1 สิ่งส่งตรวจต้องไม่อยู่ในลักษณะเข้าเกณฑ์ปฏิเสธสิ่งส่งตรวจ
- 10.1.3.2 สิ่งส่งตรวจมีสารรบกวนปฏิกิริยาได้ไม่เกินตามรายละเอียดในหัวข้อที่ 13. สารรบกวนการทดสอบ
- 10.1.3.3 ที่ด้านบนผิวของสิ่งส่งตรวจต้องไม่มีฟองหรือก้อนไฟบรินลอยอยู่ และควรมีปริมาณเลือดมากกว่า 1000 ไมโครลิตร
- 10.2 ถ้ายังไม่มี การสอบเทียบน้ำยา A1C-3 Lot ที่ใช้งานอยู่ ให้ดำเนินการตามข้อ 9.
- 10.3 ถ้ายังไม่มี การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างควบคุมคุณภาพในรอบวันนั้น ให้ดำเนินการตามวิธีการในข้อ 11.
- 10.4 นำตัวอย่างผู้ป่วยเข้าเครื่อง cobas c 501 ผ่าน core unit ของเครื่อง cobas 6000 analyzer series โดยสามารถใช้ Primary tube ขนาด 13x75 mm. ที่มีตัวอย่างไม่น้อยกว่า 1000 ไมโครลิตร วางบน Rack สีแดงคาดสีชมพูที่ถูกกำหนดไว้ให้ใช้เฉพาะการนำตัวอย่างเลือดผู้ป่วยเข้าเครื่องตรวจวิเคราะห์ HbA1c เท่านั้น ซึ่งสามารถใช้ได้ทั้งการตรวจในกรณีปกติและเร่งด่วน
- 10.5 สั่งทำการตรวจวิเคราะห์และเรียกดูผลตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือปฏิบัติงานเรื่อง Operator's manual cobas 6000 analyzer series(MN-LAB-065) โดยเครื่อง cobas c 501 จะทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยระบบอัตโนมัติ ตาม Test definition ที่กำหนดไว้ ดังนี้

Whole Blood application for Hb (HB-W3) and HbA1c (A1-W3)

cobas c 501/502 test definition Hb (HB-W3)

Assay type	1-Point		
Reaction time / Assay points	10 / 34		
Wavelength (sub/main)	660 / 376 nm		
Reaction direction	Increase		
Unit	mmol/L (g/dL)		
Reagent pipetting		Diluent (H ₂ O)	
R1	120 µL	-	
R3	24 µL	-	
Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent
		(Hemolyzing reagent)	
Normal	5 µL	-	-
Decreased	5 µL	-	-
Increased	5 µL	-	-

cobas c 501/502 test definition HbA1c (A1-W3)

Assay type	2-Point End
Reaction time / Assay points	10 / 34-70

เอกสารควบคุม มีอายุการใช้งาน 1 ปี นับจากวันที่ปรับปรุงแก้ไขครั้งล่าสุด



แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณสีเวรา	
วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HbA1c	
รหัสเอกสาร : WI-LAB-036	หน้า 13 จาก 26 หน้า
แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

Wavelength (sub/main)	660 / 340 nm		
Reaction direction	Increase		
Unit	mmol/L (g/dL)		
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)		
R1	120 µL	-	
R3	24 µL	-	
Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent
		(Hemolyzing reagent)	
Normal	5 µL	-	-
Decreased	5 µL	-	-
Increased	5 µL	-	-

Ratio definition for mmol/mol HbA1c and % HbA1c calculation

Protocol 1 (mmol/mol HbA1c acc. to IFCC):

Abbreviated ratio name	RWI3
Equation	$(A1-W3/HB-W3) \times 1000$
Unit	mmol/mol

Protocol 2 (% HbA1c acc. to DCCT/NGSP):


Abbreviated ratio name	RWD3 (891)
Equation	$(A1-W3/HB-W3) \times 91.5 + 2.15$
Unit	%

มีการใช้ Protocol 2 แล้วใน Application (ACN 891) ค่า mmol / mol HbA1c ตาม Protocol 1 (IFCC) ต้องคำนวณด้วยตนเองตามสมการข้างต้น หากมีการร้องขอการทดสอบที่คำนวณด้วยสูตรใน Protocol 1 สามารถตั้งโปรแกรมได้ภายใต้เมนู Utility > การทดสอบที่คำนวณบนเครื่องวิเคราะห์ cobas c 501 ให้ใช้การตั้งค่าต่อไปนี้

Sample Type	Supernt.
Unit of Measure	mM/M
Report Name	HbA1c Gen.3 IFCC
Item	RWI3
Formula	$(A1-W3/HB-W3) \times 1000$

อัตราส่วนของ HbA1c (mmol / mol HbA1c acc. to IFCC และ % HbA1c acc. to DCCT / NGSP) จะถูกคำนวณโดยอัตโนมัติหลังจากผลลัพธ์ของการทดสอบทั้งสอง แนะนำให้รายงานค่า % HbA1c (DCCT / NGSP) เป็นทศนิยมหนึ่งตำแหน่ง และค่า mmol / mol HbA1c (IFCC) โดยไม่มีตำแหน่งทศนิยมซึ่งสามารถป้อนได้ใน field “expected values” ที่แก้ไขได้

10.6 การรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ HbA1c ในโรงพยาบาลค่ายกฤษณสีเวรา ให้รายงานค่า HbA1c ของ NGSP/DCCT โดยรายงานเป็นค่าร้อยละ ใช้ทศนิยม 1 ตำแหน่ง

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายฤกษ์สึระรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HbA1c	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-036	หน้า 14 จาก 26 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

11. ขั้นตอนการควบคุมคุณภาพ (quality control procedures)

11.1 ข้อกำหนดในการควบคุมคุณภาพ

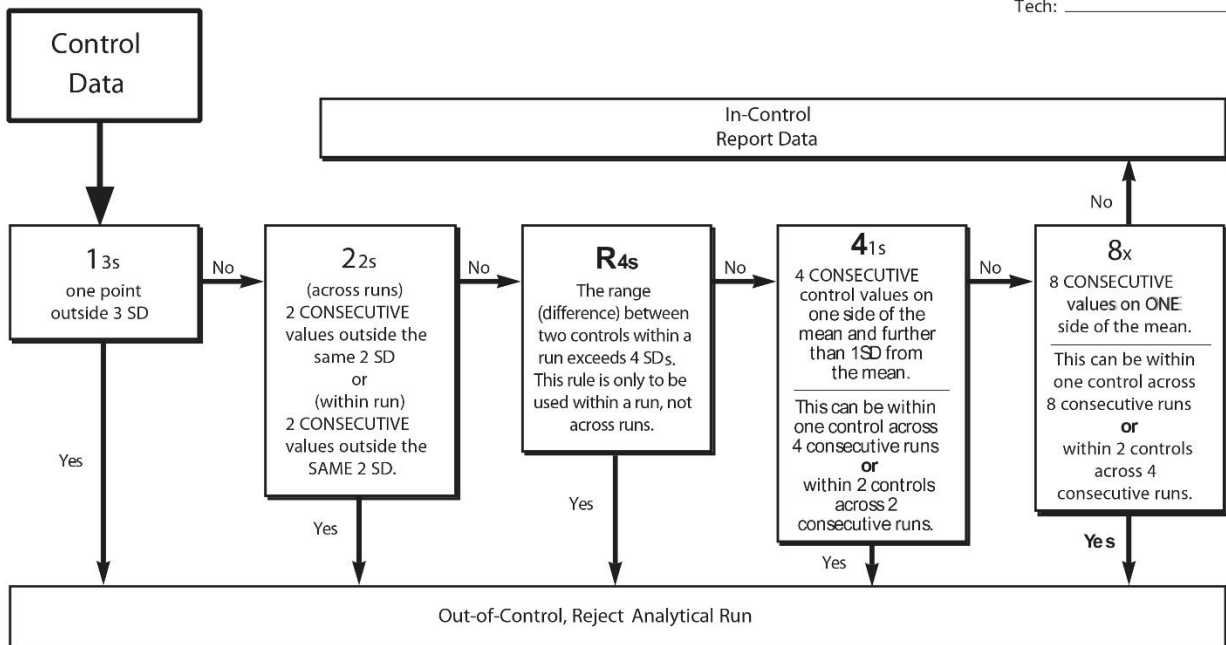
ให้อ้างอิงจากระเบียบปฏิบัติงานเรื่องการสร้างความมั่นใจในคุณภาพผลการวิเคราะห์ (WP-LAB-21)

11.1.1 เกณฑ์การตัดสินผลการควบคุมคุณภาพภายใน ให้พิจารณาเลือกใช้กฎบางกฎที่แนะนำไว้ใน Modern "Westgard Rules" ได้แก่ 1-3S, 2-2S หรือ 2of3-2S, R-4S ร่วมกับเกณฑ์ between run $CV \leq 0.33TEa$ และ Peer group $SDI \leq 1$ โดยการติดตามตรวจสอบและประเมินผลการควบคุมคุณภาพภายในของการตรวจวิเคราะห์ HbA1c ใน Quality control chart (Levey-Jennings chart) ที่สร้างขึ้นมาจากการหาค่า Mean, SD ของห้องปฏิบัติการ

Modern "Westgard Rules": N's of 2 and 4

Date: _____

Tech: _____



Problem: _____

Resolution: _____

Find out more at <http://www.westgard.com>

11.1.2 PreciControl HbA1c norm, PreciControl HbA1c path เป็นสารวัสดุควบคุมคุณภาพ ชนิดของเหลว ผลิตภัณฑ์ยี่ห้อ Roche ขนาดบรรจุขวดละ 1 mL ใช้ตรวจวิเคราะห์ HbA1c ทั้ง 2 ระดับทันทีหลังจากทำ Daily End maintenance เครื่อง cobas c 501 (ได้แก่ การทำ Clean probe and nozzles+Process green wash rack) แล้วเสร็จในช่วงเวลาประมาณ 15.00-18.00 น. ของแต่ละวัน ความถี่วันละ 1 ครั้ง (N=2, R=1)

11.1.3 องค์กร AACC และ ADA ได้แนะนำให้ห้องปฏิบัติการใช้สารวัสดุควบคุมคุณภาพอย่างน้อย 2 ระดับ (High และ low) ในตอนเริ่มต้นของวันและสิ้นสุดของวัน (2 control measurements เอกสารควบคุม มีอายุการใช้งาน 1 ปี นับจากวันที่ปรับปรุงแก้ไขครั้งล่าสุด



แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายฤกษ์สี่พระยา	
วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HbA1c	
รหัสเอกสาร : WI-LAB-036	หน้า 15 จาก 26 หน้า
แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

in each of 2 runs หรือ N=2, R=2) โดยแนะนำให้ใช้ทั้งสารวัสดุควบคุมคุณภาพที่ผลิตในเชิงพาณิชย์ และที่เป็นเลือดตัวอย่างที่ห้องปฏิบัติการจัดเตรียมเอง(in-house control) เพื่อป้องกันปัญหาจาก matrix effects ให้ห้องปฏิบัติการพิจารณาดำเนินการตามความเหมาะสม

11.1.4 ใช้ค่า Allowable total error(TEa) ของการทดสอบ HbA1c ดังต่อไปนี้

11.1.4.1 TEa= $\pm 0.4 \leq 6.7\%$ (อ้างอิงจาก RCPA)

11.1.4.2 TEa= $\pm 6\% > 6.7\%$ (อ้างอิงจาก RCPA, CAP)

11.1.5 การติดตามค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนของการทดสอบระหว่างวัน (between-day imprecision, between-run CV) โดยใช้เกณฑ์ที่ยอมรับดังต่อไปนี้

11.1.5.1 PreciControl HbA1c norm จัดเป็นกลุ่มสารวัสดุควบคุมคุณภาพที่มีค่า mean $\leq 6.7\%$ ให้คำนวณค่า CV จากเกณฑ์ between-run SD $\leq 0.40/3=0.13$ (จากสูตร Between-run SD $\leq 0.33TEa$ เมื่อ TEa = $\pm 0.4 \leq 6.7\%$) ตัวอย่างเช่น

- ถ้าค่า mean ของ PreciControl HbA1c norm = 5.20%, ดังนั้น เกณฑ์ between run CV $\leq 2.56\%$ (คำนวณจาก $0.13 \times 100 / 5.20$)

11.1.5.2 PreciControl HbA1c path จัดเป็นกลุ่มสารวัสดุควบคุมคุณภาพที่มีค่า mean ของ HbA1c $> 6.7\%$ เช่น ถ้าค่า mean ของ PreciControl HbA1c path = 9.54% ให้ใช้เกณฑ์ between-run CV $\leq 2\%$

11.1.2 PreciControl HbA1c norm & path เป็นสารวัสดุควบคุมคุณภาพที่เป็นของเหลวขนาดบรรจุขวดละ 1 mL เมื่อยังไม่เปิดขวดใช้งานจะถูกเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 °C มีอายุการใช้งานตามที่ระบุไว้ข้างขวด เมื่อจะเปิดใช้งานต้องนำขวดที่จะใช้งานออกมาตั้งทิ้งไว้นอกตู้เย็นเป็นเวลา 10-20 นาที จนได้อุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องก่อนเทแบ่งออกไปใช้งาน ส่วนที่แบ่งไปตรวจเสร็จแล้วห้ามนำมาตรวจซ้ำอีก ส่วนที่เหลือในขวดบรรจุเริ่มต้นที่เปิดใช้งานแล้วให้นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 °C มีอายุการใช้งานไม่เกิน 28 วัน เมื่อจะใช้งานซ้ำให้ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันในขวดบรรจุเริ่มต้นก่อนเทแบ่งมาประมาณ 100 ไมโครลิตร ลงใน Hitachi cup ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10-20 นาที ก่อนผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปเข้าเครื่องตรวจวิเคราะห์ได้

11.2 วิธีการควบคุมคุณภาพ

11.2.2 ตรวจสอบ Lot ของสารวัสดุควบคุมคุณภาพระหว่าง Lot ที่จะใช้งานกับ Lot ที่มีอยู่ในเครื่อง ถ้า Lot ไม่ตรงกันให้ download ข้อมูลของสารวัสดุควบคุมคุณภาพให้ตรงกันกับ Lot ใหม่ ในขณะที่เครื่องอยู่ในสถานะ Standby เท่านั้น

11.2.3 เตรียมสารวัสดุควบคุมคุณภาพ(control material) ให้พร้อมใช้ตามวิธีการที่ผู้ผลิตกำหนดไว้ในเอกสารแนบของสารวัสดุควบคุมคุณภาพที่ใช้งาน

11.2.4 บรรจุสารวัสดุควบคุมคุณภาพปริมาตร 100 ไมโครลิตร(sample dead volume =100 uL) ลงใน Sample cup (Hitachi cup) แล้วนำไปวางใน Rack สีขาว ในตำแหน่งที่กำหนดไว้

11.2.5 สั่งให้เครื่องทำ control โดยการปฏิบัติตามหัวข้อ “การทำ Control” ในคู่มือปฏิบัติงาน Operator s manual cobas 6000 analyzer series(MN-LAB-065)



แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายฤกษ์สี่พระยา	
วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HbA1c	
รหัสเอกสาร : WI-LAB-036	หน้า 16 จาก 26 หน้า
แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

11.2.6 ติดตามตรวจสอบผล IQC ของการทดสอบ HbA1c ด้วยกฎการควบคุมคุณภาพ(control rule) ตาม QC procedure ที่กำหนดไว้อย่างสม่ำเสมอต่อเนื่องด้วยข้อมูลที่เป็นกราฟ ให้ติดตามแนวโน้ม ความเสี่ยงที่จะเกิดความคลาดเคลื่อน เพื่อเตรียมการแก้ไขและป้องกันก่อนทำการทดสอบตัวอย่างผู้ป่วย ดังนี้

11.2.6.1 การติดตามผล IQC จากผลการตรวจวิเคราะห์PreciControl ClinChem Multi 1, PreciControl ClinChem Multi 2

- ให้ติดตามตรวจสอบผล IQC เบื้องต้นของการตรวจ HbA1c ในรูปแบบกราฟผ่าน control unit ของเครื่อง cobas 6000 ได้ 3 รูปแบบที่เมนู **QC > run status** (แสดงผล QC ของทุก test ในกราฟเดียวกัน แสดงค่าของแต่ละ test ว่าตกอยู่ในขอบเขต $mean \pm 2SD$ หรือไม่), **QC > individual**(ใช้ตรวจสอบผล IQC โดยละเอียดเป็นราย test มีกราฟแบบ Levey-Jennings Chart) และ **QC > cumulative** (คล้ายหน้า individual เป็นข้อมูลในหน้า individual ซึ่งถูกเลือกเป็นตัวแทนมาเก็บไว้ที่หน้า cumulative)
- ติดตามตรวจสอบผล IQC ให้ละเอียดมากขึ้น สำหรับการตรวจวิเคราะห์ HbA1c ใน Levey-Jennings chart โดยใช้โปรแกรม TIQCon (Total Integrated Quality Control for clinical laboratory)ผลิตภัณฑ์ Roche ช่วยประมวลผล รวมถึงการเปรียบเทียบผลกับ Peer group และ ตรวจสอบผล IQC แบบอัตโนมัติตาม control rule ที่กำหนดไว้

11.1.6 เมื่อผลการทำ IQC มีการละเมิดกฎการควบคุมคุณภาพ (out of control) และผลการทดสอบ HbA1c มีแนวโน้มที่จะผิดพลาดทางคลินิกอย่างมีนัยสำคัญให้ผู้จัดการคุณภาพพิจารณาสั่งออกผลการตรวจตัวอย่างผู้ป่วย ผู้จัดการวิชาการเคมีคลินิกและผู้เกี่ยวข้องร่วมกันดำเนินการแก้ไขและทวนสอบลักษณะประสิทธิภาพ ลงบันทึกรายละเอียดการปรับปรุงแก้ไขที่ทำไปเพื่อป้องกันการเกิดซ้ำในแบบบันทึกปฏิบัติการแก้ไขกรณีผล IQC ไม่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานยอมรับคุณภาพ (FM-LAB-025) เมื่อทำการแก้ไขสาเหตุของความคลาดเคลื่อนแล้ว จึงจะตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างผู้ป่วยซ้ำ รวมทั้งย้อนกลับไปพิจารณารายงานผลวิเคราะห์ที่ออกผลไปแล้วนับตั้งแต่การทำควบคุมคุณภาพภายในรอบก่อนหน้านั้น

หมายเหตุ : TIQCon is Web base peer group comparison tool(inter-laboratory) for Roche SWA customers using Roche manufactured controls.

12. ขั้นตอนการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ (Interlaboratory comparisons)

การเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ (Interlaboratory comparisons) ให้ดำเนินการตามระเบียบปฏิบัติงานเรื่องการสร้างความมั่นใจในคุณภาพผลการวิเคราะห์(WP-LAB-21) โดยมีข้อกำหนดที่สำคัญ ดังนี้

12.1 ห้องปฏิบัติการเข้าร่วม RIQAS Glycated Haemoglobin (HbA1c) EQA programme เพื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ HbA1c ระหว่างห้องปฏิบัติการ ซึ่งให้บริการโดย Randox Laboratories Limited มีกำหนดการสมัครสมาชิกปีละ 1 ครั้ง ควรสมัครสมาชิกในห้วงไม่เกินเดือนธันวาคมของทุกปี ความถี่ในการประเมินเดือนละ 1 ครั้ง ตั้งแต่เดือนมกราคม-ธันวาคม รวม 12 ครั้ง/ปี

เอกสารควบคุม มีอายุการใช้งาน 1 ปี นับจากวันที่ปรับปรุงแก้ไขครั้งล่าสุด



แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษัตริย์สุวรา	
วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HbA1c	
รหัสเอกสาร : WI-LAB-036	หน้า 17 จาก 26 หน้า
แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

12.2 ผู้ตรวจวิเคราะห์ที่รับผิดชอบงานตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกในขณะนั้นดำเนินการตรวจวิเคราะห์หาค่า HbA1c ในตัวอย่างจากโปรแกรม RIQAS โดยการตรวจพร้อมกันไปกับการตรวจตัวอย่างผู้ป่วยในงานประจำวันไม่เกินวันกำหนดส่งรายงานที่ระบุไว้ในเอกสารแนบมาที่กล่องบรรจุตัวอย่าง RIQAS

12.3 บันทึกส่งรายงานผลและดูผล online ทาง www.riqas.net/

12.4 เมื่อโปรแกรม RIQAS ประเมินผลเสร็จแล้ว ให้ Download รายงานผลมาเก็บไว้ใช้ทบทวนประสิทธิภาพในการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ

12.5 ตรวจสอบผลการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ โดยใช้เกณฑ์และเป้าหมายดังนี้

12.5.1 เกณฑ์ดัชนีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SDI) ≤ 2 เป้าหมาย SDI ≤ 1.5

12.5.2 เกณฑ์และเป้าหมายค่า Target Score > 50 คะแนน

12.5.3 % Deviation ใช้เกณฑ์และเป้าหมายดังต่อไปนี้

- เกณฑ์ % DEV $\leq 6.80\%$ (Acceptable limits of performance for RIQAS)

- เป้าหมาย %DEV \leq Bias goal, เมื่อ Bias goal $\leq 2.70\%$

12.5.4 เกณฑ์ TE $< TEa$, เป้าหมาย TE $< 0.5TEa$ (for safety margin) เมื่อ TEa = $\pm 6\%$ ที่ค่า

HbA1c $> 6.7\%$, $\pm 0.40\%$ ที่ค่า HbA1c $\leq 6.7\%$, โดยใช้สูตรคำนวณ

$\%TE = \%Bias + 1.65\%CV$ เมื่อ $\%Bias = \%DEV$, $\%CV =$ between-run CV

12.6 ผู้จัดการวิชาการเคมีคลินิกและเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องหารือกันเมื่อผลประเมิน RIQAS การทดสอบ HbA1c ไม่เป็นไปตามเกณฑ์หรือเป้าหมายที่กำหนด วิเคราะห์สาเหตุที่แท้จริง ดำเนินการปฏิบัติการแก้ไขเพื่อป้องกันการเกิดซ้ำ และบันทึกมาตรการแก้ไข/ป้องกันในแบบบันทึกปฏิบัติการแก้ไขกรณีผล EQA ไม่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานยอมรับคุณภาพ (FM-LAB-020)

13. ข้อจำกัดและสิ่งรบกวน (Limitations – interference)

13.1 ข้อจำกัด

13.1.1 สำหรับการใช้ระดับค่า mmol/mol HbA1c (IFCC) และ % HbA1c (DCCT/NGSP) เพื่อวัตถุประสงค์ในการวินิจฉัย ควรใช้ข้อมูลจากขั้นตอนการวินิจฉัยอื่นๆและการประเมินทางคลินิกร่วมด้วย

13.1.2 การทดสอบนี้ออกแบบมาเพื่อความถูกต้องและแม่นยำในรูปแบบ mmol/mol HbA1c (IFCC) และ % HbA1c (DCCT/NGSP) เท่านั้น ไม่ควรรายงานผลความเข้มข้นแยกแต่ละรายการของ Hb และ HbA1c

13.1.3 ตามหลักการตรวจวิเคราะห์นี้ ให้พิจารณาตรวจเมื่อแปลผล HbA1c ในผู้ป่วยที่มี Hb variants ความผิดปกติของ hemoglobins อาจมีผลต่อครึ่งชีวิต (half-life) ของเม็ดเลือดแดง หรือ glycation rates ในร่างกาย ในกรณีเหล่านี้ ถึงแม้ผลการตรวจจะถูกต้อง แต่ไม่ได้สะท้อนการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดเช่นเดียวกับที่คาดหวังในผู้ป่วยที่มี Hb ปกติ ดังนั้น เมื่อใดก็ตามที่สงสัยว่าผู้ป่วยมี Hb variant (เช่น HbSS, HbCC or HbSC) ซึ่งมีผลต่อความสัมพันธ์ระหว่างค่า HbA1c และผลการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด (glycemic control) กรณีนี้จึงห้ามใช้ค่า HbA1c ในการวินิจฉัยโรคเบาหวาน (diabetes mellitus)

13.1.4 การมีสาเหตุใดๆ ก็ตามที่ทำให้การอยู่รอดของเม็ดเลือดแดงในร่างกายสั้นลงหรือทำให้อายุขัยเฉลี่ยของเม็ดเลือดแดงลดลงจะลดการสัมผัสกันของเม็ดเลือดแดงกับกลูโคส ส่งผลกระทบให้มีเอกสารควบคุม มีอายุการใช้งาน 1 ปี นับจากวันที่ปรับปรุงแก้ไขครั้งล่าสุด




แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษัตริย์สุวระรา	
วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HbA1c	
รหัสเอกสาร : WI-LAB-036	หน้า 18 จาก 26 หน้า
แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

การลดลงของระดับค่า mmol/mol HbA1c (IFCC) และ % HbA1c (DCCT/NGSP) ถึงแม้ว่าเวลานั้นค่าเฉลี่ยของระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดอาจจะสูงขึ้นก็ตาม สาเหตุที่ทำให้อายุขัยของเม็ดเลือดแดงลดลงอาจเกิดได้จาก hemolytic anemia หรือ hemolytic diseases อื่นๆ, homozygous sickle cell trait, ผู้ที่ตั้งครรภ์, การสูญเสียเลือดอย่างมีนัยสำคัญทั้งกรณีแบบเรื้อรังหรือเกิดเมื่อเร็วๆนี้ เป็นต้น ในทำนองเดียวกันในผู้ป่วยที่ได้รับการถ่ายเลือดสามารถเปลี่ยนแปลงค่า mmol/mol HbA1c (IFCC) และ % HbA1c (DCCT/NGSP) โดยอาจทำให้เพิ่มขึ้นหรือลดลงก็ได้ การที่ HbA1c เพิ่มขึ้นเป็นผลมาจากการเพิ่มเลือดให้ผู้ป่วยซึ่งเป็นเม็ดเลือดแดงที่เก็บไว้ในถุงเลือดที่มีสารเก็บรักษาเม็ดเลือดซึ่งมีระดับน้ำตาลสูงกว่าสภาพปกติ ทำให้เกิดกระบวนการ glycation อยู่ตลอดเวลาในถุงเลือด แม้ว่าอายุขัยของเม็ดเลือดแดงที่เพิ่มเข้าไปนี้อาจจะไม่ยืนยาวนัก) จึงควรระมัดระวังเมื่อแปลผล HbA1c ในผู้ป่วยที่มีเงื่อนไขเหล่านี้ และไม่ควรรู้ใช้ HbA1c ในการวินิจฉัยโรคเบาหวานในกรณีที่มีภาวะดังกล่าวนี้

- 13.1.5 หากอายุของเม็ดเลือดแดงยาวนานขึ้น จะส่งผลให้ค่า HbA1c เพิ่มขึ้นกว่าที่ควร เกิดผลบลวง ในขณะที่หากอายุของเม็ดเลือดแดงสั้นลง จะทำให้ค่า HbA1c จะลดลงกว่าที่ควร ก่อให้เกิดผลบลวง ดังตารางต่อไปนี้

Anemia	Pathophysiology	Effect to HbA1c Result
Iron deficiency anemia	↑ RBC life-span	↑ HbA1c เกิดผลบลวง
Splenectomy	↑ RBC life-span	↑ HbA1c เกิดผลบลวง
Hemolytic anemia	↓ RBC life-span	↓ HbA1c เกิดผลบลวง
Hemoglobinopathy	↓ RBC life-span	↓ HbA1c เกิดผลบลวง
Hypersplenism	↓ RBC life-span	↓ HbA1c เกิดผลบลวง

- 13.1.6 วิธีการทดสอบนี้ไม่สามารถตรวจพบ Glycated HbF เนื่องจากไม่มี glycated β -chain ที่จะทำให้เกิด HbA1c อย่างไรก็ตาม HbF จะถูกตรวจวัดในการตรวจหา total Hb และด้วยเหตุนี้ สิ่งส่งตรวจที่มีปริมาณ HbF สูง (> 10 %) อาจทำให้ระดับค่า mmol/mol HbA1c (IFCC) และ % HbA1c(DCCT/NGSP) ต่ำกว่าค่าที่คาดไว้(falsely decreases)
- 13.1.7 ระดับค่า mmol/mol HbA1c(IFCC) และ % HbA1c(DCCT/NGSP) ไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการวินิจฉัยโรคเบาหวานขณะตั้งครรภ์(gestational diabetes) เนื่องจากขณะตั้งครรภ์มีการสร้างฮอร์โมน human placental lactogen(hPL) ก่อให้เกิดภาวะดื้ออินซูลิน และเพิ่มการใช้พลังงานจากไขมัน เพื่อสงวนพลังงานจากน้ำตาลไว้ให้กับทารกในครรภ์ ส่งผลให้การตั้งครรภ์ปกตินั้นจะตรวจพบว่ามีภาวะ fasting hypoglycemia และ ภาวะ postprandial hyperglycemia และภาวะ hyperinsulinemia ซึ่งฮอร์โมน hPL จะเพิ่มปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ ตามอายุครรภ์ เพิ่มสูงสุดในช่วงอายุครรภ์ 34-36 สัปดาห์
- 13.1.8 ในรายที่พบได้ยากของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 1 การเพิ่มขึ้นของ HbA1c อาจล่าช้าเมื่อเทียบกับการเพิ่มขึ้นอย่างฉับพลันของความเข้มข้นของกลูโคสในพลาสมาและ/หรืออาการทางคลินิกทั่วไป ในสภาวะเหล่านี้ต้องวินิจฉัยโรคเบาหวานโดยพิจารณาจากความเข้มข้นของ plasma glucose และ/หรืออาการทางคลินิกทั่วไป

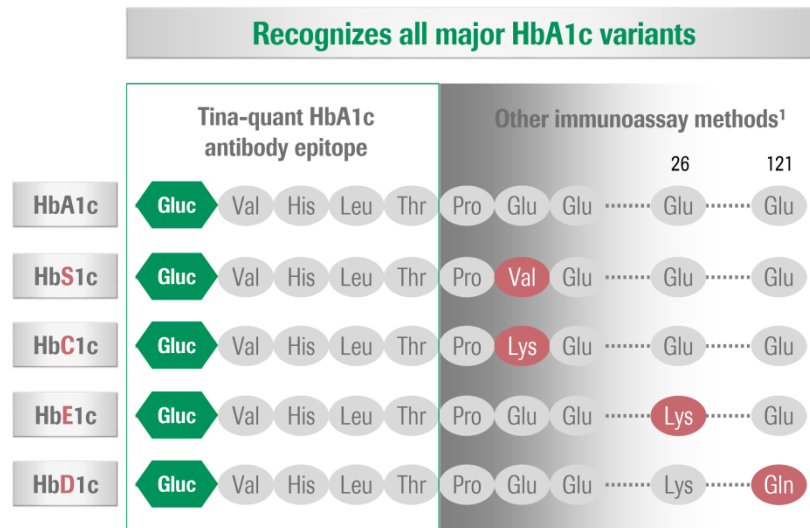
	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HbA1c	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-036	หน้า 19 จาก 26 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

13.1.9 ข้อสังเกตที่ควรสงสัยว่าผู้ป่วยอาจมี Hemoglobinopathy (ได้แก่ thalassemia และ Hb variants)

- เมื่อผลของ HbA1c ไม่สอดคล้องกับอาการของผู้ป่วยหรือไม่เป็นไปตามที่คาดไว้
- ค่า HbA1c ต่ำกว่าเกณฑ์ควบคุมเบาหวานมากๆ จนตกมาอยู่ในช่วงค่าอ้างอิงของคนปกติ หรือต่ำกว่าค่าต่ำสุดของช่วงค่าอ้างอิงคนปกติ
- เมื่อค่า HbA1c สูงมากๆ เช่น สูงเกิน 15%
- ค่าระดับ Glucose ในเลือด ไม่สัมพันธ์กับค่า HbA1c

Tina-quant® HbA1c from Roche

Not affected by common Hb variants



Reference: 1. HbA1c Assay Interferences. NGSP. September 2014. <http://www.ngsp.org/interf.asp>. Accessed January 14, 2015.

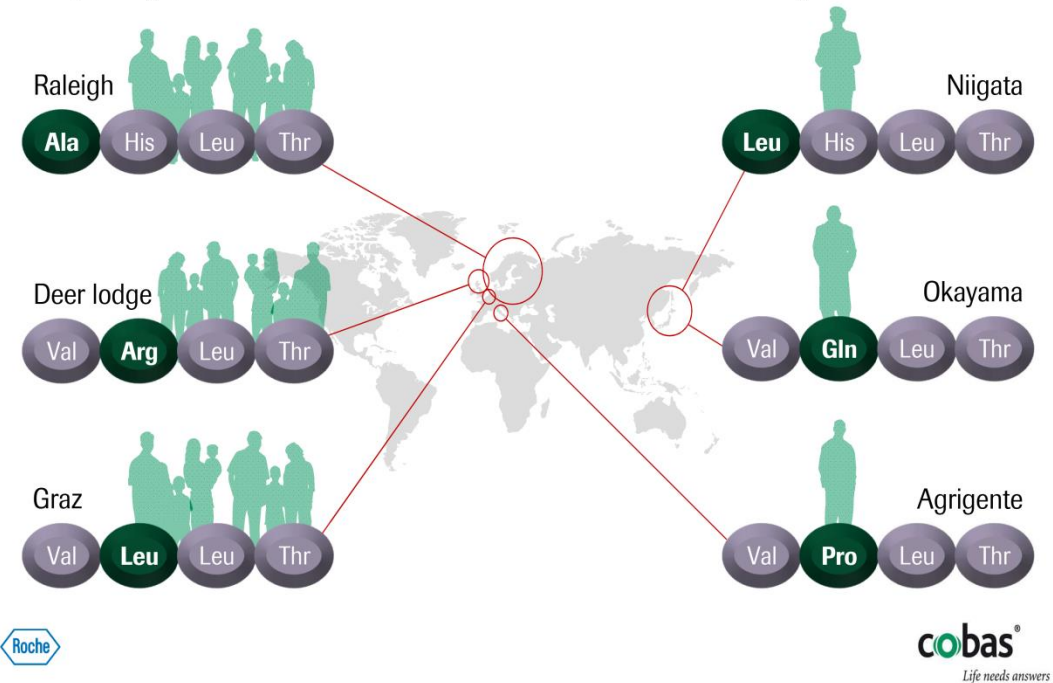


cobas
Life needs answers



Interference of rare variants of the Immunoassay

Only very rare variants have been shown to interfere



13.2 สิ่งรบกวน

Criterion: Recovery within $\pm 10\%$ of initial value.


13.2.1 Icterus: No significant interference up to an I index of 60 for conjugated and unconjugated bilirubin (approximate conjugated and unconjugated bilirubin concentration: 1026 $\mu\text{mol/L}$ or 60 mg/dL).

13.2.2 Lipemia (Intralipid): No significant interference up to an Intralipid concentration of 600 mg/dL. There is poor correlation between triglycerides concentration and turbidity.

13.2.3 Glycemi : No significant interference up to a glucose level of 55.5 mmol/L (1000 mg/dL). A fasting sample is not required. Rheumatoid factors: No significant interference from rheumatoid factors up to a concentration of 750 IU/mL.

13.2.4 Drugs: No interference was found at therapeutic concentrations using common drug panels.

13.2.5 Other: No cross reactions with HbA0, HbA1a, HbA1b, acetylated hemoglobin, carbamylated hemoglobin, glycated albumin and labile HbA1c were found for the anti-HbA1c antibodies used in this kit. For diagnostic purposes, the results

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษัตริย์สระรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HbA1c	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-036	หน้า 21 จาก 26 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

should always be assessed in conjunction with the patient's medical history, clinical examination and other findings.

14. หลักการของขั้นตอนการคำนวณเพื่อให้ได้ผลลัพธ์ รวมทั้งที่เกี่ยวข้องกับความไม่แน่นอนของการวัด (principle of procedure for calculating results including, where relevant, the measurement uncertainty of measured quantity values)

14.1 เครื่อง cobas c 501 จะคำนวณค่าความเข้มข้นของ HbA1c ในแต่ละตัวอย่างตรวจให้โดยอัตโนมัติ

Protocol 1 (mmol/mol HbA1c acc. to IFCC):

$$\text{HbA1c (mmol/mol)} = (\text{HbA1c/Hb}) \times 1000$$

Protocol 2 (% HbA1c acc. to DCCT/NGSP):

$$\text{HbA1c (\%)} = (\text{HbA1c/Hb}) \times 91.5 + 2.15$$

14.2 การแปลงค่า HbA1c จาก NGSP unit (%) เป็น SI unit (mmol/mol)

$$\text{IFCC} = (10.93 \times \text{NGSP}) - 23.50$$

$$\text{หรือ IFCC} = (\text{NGSP} - 2.15) \times 10.929$$

14.3 การแปลงค่า HbA1c ไปเป็นค่าน้ำตาล glucose เรียกว่าค่า estimated average glucose (eAG)

$$\text{eAG (mg/dL)} = (28.7 \times \text{A1c NGSP}) - 46.7$$

$$\text{eAG (mmol/L)} = (1.59 \times \text{A1c NGSP}) - 2.59$$

14.4 การคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวัด HbA1c ให้ปฏิบัติตาม “หัวข้อ 4.4 การตรวจสอบความไม่แน่นอนของการวัดจากค่าเชิงปริมาณ ในเรื่องระเบียบปฏิบัติงานเรื่อง การจัดการกระบวนการทดสอบ (WP-LAB-20)” ลงบันทึกไว้ใน “ตารางการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดในการทดสอบเชิงปริมาณวิเคราะห์(FM-LAB-281)”

15. ช่วงอ้างอิงทางชีวภาพหรือค่าการตัดสินใจทางคลินิก (biological reference intervals or clinical decision values)

15.1 ค่าอ้างอิงของคนปกติที่มีสุขภาพดี

Protocol 1 (mmol/mol HbA1c acc. to IFCC): 29-42 mmol/mol HbA1c

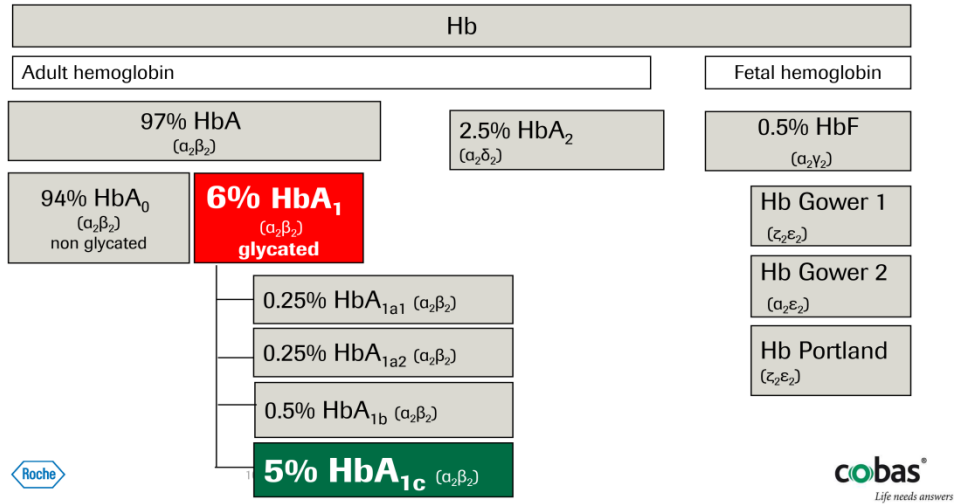
Protocol 2 (% HbA1c acc. to DCCT/NGSP): 4.8-5.9 % HbA1c

This reference range was obtained by measuring 474 well-characterized healthy individuals without diabetes mellitus.



แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษัตริย์สุวรา	
วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HbA1c	
รหัสเอกสาร : WI-LAB-036	หน้า 22 จาก 26 หน้า
แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

Physiological Hemoglobin in healthy adults



ทั้งองค์กร AACC และ ADA ได้แนะนำให้ห้องปฏิบัติการทำการตรวจสอบยืนยันผลให้ชัดเจน และรายงานผลให้แพทย์ผู้รักษาทราบว่า ผู้ป่วยอาจมีความผิดปกติ เช่น Hemoglobin variants หรือสิ่งรบกวนต่างๆ และควรจะทำการศึกษาครั้งต่อไปด้วยวิธีที่ใช้หลักการที่ต่างกัน สำหรับสิ่งส่งตรวจที่พบว่า HbA1c >15% (140 mmol/L) และผล HbA1c ต่ำกว่าค่าต่ำของค่าอ้างอิง นอกจากนี้ยังแนะนำให้ทำการตรวจสอบหาสาเหตุ หากพบว่าผลการตรวจวิเคราะห์ไม่สอดคล้องกับอาการทางคลินิก

15.2 ค่าการตัดสินใจทางคลินิก

15.2.1 ตามคำแนะนำของ American Diabetes Association values

- ระดับ HbA1c $\geq 6.5\%$ (48 mmol/mol) เป็นเกณฑ์ที่ใช้ในการวินิจฉัยเบาหวาน (diagnosis of diabetes mellitus)
- ระดับ HbA1c ในช่วง 39-46 mmol/mol HbA1c (IFCC) หรือ 5.7-6.4 % HbA1c (DCCT/NGSP) มีความเสี่ยงที่จะเป็นเบาหวาน
- ระดับ HbA1c ต่ำกว่า 53 mmol/mol (IFCC) หรือ 7 % (DCCT/NGSP) เป็นเป้าหมายในการควบคุมเบาหวานของ American Diabetes Association.

15.2.2 ระดับ HbA1c 195 mmol/mol (IFCC) หรือ 20 % (DCCT/NGSP) หรือสูงกว่า แสดงผลการควบคุมเบาหวานได้ไม่ดี

15.2.3 ระดับ HbA1c มากกว่าหรือเท่ากับ 64 mmol/mol HbA1c (IFCC) หรือ 8 % HbA1c (DCCT/NGSP) เป็นระดับที่แนะนำให้ทำการรักษา

15.2.4 ระดับ HbA1c ต่ำกว่า reference range อาจบ่งบอกว่ามีภาวะระดับน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia) การมี Hb variants หรือมีอายุของเม็ดเลือดแดงสั้นลง ห้องปฏิบัติการต้องตรวจสอบ expected values และจำเป็นต้องมีค่าอ้างอิงสำหรับกลุ่มผู้ป่วยเหล่านี้



แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษัตริย์เสนา	
วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HbA1c	
รหัสเอกสาร : WI-LAB-036	หน้า 23 จาก 26 หน้า
แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

15.2.5 เป้าหมายการควบคุมเบาหวานและปัจจัยเสี่ยงสำหรับผู้ใหญ่

การทดสอบทางห้องปฏิบัติการเพื่อติดตามการควบคุมเบาหวาน	เป้าหมาย		
	ควบคุมเข้มงวดมาก	ควบคุมเข้มงวด	ควบคุมไม่เข้มงวด
ระดับน้ำตาลในเลือดขณะอดอาหาร (FPG)	>70-110 mg/dL	80-130 mg/dL	140-170 mg/dL
ระดับน้ำตาลในเลือดหลังอาหารสองชั่วโมง (2h-PG)	<140 mg/dL	-	
ระดับน้ำตาลในเลือดสูงสุดหลังอาหาร(R-PG)	-	<180 mg/dL	-
HbA1c	<6.5 %	<7 %	7-8 %

หมายเหตุ : ปัญหาของการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดเข้มงวดมากคือเกิดภาวะน้ำตาลต่ำในเลือด (hypoglycemia) และน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น โดยทั่วไปเป้าหมายการควบคุมคือ HbA1c <7.0 % ซึ่งสัมพันธ์กับระดับน้ำตาลในเลือดขณะอดอาหาร 80-130 mg/dL

16. ช่วงที่รายงานผลการทดสอบได้ (reportable interval of examination results)

ค่า AMR (Analytical Measurement Range) ของ HbA1c

16.1 Hemoglobin: 2.48-24.8 mmol/L (4-40 g/dL).

16.2 HbA1c : 0.186-1.61 mmol/L (0.3-2.6 g/dL)

ค่า AMR นี้สอดคล้องกับช่วงการวัด 23-196 mmol / mol HbA1c (IFCC) และ 4.2-20.1% HbA1c (DCCT / NGSP) ที่ความเข้มข้นของ Typical hemoglobin 8.2 mmol / L (13.2 g / dL)

ในบางกรณีที่เกิดขึ้นไม่บ่อยนัก ถ้ามีสัญลักษณ์เตือน(flags)“> Test” ซึ่งอาจเกิดขึ้นกับการใช้ตัวอย่างเลือดครบส่วน ให้ผสมตัวอย่างเลือดให้เข้ากัน แล้วทำการวิเคราะห์ซ้ำ แนะนำให้ปิดฟังก์ชัน auto rerun อัตโนมัติ

16.3 ค่าต่ำสุดที่วัดได้ (Lower limits of measurement)

Limit of Blank and Limit of Detection

Hemoglobin:

Limit of Blank = 0.31 mmol/L (0.50 g/dL)

Limit of Detection = 0.62 mmol/L (1.00 g/dL)

HbA1c:

Limit of Blank = 0.12 mmol/L (0.19 g/dL)

Limit of Detection = 0.18 mmol/L (0.29 g/dL)

17. คำแนะนำสำหรับการพิจารณาผลเชิงปริมาณเมื่อผลไม่ได้อยู่ในช่วงการวัด

(instructions for determining quantitative results when a result is not within the measurement interval)

ไม่มี

18. ค่าวิกฤติ/ค่าแจ้งเตือนที่เหมาะสม (alert/critical values, where appropriate)

ไม่มี



แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายฤกษ์สี่พระยา	
วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HbA1c	
รหัสเอกสาร : WI-LAB-036	หน้า 24 จาก 26 หน้า
แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

19. การแปลผลทางคลินิกของห้องปฏิบัติการ (laboratory clinical interpretation)

- 19.1 การพบค่า HbA1c ในระดับที่สูงกว่าค่าอ้างอิง(มากกว่า 5.9%) บ่งชี้ว่ามีภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) ในช่วง 2-3 เดือนที่ผ่านมาหรือนานกว่านั้น ยิ่ง HbA1c สูงมากขึ้นเท่าใด ก็ยิ่งสะท้อนสภาวะน้ำตาลในเลือดที่สูงมากขึ้นเท่านั้น
- 19.2 ระดับของ HbA1c สัมพันธ์โดยตรงกับระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดโดยระดับของ HbA1c จะเพิ่มขึ้นร้อยละ 1 เมื่อระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดเพิ่มขึ้น 30 mg/dL
- 19.3 ระดับ HbA1c สะท้อนสภาวะของน้ำตาลที่ย้อนหลังกลับไปเท่ากับอายุขัยของเม็ดเลือดแดงคือ ประมาณ 120 วัน กล่าวคือประมาณ 50% ของ HbA1c สะท้อนปฏิกิริยา(glucose ทำปฏิกิริยากับ HbA เกิด HbA1c) ที่เกิดขึ้นในช่วงเวลา 30 วันย้อนหลัง ขณะที่ราว 25%, 15% และ 10% สะท้อนปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในช่วงเวลา 60, 90 และ 120 วันย้อนหลังกลับไป ตามลำดับ
- 19.4 ระดับ HbA1c น้อยกว่า 7.0% สะท้อนการรักษาที่ได้ผลดี แสดงว่าระดับน้ำตาลในเลือดได้รับการควบคุมให้ต่ำลงและคงที่ได้ดีเพียงใด
- 19.5 ใช้ระดับ HbA1c ในการพยากรณ์ภาวะแทรกซ้อนระยะยาว หากผลการควบคุมเป็นไปตามเป้าหมาย (HbA1c น้อยกว่า 7%) ผู้ป่วยเบาหวานจะมีคุณภาพชีวิตที่ดีในระยะยาวมากกว่ากลุ่มที่ผลการควบคุมไม่เป็นไปตามเป้าหมาย ซึ่งมีโอกาสเสี่ยงที่จะเกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ที่ก่อปัญหาเกี่ยวกับคุณภาพชีวิตเพิ่มสูงขึ้นและเกิดเร็วขึ้นได้
- 19.6 ทุกร้อยละ 10 ของการลดลงของค่า HbA1c เช่น จาก 12% เป็น 10% หรือ จาก 8% เป็น 7.2% เป็นต้น ช่วยลดโอกาสของการเกิดจอประสาทตาเสื่อมจากเบาหวาน(diabetic retinopathy) ลงถึงร้อยละ 45 ในอีกนัยหนึ่งผู้ป่วยเบาหวานที่มีค่า HbA1c=10% มีความเสี่ยงที่จะเกิดจอประสาทตาเสื่อมสูงกว่าผู้ป่วยเบาหวานที่มี HbA1c = 7.5% ถึง 3 เท่า
- 19.7 มีการศึกษาพบว่า ร้อยละ 25-50 ของผู้ที่มี HbA1c ช่วง 6.0-6.5% จะป่วยเป็นเบาหวานใน 5 ปี ในขณะที่ร้อยละ 9-25 ของผู้ที่มี HbA1c ช่วง 5.5-6.0% จะป่วยเป็นเบาหวานใน 5 ปี มีเพียงร้อยละ 5 ของผู้ที่มี HbA1c ช่วง 5.0-5.5% จะป่วยเป็นเบาหวานใน 5 ปี
- 19.8 ADA กำหนดให้ใช้ HbA1c $\geq 6.5\%$ ในการวินิจฉัยว่าเป็นเบาหวาน รวมทั้งกำหนดค่า HbA1c ระหว่าง 5.7-6.4% เป็นค่าก่อนจะเป็นเบาหวาน(pre-diabetes) ในผู้ที่มีความเสี่ยง ซึ่งหากผู้ป่วยทราบค่าว่ามี HbA1c อยู่ในช่วงดังกล่าวแล้วมีการปรับวิถีการดำเนินชีวิตใหม่ ก็สามารถกลับสู่ภาวะปกติได้
- 19.9 มีบางการศึกษาที่พบว่าการกำหนดค่า cut-off ของ HbA1c ที่ $\geq 6.5\%$ นั้น จะพบมีผู้ป่วยจำนวนไม่น้อยที่หลุดรอดจากการวินิจฉัยไปได้ ทำให้ไม่ได้รับการดูแลรักษาอย่างที่ควรจะทำ

20. แหล่งที่มาของค่าแปรปรวนที่อาจเกิดขึ้น (potential sources of variation)

20.1 น้ำยา (Reagent)

- เสื่อมสภาพจากการเก็บรักษาไม่ถูกต้องหรือหมดอายุ
- เปลี่ยน lot ใหม่, เปลี่ยน A1C-3 cassette อันใหม่
- ฟองอากาศ ปริมาตรไม่เพียงพอ
- เก็บรักษา A1C-3 cassette โดยไม่ตั้งให้ตรงอาจทำให้เกิดฟองอากาศ



แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษัตริย์สรีระรา	
วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HbA1c	
รหัสเอกสาร : WI-LAB-036	หน้า 25 จาก 26 หน้า
แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

20.2 สารสอบเทียบ (Calibrator)

- เทคนิคการละลาย เช่น ละลายผิวดัดส่วน, เทคนิคในการเตรียมผิวดัด (การไปเปตต์, ระยะเวลาในการละลายสั้นหรือยาวเกินไป ควรใช้ระยะเวลาในการละลายประมาณ 40 นาทีโดยใช้เทคนิคตามคำแนะนำของผู้ผลิต), การละลายสารสอบเทียบที่แช่แข็งให้ได้อุณหภูมิห้อง (freeze-thaw) ใช้เวลานานเกินไปหรือเร็วเกินไป, ตัวทำละลายสกปรก (ควรใช้ Purified Water Diluents หรือ reagent grade water), ความไม่เป็นเนื้อเดียวกันเนื่องจากผสมให้เข้ากันไม่ดีตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียมไปจนถึงการผสมให้เข้ากันไม่ดีก่อนการตรวจวัดค่าของ calibrator
- มีการระเหยเนื่องจากการบรรจุ calibrator ปริมาณน้อยใน sample cup ร่วมกับการตั้งทิ้งไว้นาน หรือนำ Calibrator ที่เหลือซึ่งผ่านการใช้แล้วมาใช้สอบเทียบซ้ำอีก
- เปลี่ยน lot ใหม่
- เสื่อมสภาพหรือหมดอายุ
- มีฟองอากาศ
- ใช้ Blank ไม่เหมาะสม

20.3 เครื่องมือ (Analyzer)


- แหล่งกำเนิดแสง (source lamp) เสื่อมตามอายุการใช้งาน (ควรเปลี่ยนทุกๆ 1 เดือน)
- ท่อนำส่งน้ำยาที่ต่อเชื่อมกับ reagent probe อุดตัน ตีบ ขาดความยืดหยุ่น
- Cuvette สกปรก
- probe สกปรก
- กระแสไฟฟ้าไม่คงที่
- เลยเวลา Calibration (การทำ Re-calibration ไม่ควรเกิน 90 วัน สำหรับน้ำยา A1C-3 Lot เดิม)
- Measurement syringe รั่ว/เสื่อม
- หลังการทำ preventive maintenance ครั้งใหญ่ หรือเปลี่ยนอะไหล่ใหม่ เช่น source Lamp, reagent probe, sample probe แล้วไม่ได้ calibration ใหม่
- ทำ maintenance check หรือทำ preventive maintenance เลยวงรอบหรือไม่ทำตามเงื่อนไขคำแนะนำที่ผู้ผลิตเครื่องมือกำหนด

20.4 ตัวอย่างที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ (Sample)

- ไม่ผสมตัวอย่างเลือดให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนนำเข้าเครื่อง
- ตัวอย่างเลือดมี partial clot

21. เอกสารอ้างอิง (references)

- 20.1 ใบแทรกน้ำยา Tina-quant Hemoglobin A1c Gen.3 (PI-LAB-036)
- 20.2 คู่มือปฏิบัติงานเรื่อง Operator's manual cobas 6000 analyzer series (MN-LAB-065)
- 20.3 ใบแทรกสารเทียบ Calibrator f.a.s. HbA1c (PI-LAB-115)
- 20.4 ใบแทรกสารควบคุมคุณภาพ PreciControl HbA1c norm (PI-LAB-134)
- 20.5 ใบแทรกสารควบคุมคุณภาพ PreciControl HbA1c path (PI-LAB-135)
- 20.6 ระเบียบปฏิบัติงานเรื่อง การจัดการกระบวนการทดสอบ (WP-LAB-20)

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HbA1c	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-036	หน้า 26 จาก 26 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

20.7 ระเบียบปฏิบัติงานเรื่องการสร้างความมั่นใจในคุณภาพผลการวิเคราะห์ (WP-LAB-21)

22. ภาคผนวก



ประวัติการแก้ไข/ทบทวนเอกสารคุณภาพ

ชื่อเอกสาร..... WI-LAB-036 : วิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การตรวจ HbA1c

วัน/เดือน/ ปี	ฉบับแก้ไข ครั้งที่	รายละเอียด	ลงชื่อ
11 พ.ย. 62	0	ฉบับแรก	นายสิปปนนท์ฯ
1 พ.ย. 63	1	แก้ไขทั้งฉบับ	นายสิปปนนท์ฯ
1 ก.ย. 64	1	ทบทวนแล้ว ไม่มีการแก้ไข	นายสิปปนนท์
1 ก.ย. 65	2	แก้ไขข้อ 7.4 สารวัสดุควบคุมคุณภาพ ยกเลิกหัวข้อ 7.4.1 แก้ไขข้อ 11 ขั้นตอนการควบคุมคุณภาพ ยกเลิกข้อ 11.1.2 และ 11.2.6.2	นายสิปปนนท์
1 ก.พ. 66	2	ทบทวนแล้ว ไม่มีการแก้ไข	นายสิปปนนท์



แผนกพยาธิวิทยา
โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา

วิธีปฏิบัติงาน
เรื่อง

การตรวจ HbA1c

WI-LAB-036

แก้ไขครั้งที่.....

ผู้จัดทำ

(นายสิปปนนท์ ศรีวะรัมย์)
ผู้จัดการวิชาการเคมีคลินิก
...../...../.....

ผู้ทบทวน

ร.ท.หญิง
(อรกัญญา ทรงทอง)
ผู้จัดการคุณภาพ
...../...../.....

ผู้อนุมัติ

พ.อ.
(ฉัตรมงคล คนขยัน)
หัวหน้าห้องปฏิบัติการ
...../...../.....

วันที่ประกาศใช้: