รายงานผลการวิจัย
ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

เรื่อง

การปรับปรุงวิธีตรวจภาวะพร่อง จี 6 พีดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จฬ
วพ 15
007826

โดย

รัตนา สินธุภัค
ฉวีวรรณ อิ่มพันธ์
นิกร ดุสิตสิน

พ.ศ. 2533

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การปรับปรุงวิธีตรวจภาวะพร่อง จี 6 พีดี

โดย

รัตนา สินธุภัค และคณะ

มิถุนายน 2533

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

22 S.A. 254

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการฝ่ายเวชศาสตร์ประชากร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ และ คุณปิยลัมพร พุ่มสุวรรณ ที่ช่วยให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปี 2532 ครั้งที่ 2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย การปรับปรุงวิธีตรวจภาวะพร่อง จี 6 พีดี

ชื่อผู้วิจัย รัตนา สินธุภัค , ฉวีวรรณ อิ่มพันธ์ และ นิกร ดุสิตสิน

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ มิถุนายน พ.ศ. 2533

บทคัดย่อ

วิธี fluorescent spot test ที่เสนอในรายงานนี้ เป็นวิธีที่ใช้ตรวจภาวะพร่อง จี 6 พีดี ในห้องปฏิบัติการได้ผลดี ใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐาน (quantitative method) มีความไวในการตรวจภาวะพร่อง จี 6 พีดี และภาวะ intermediate 92 และ 83 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ มีความจำเพาะ 98 เปอร์เซนต์ ข้อได้เปรียบของวิธีนี้ คือ มีความจำเพาะสูง วิธีการทดลองง่าย รวดเร็ว ราคาถูก และเชื่อถือได้ นอกจากนี้ น้ำยาที่ใช้ตรวจยังเก็บไว้ได้นาน

Project Title	Modified screening method for determination of G6PD deficiency
Name of the Investigator	Ratana Sindhuphak, Chaweewan Impand and Nikorn Dusitsin
Year	June , 1990

Abstract

The fluorescent spot test technique presented in this report is the routine screening method for determination of G6PD deficiency. This method correlates well with standard quantitative method. The clinical sensitivities for detection of G6PD deficiency and its intermediate are 92 and 83 percent, respectively, with 98 percent clinical specificity. The advantages of this method are high specificity, simple, inexpensive and reliable technique. Moreover, the reagents used in this method are quite stable.

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	1
วิธีการวิจัย	3
ผลของการวิจัย	6
การอภิปรายผล	11
ข้อสรุป	13
ข้อเสนอแนะ	13
เอกสารอ้างอิง	14

เลขหมู่ ลพ สพ 15
เลขทะเบียน 007826
วัน,เดือน,ปี 21 มิ.ย. 37

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

		หน้า
ตารางที่ 1	ผลการตรวจ จี 6 พีดี จากตัวอย่าง 205 ราย ทั้งสามวิธี	7
ตารางที่ 2	เปรียบเทียบผลของวิธี Methaemoglobin reduction test และ Quantitative test	8
ตารางที่ 3	เปรียบเทียบผลการทดลองวิธี Fluorescent spot test และ Quantitative test	8
ตารางที่ 4	เปอร์เซนต์ Reliability ของวิธี Fluorescent spot test และ Methaemoglobin reduction test	9

รายการภาพประกอบ

		หน้า
ภาพที่ 1	ปฏิกิริยาทางเคมีที่เร่งโดยเอ็นไซม์ จี 6 พีดี และปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้อง	2
ภาพที่ 2	แสดงผลของภาวะพร่อง จี 6 พีดี, intermediate และภาวะปกติภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตคลื่นยาว	10
ภาพที่ 3	แสดงผลของภาวะพร่อง จี 6 พีดี, intermediate และภาวะปกติภายใต้แสงไฟธรรมดา	10

บทนำ

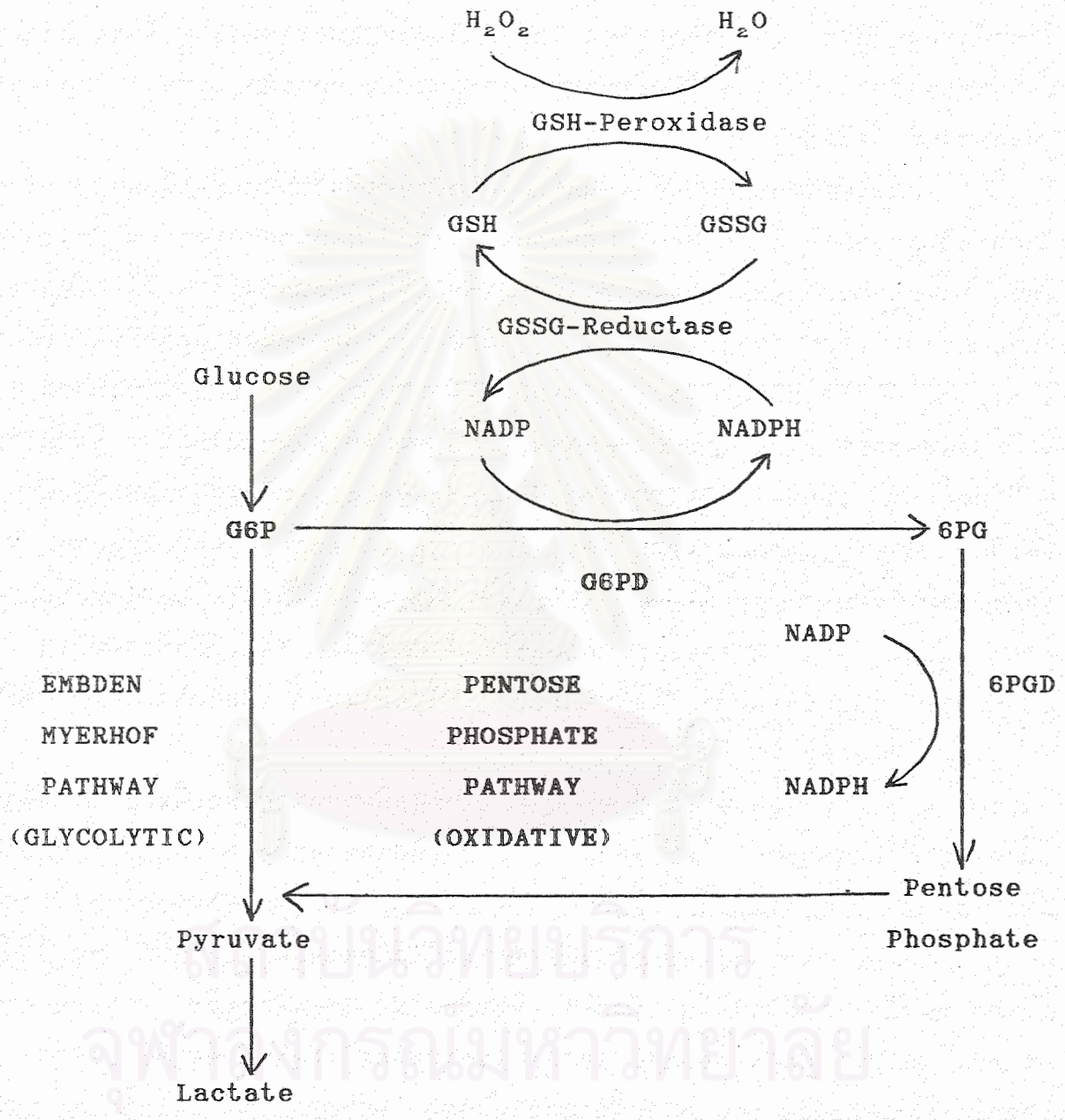
จี 6 พีดี (กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดี ฮัยโดรจีเนส) เป็นเอ็นไซม์ที่มีอยู่ในเซลล์ทั่ว ๆ ไปในสิ่งมีชีวิต เช่น ในเม็ดเลือดแดง สมอง กล้ามเนื้อ ตับ ไต ฯลฯ ทำหน้าที่เร่งส่วนหนึ่งของปฏิกิริยา เผาผลาญกลูโคส ให้เกิดพลังงาน และสารต่าง ๆ ที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิต เช่น การชีวสังเคราะห์ และการทำลายสารพิษ เช่น ไฮโดรเจน-เปอออกไซด์ ที่เกิดขึ้นในร่างกาย (ภาพที่ 1)

ภาวะพร่อง จี 6 พีดี เป็นภาวะผิดปกติของเอ็นไซม์ในเม็ดเลือดแดง ซึ่งถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ ยีน (gene) ที่ควบคุมโครงสร้างและการสังเคราะห์เอ็นไซม์ชนิดนี้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมอยู่บน เอ็กซ์-โครโมโซม ผู้ที่มีภาวะพร่อง จี 6 พีดี โดยเฉพาะในผู้ชายซึ่งมี เอ็กซ์-โครโมโซม เพียงตัวเดียว เมื่อมีความผิดปกติเกิดขึ้นจะเป็นแบบ hemizygote จึงมีการแสดงออกอย่างเต็มที่ ส่วนในผู้หญิงมี เอ็กซ์-โครโมโซม 2 ตัว จะมีการแสดงออกเป็น 2 แบบ คือ แสดงออกอย่างเต็มที่เหมือนกับในผู้ชาย ถ้ามีความผิดปกติเกิดขึ้นกับ เอ็กซ์-โครโมโซม ทั้งคู่ (homozygote) หรือแสดงออกเพียงบางส่วน เมื่อมีความผิดปกติเกิดขึ้นกับ เอ็กซ์-โครโมโซม เพียงตัวเดียว (heterozygote) ในที่นี้จะแทนกลุ่ม heterozygote ว่า intermediate และเรียกกลุ่ม hemizygote และ homozygote ว่า deficiency (ภาวะพร่อง จี 6 พี ดี) โดยเฉลี่ยร้อยละ 12 ของผู้ป่วยเพศชาย และร้อยละ 2 ของผู้ป่วยเพศหญิง ที่มาหาแพทย์ เป็นคนพร่อง จี-6-พีดี (วิจารณ์พาณิช 2524)

โรคที่พบในคนพร่อง จี 6 พีดี คือ โรคโลหิตจางจากเม็ดเลือดแดงแตกปัจจุบันเนื่องจากได้รับยาจำพวก Oxidants เช่น ยาแก้ปวดบางชนิด ยาแก้หวัด ยารักษาโรคมาลาเรีย ยาฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น (Ham *et al.* 1973, Chan *et al.* 1976, Glader 1976, Gaetani *et al.* 1976) เม็ดเลือดแดงแตกปัจจุบันนั้น นอกจากมียาเป็นสาเหตุแล้ว อาจมีปัจจัยอื่น ได้แก่ โรคติดเชื้อ เช่น โรคมาลาเรีย (Charoenlarp *et al.* 1972, Chin *et al.* 1973) โรคไทฟอยด์ (Lampe *et al.* 1975) และโรคแทรกซ้อนบางชนิด เช่น โรคความดันโลหิตสูง (Moore and Calabrese 1979) อาหารจำพวกถั่วปากอ้า (Boon 1977) ภาวะขาดน้ำ (dehydration) ความปรวนแปรในสมดุลย์กรดด่าง ความบกพร่องในการควบคุม homeostasis ของร่างกาย เช่น มีความบกพร่องในการทำงานของ ตับ และ ไต

ถึงแม้ว่า ผู้ที่อยู่ในภาวะพร่อง จี 6 พีดี จะสามารถดำรงชีวิตได้เหมือนคนปกติ ไม่ถือว่าเป็นผู้ป่วย แต่ก็อาจจะมีอันตรายเกิดขึ้นได้ ถ้าพบกับ ปัญหาดังกล่าวแล้ว ดังนั้น วิธีการตรวจภาวะพร่อง จี 6 พีดี จึงจำเป็นและควรจะเป็นวิธีง่าย ๆ ใช้เลือดตัวอย่างน้อย เช่น เลือดจากปลายนิ้ว ก็เพียงพอในการตรวจ

ภาพที่ 1 ปฏิกริยาทางเคมีที่เร่งโดย เอ็นไซม์ จี 6 พีดี และปฏิกริยาที่เกี่ยวข้อง



G6P =glucose-6-phosphate , G6PD =glucose-6-phosphate dehydrogenase

6PG =6-phosphogluconate , 6PGD =6-phosphogluconate dehydrogenase

GSSG =oxidized glutathione, GSH =reduced glutathione

NADP =nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NADPH=reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

วิธีที่ใช้ตรวจในห้องปฏิบัติการ (routine screening) ซึ่งไม่ต้องอาศัยเครื่องมือ spectrophotometer มีหลายวิธี คือ

1. Heinz body test

(Beutler E. *et al.*, 1955) ดูการเกิดของ Heinz body

2. The brilliant Cresyl blue test

(Motulsky AG. and Campbell-kraut, JM, 1960)

3. Methaemoglobin reduction test (Brewer GJ *et al.*, 1960)

4. The DCIP decolorization test (Berger L., 1961)

5. Fluorescent spot test (Beutler *et al.*, 1966)

หลักการของวิธีที่ 2-4 ดูการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้น วิธีเหล่านี้ ต้องใช้เลือดปริมาณมาก ใช้เวลานาน ความจำเพาะของวิธียังไม่สูงพอ และยังต้องยืนยันผลที่ได้ด้วยวิธีตรวจหาปริปาณ (quantitative test) อีกวิธีหนึ่งประกอบในการวินิจฉัย วิธี Fluorescent spot test ที่เสนอในรายงานนี้ โดยคณะผู้วิจัย มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบวิธีการที่ปรับปรุงใหม่ ซึ่งเหมาะสมกับศูนย์อนามัยที่ไม่มีเครื่องมือทันสมัย และเพื่อให้ได้วิธีการตรวจที่รวดเร็ว เชื่อถือได้ มีความไว และความจำเพาะสูง เปรียบได้กับเป็นวิธี semiquantitative evaluation ใช้เลือดน้อยมาก เป็นไมโครลิตร และราคาถูก

วิธีดำเนินการวิจัย

การเจาะเลือดและเก็บตัวอย่าง

เลือดได้จากภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยได้จากทารกแรกเกิดที่มีภาวะเหลืองจัด และมารดา หรือในเด็กทั้งชายและหญิงที่มารับการตรวจ ซึ่งแพทย์พบอาการที่แสดงว่าอาจเนื่องมาจากภาวะพร่อง จี 6 พีดี จำนวน 205 ราย

เจาะเลือดใส่ใน 0.75 มล. ของ acid citrate dextrose (1.32 % trisodium citrate, 0.48 % citric acid และ 1.47 % dextrose) ต่อเลือด 3.0 มล. เลือดที่ได้นี้เก็บไว้ที่ 4 °C ได้ประมาณ 1 สัปดาห์ ก่อนนำมาทดสอบด้วยวิธี fluorescent spot test (วิธีที่ได้พัฒนาโดยคณะผู้วิจัย)

การตรวจภาวะพร่อง จี 6 พีดี

คณะผู้วิจัยนำเสนอวิธี Fluorescent spot test เปรียบเทียบกับ Methaemoglobin reduction test โดยมีวิธี quantitative test เป็นวิธีมาตรฐาน

หลักการของวิธี fluorescent spot test อาศัยปฏิกิริยา hydrolysis ของ เอ็นไซม์ จี 6 พีดี (ภาพที่ 1) ผลผลิตที่สำคัญของปฏิกิริยานี้ คือ รีดิวซ์ เอ็นเอดีพี (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) ซึ่งจะเรืองแสงภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต คลื่นยาว (long wave U.V. light)

วิธี fluorescent spot test นี้ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Beutler *et al.* (1966, 1979) โดยใช้ชนิดของสารเหมือนกัน แต่ลดปริมาณของสารและเลือดตัวอย่างลงจากวิธีเดิม 5 เท่า และเลือกใช้ phosphate buffer ตามวิธีของ Beutler (1966) นอกจากนี้ยังเคลือบกระดาษกรองด้วย แอมโมเนียม ซัลเฟตที่อิ่มตัว ตามวิธีของ Solem *et al.* (1985) เพื่อให้ haemoglobin ตกตะกอนอยู่ตรงกลาง ทำให้เห็นสารเรืองแสงรอบนอกได้ชัดเจน (NADPH)

วิธีที่ดัดแปลงแล้วมีขั้นตอน ดังนี้

I. การเตรียมน้ำยา น้ำยาที่ใช้ตรวจ

A G6P (0.01 M)

B NADP (0.0075 M)

C Oxidized glutathione (0.008 M)

D Saponin (1 %)

E 0.2 M sodium phosphate buffer pH 7.4

ผสมน้ำยาด้วยอัตราส่วน A:B:C:D:E = 2:1:1:2:4 โดยปริมาตร แบ่งเก็บไว้ในหลอดเล็ก ๆ หลอดละประมาณ 0.5 ml ที่ -20 °ซ. จะเก็บได้นานประมาณ 2 ปี (Beutler, 1979)

II. การเตรียมกระดาษกรอง ใช้กระดาษ Whatman เบอร์ 1 ตัดให้มีขนาดกว้างยาวตามต้องการ แบ่งกระดาษเป็นช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 2 x 2 ซม. 1 ช่อง จะแสดงผลของ 1 ตัวอย่าง หยดแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว ลงบนกระดาษให้ทั่ว และทิ้งไว้ให้แห้ง

III. วิธีตรวจ ผสมน้ำยาตรวจ 20 ไมโครลิตร กับเลือด 2 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน อินคิวเบทที่อุณหภูมิห้องปรับอากาศ (25 °ซ.) 10 นาที นำไปหยดบนกระดาษกรองที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ประมาณ 10-15 นาที และอ่านผลโดยส่องด้วยแสงอุลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่นยาวประมาณ 340-360 นาโนมิเตอร์ ดูการเรืองแสงที่เกิดขึ้นในแต่ละตัวอย่าง

หมายเหตุ ถ้าอุณหภูมิห้องสูงกว่าห้องปรับอากาศ เวลาอินคิวเบทจะสั้นลงด้วย เหลือเพียง 5 นาที และแสงที่เรืองนั้นจะไม่คงที่อยู่นานที่อุณหภูมิห้อง แสงจะค่อย ๆ จางไปเรื่อย ๆ ถ้าปิดด้วย aluminium foil และเก็บที่ -20 °ซ. จะคงอยู่ได้นาน 1 สัปดาห์

IV. การอ่านผล

ภาวะปกติ	เรืองแสงเต็มที่
ภาวะพร่อง จี 6 พีดี	ไม่เรืองแสงหรือเรืองแสงน้อยมาก
Intermediate	เรืองแสงปานกลาง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธี Methaemoglobin reduction test (Brewer *et al.* 1960)

หลักการของวิธีนี้เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา oxidation ของ haemoglobin ไปเป็น methaemoglobin (สีน้ำตาล) โดย sodium nitrite ตามด้วยปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ซึ่งมี methylene blue อยู่ด้วย จะเปลี่ยน methaemoglobin เป็น oxyhaemoglobin อย่างเดิม (สีแดงสด) ในคนปกติเท่านั้น มีวิธีทำโดยย่อ ดังนี้

ใช้เลือด 2.0 มล. ผสมกับ 0.1 มล. สารละลาย methylene blue (0.4 mM) และ 0.1 มล. สารละลาย nitrite (0.18 M) อินคิวเบทที่ 37° ซ. เป็นเวลา 3 ชม. นำ 0.1 ml ของส่วนผสมนี้ ใส่ในหลอดแก้ว ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 10 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จึงบันทึกสีของ haemolysate

ภาวะปกติ	สีแดงสด
ภาวะพร่อง จี 6 พีดี	สีน้ำตาล หรือน้ำตาลปนเทา
Intermediate	สีน้ำตาลแดง

วิธีหาปริมาณ (quantitative test) จาก WHO techn Rep. Ser 1967, 366 ซึ่งได้มาจาก วิธีของ Zinkham WH และ Lenhard RF (1959) วิธีนี้วัดการเพิ่มขึ้นของ NADPH ที่เกิดขึ้น ตั้งแต่เวลาที่ 0 จนถึง 10 นาที โดยวัด optical density ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนมิเตอร์ มีขั้นตอนในการตรวจดังนี้

1. การเตรียมเม็ดเลือดแดง เลือด 2-3 มล. ดูดเอาส่วนน้ำเหลืองออกให้มากที่สุด ล้างให้สะอาด นำเลือดที่ล้างสะอาดแล้ว แบ่งเป็นสองส่วน ส่วนหนึ่งแบ่งตรวจ haematocrit อีกส่วนหนึ่งนำมา haemolyse โดยผสมกับน้ำในอัตราส่วนเม็ดเลือดแดงต่อน้ำ = 1 : 20 ได้ส่วนน้ำใสเรียกว่า haemolysate เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การเตรียมน้ำยา

ก. น้ำกลั่น ข. TPN (2 mM)

ค. Tris-HCl buffer pH 8.0 ง. $MgCl_2$ (0.1M)

ผสมน้ำยาทั้ง 4 ชนิด ในอัตราส่วน 5.5:1:1:1 โดยปริมาตรตามลำดับ

3. วิธีตรวจ ผสมน้ำยาตรวจ 0.85 มล. และ haemolysate 0.05 มล. ให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ใส่ glucose-6-phosphate (6 mM) 0.1 มล. อ่านค่า Optical density (OD) ที่ 340 นาโนมิเตอร์ ในเวลาที่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 นาที จากค่านี้สามารถคำนวณค่าของ จี 6 พีดี ออกมาในหน่วย IU/100 มล. Rbc.

4. การอ่านผล ผลที่ได้มีหน่วยเป็น IU/100 มล. Rbc.

ภาวะปกติ	150-350
ภาวะพร่อง จี 6 พีดี	0-80
Intermediate	90-175

วิธีนี้มี precision (intra-assay) 7.8 % (CV) ใช้ตรวจยืนยัน ผลที่ได้เมื่อวิธี screening ให้ผลไม่ชัดเจน มีประโยชน์ทำให้แพทย์สามารถนำผลที่ได้ไปประกอบการวินิจฉัยโรค

ผลของการวิจัย

ผลการตรวจเอ็นไซม์ จี 6 พีดี ด้วยวิธี Fluorescent spot test ได้ผลคือ ถ้าเอ็นไซม์อยู่ในภาวะปกติจะเรืองแสงเต็มที่ สำหรับภาวะ Intermediate นั้น เรืองแสงปานกลางส่วนภาวะพร่อง จี 6 พีดี จะไม่เรืองแสงเลยหรือเรืองแสงน้อยมาก เมื่อส่องด้วยแสงอุลตราไวโอเลตคลื่นยาว (ภาพที่ 2) ภายใต้แสงไฟธรรมดา จะไม่เห็นความแตกต่างของภาวะทั้งสามเลย (ภาพที่ 3)

การตรวจตัวอย่างรวมทั้งสิ้น 205 ราย โดยใช้วิธี screening 2 วิธีคือ Methaemoglobin reduction test และ Fluorescent spot test เปรียบเทียบกับวิธี Quantitative test แสดงไว้ในตารางที่ 1 วิธี methaemoglobin ให้ผลบวกลวง false positive ถึง 61 ราย ในขณะที่วิธี fluorescent ให้เพียง 2 รายเท่านั้น ส่วนผลอื่น ๆไม่แตกต่างกันมากนัก

ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจที่เปรียบเทียบวิธี methaemoglobin reduction test กับวิธี Quantitative test

ตารางที่ 3 แสดงผลเปรียบเทียบวิธี Flurescent spot test กับวิธี Quantitative test

นำผลการเปรียบเทียบ ในตารางที่ 2 และที่ 3 มาหา reliability ของวิธี แสดงผลไว้ในตารางที่ 4 จาก sensitivity พบว่า ความสามารถบอกได้ว่าจะตรวจพบคนที่อยู่ในภาวะพร่อง จี 6 พีดี และ intermediate ของวิธี methaemoglobin เท่ากับ 84 และ 58 % ของวิธี fluorescence มีค่า 92 และ 83 % ตามลำดับ

พิจารณา specificity พบว่า ความสามารถตรวจพบคนที่อยู่ในภาวะปกติของวิธี methaemoglobin และ fluorescence คือ 35 และ 98 % ตามลำดับ

positive และ negative predictive value ของวิธี methaemoglobin ได้ 55 และ 70 % ของวิธี fluorescence เท่ากับ 98 และ 93 %

ค่า post test likelihood if test negative ของวิธี methaemoglobin เป็น 30 % ส่วนวิธี Fluorescence เท่ากับ 7 %

มี prevalence ของภาวะพร่อง จี 6 พีดี 42 % และของ intermediate 12 %

ตารางที่ 1 ผลการตรวจ จี 6 พีดี จากตัวอย่าง 205 ราย ทั้งสามวิธี

ผลการวินิจฉัย	Quantitative test		Methaemoglobin reduction test	Fluorescent spot test
ภาวะพร่อง G6PD	87		73	80
(Deficiency, D)		I	13	4
		N	1	3
Intermediate	24		14	20
(I)		D	6	1
		N	4	3
ภาวะปกติ	94		33	92
(Normal, N)		D	28	1
		I	33	1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบผลของวิธี Methaemoglobin reduction test และ Quantitative test

		QUANTITATIVE TEST		
		DEFICIENCY	INTERMEDIATE	NORMAL
METHAEMOGLOBIN REDUCTION TEST	DEFICIENCY	73	6	28
	INTERMEDIATE	13	14	33
	NORMAL	1	4	33

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบผลการทดลองวิธี Fluorescent spot test และ Quantitative test

		QUANTITATIVE TEST		
		DEFICIENCY	TNTERMEDIATE	NORMAL
FLUORESCENT SPOT TEST	DEFICIENCY	80	1	1
	INTERMEDIATE	4	20	1
	NORMAL	3	3	92

ตารางที่ 4 เปอร์เซนต์ Reliability ของวิธี Fluorescent spot test และ Methaemoglobin reduction test

	I	II	III	IV
Sensitivity	83.9	58.3	92.0	83.3
Specificity	35.1	-	97.9	-
Prevalence	42.4	11.7	42.4	11.7
Positive Predictive value	54.5	-	97.6	-
Negative Predictive value	70.2	-	92.9	-
Post test likelihood if test negative	29.8	-	7.1	-

Methaemoglobin reduction test และ Quantitative test :

I เปรียบเทียบผลที่เป็น deficiency และ normal

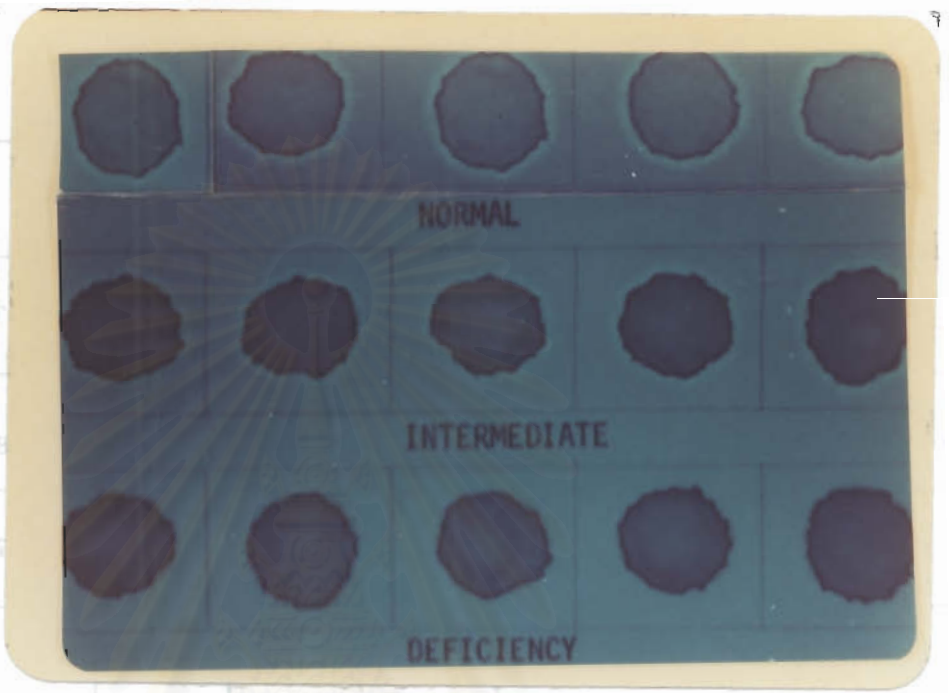
II เปรียบเทียบผลที่เป็น intermediate และ normal

Fluorescent spot test และ Quantitative test :

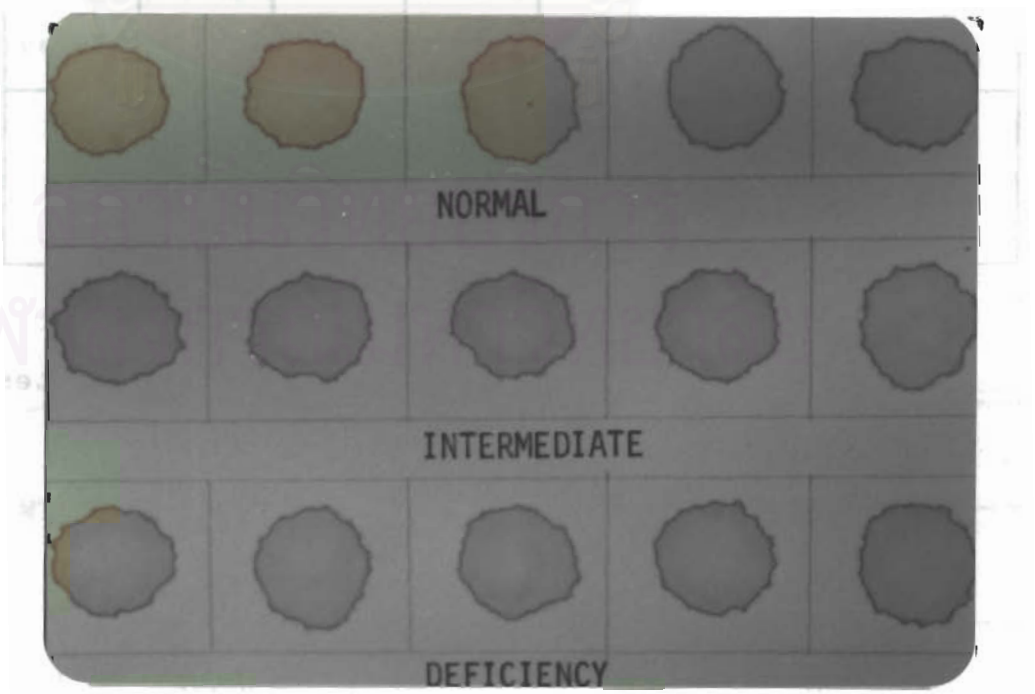
III เปรียบเทียบผลที่เป็น deficiency และ normal

IV เปรียบเทียบผลที่เป็น intermediate และ normal

ภาพที่ 2 ผลของภาวะพร่อง จี 6 พีดี intermediate และ ภาวะปกติ ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตคลื่นยาว



ภาพที่ 3 ผลของภาวะพร่อง จี 6 พีดี , intermediate และภาวะปกติภายใต้แสงไฟธรรมดา



การอภิปรายผล

วิธี Fluorescent spot test ที่เสนอในรายงานนี้ ใช้ตรวจเอ็นไซม์ จี 6 พีดี ในเม็ดเลือดแดง โดยดูการเรืองแสงของรีดิวซ์ เอ็นเอดีพี ซึ่งเกิดขึ้นในปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของ กลูโคส 6 ฟอสเฟต ในวิถี เพนโทสฟอสเฟต เม็ดเลือดแดงมีทั้งเอ็นไซม์ จี 6 พีดี และ 6 พีจีดี (6-ฟอสโฟกลูโคเนตดีฮัยโดรจีเนส) เป็นตัวทำให้เกิดการเปลี่ยนของ อ๊อกซิไดซ์ เอ็นเอดีพี ไปเป็น รีดิวซ์เอ็นเอดีพี การตรวจผู้อยู่ในภาวะปกติ และภาวะพร่อง จี 6 พีดี สามารถบอกผลได้ชัดเจน ส่วนผู้ที่อยู่ในภาวะ intermediate ค่อนข้างจะได้ผลไม่ชัดเจน อาจจะจัดกลุ่มผิดเป็นปกติ หรือกลุ่มผู้อยู่ในภาวะพร่อง จี 6 พีดีได้ การตรวจภาวะ intermediate จึงเป็นปัญหาสำคัญของวิธีตรวจเกือบทุกวิธี แต่วิธี Fluorescence นี้ สามารถลดข้อผิดพลาดของการตรวจ intermediate ด้วยการปรับปรุงและเปลี่ยนแปลงวิธีการทดลอง ดังนี้

1. ใส่ อ๊อกซิไดซ์ กลูตาไทโอน (oxidized glutathione) ลงในปฏิกิริยาตามวิธีของ Beutler *et al.* (1979) เพื่อให้ส่วนหนึ่งของ รีดิวซ์เอ็นเอดีพี ถูกนำไปใช้ในปฏิกิริยารีดักชั่นของกลูตาไทโอน เป็นการลดจำนวน รีดิวซ์เอ็นเอดีพี ผลของภาวะปกติและภาวะพร่อง จี 6 พีดี จะคงเดิม ส่วนผลของ intermediate จะชัดเจนขึ้น

2. เปลี่ยน pH ให้ต่ำกว่า optimum pH ของเอ็นไซม์

ถึงแม้ว่า optimum pH ของเอ็นไซม์ จี 6 พีดี และ 6 พีจีดี จะเท่ากัน คือ 7.8 (Horecker and Smyrniotis, 1968) แต่การทดลองนี้เลือกใช้ phosphate buffer pH 7.4 (Beutler *et al.*, 1966) ซึ่งต่ำกว่า optimum pH ของเอ็นไซม์ทั้งสอง เพื่อให้การทำงานของเอ็นไซม์ช้าลง ปริมาณ รีดิวซ์เอ็นเอดีพี จะลดลงด้วย วิธีนี้จะช่วยให้การอ่านผล intermediate ดีขึ้น

3. การเคลือบกระดาษกรองด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต ที่อิ่มตัว (Solem *et al.*, 1985) เพื่อให้โปรตีนโดยเฉพาะ haemoglobin ตกตะกอนอยู่ตรงกลาง ส่วนสารเรืองแสงจะไปรวมกันอยู่รอบนอกไม่ได้กระจายอยู่ ทำให้การแยกความแตกต่างของภาวะปกติ และ intermediate ชัดเจนขึ้น

วิธีนี้สามารถตรวจได้ผลรวดเร็ว โดยตรวจสารตัวอย่างประมาณ 30-40 ตัวอย่างในคราวเดียวกัน และได้ผลภายใน 20 นาที รีดิวซ์เอ็นเอดีพี (สารเรืองแสง) ที่เกิดในปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของกลูโคส จะเกิดขึ้นตั้งแต่นาทีแรก เริ่มคงที่ในนาทีที่ 5 และจะคงที่จนถึงนาทีที่ 20 (Solem, 1984) ดังนั้นการหยุดปฏิกิริยาจะหยุดเวลาใดก็ได้ในช่วงเวลา 5-20 นาที การทดลองนี้เลือกเวลาอินคิวเบท 10 นาที เพื่อให้พอเหมาะกับการตรวจสาร

ตัวอย่างจำนวนมากในครั้งเดียวกัน ถ้าเลือกเวลา 5 นาที จะสั้นเกินไปที่จะตรวจได้ทันเวลา และไม่มีความจำเป็นที่จะเลือกเวลาอินคิวเบทนานถึง 20 นาที

การลดปริมาตรของน้ำยาและสารตัวอย่างลง 5 เท่า จากวิธีของ Beutler *et al.* (1979) แต่ความเข้มข้นของสารในหลอดทดลองคงเดิมไป เป็นการลดค่าใช้จ่ายในการตรวจลง และได้ผลเป็นที่ยอมรับได้ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี quantitative test

วิธี Fluorescence ที่ปรับปรุงใหม่นี้ สามารถตรวจได้ทั้งผู้ชาย(hemizygote) และผู้หญิง (homozygote และ heterozygote) มีความไว (sensitivity) ในการตรวจผู้หญิงที่เป็น heterozygote (intermediate) ได้ถูกต้อง 83 % เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน มีความไวในการตรวจผู้ที่เป็น hemizygote และ homozygote (ภาวะพร่องจี 6 พีดี) ถึง 92 % ความไวในการตรวจภาวะ intermediate และภาวะพร่องจี 6 พีดี สูงกว่าวิธี Methaemoglobin ซึ่งมีความไวเพียง 58 % และ 84 % ตามลำดับ ส่วนความจำเพาะ (specificity) ของวิธี Fluorescent สูงถึง 98 % ในขณะที่วิธี Methaemoglobin มีความจำเพาะเพียง 35 % ยังไม่มีวิธี screening ใด ตรวจ heterozygote ได้ถูกต้องทั้งหมด เพราะ G6PD ของ heterozygote จะมีค่า G6PD แปรได้ตั้งแต่ค่าปกติจนถึงค่าผิดปกติ (Beutler 1962,1967 ; Desgorges 1976)

เมื่อเปรียบเทียบวิธี fluorescence ที่เสนอในรายงานนี้กับวิธี methaemoglobin ของ Brewer *et al.* (1960) Tarlov *et al.* (1962) และ Gall *et al.* (1965) พบว่าความเชื่อถือได้ของทั้งสองวิธีนี้คือ มีความไวและความจำเพาะใกล้เคียงกันมาก โดยเฉพาะ มีความไวในการตรวจพบ intermediate 75 % (วิธี fluorescence 83 %) แต่ผลที่ได้จากวิธี methaemoglobin ในรายงานนี้ไม่สอดคล้องกับวิธีเดิม สาเหตุอาจมาจากน้ำยาที่ใช้ตรวจเสื่อมสภาพ เพราะน้ำยาที่เตรียมไว้สำหรับตรวจวิธี methaemoglobin เก็บไว้ใช้ได้นานไม่เกินหนึ่งเดือน (Brewer *et al.* 1960) ดังนั้นผู้ที่ใช้วิธีนี้ควรต้องระมัดระวัง และดูแลตรวจสภาพของน้ำยาอยู่เสมอ เพราะถ้าน้ำยาเสื่อมคุณภาพ จะทำให้ผลการวินิจฉัยผิดพลาดไป ผู้ที่ใช้วิธีนี้ส่วนมากมักจะทำการทดสอบวิธี quantitative test ควบคู่ไปด้วยเสมอเพื่อยืนยันผลที่ได้

การที่วิธี Fluorescent spot test ที่ปรับปรุงใหม่นี้ตรวจสารตัวอย่างจำนวนหนึ่งได้ผลแตกต่างไปจากวิธีมาตรฐาน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาเหตุสองประการ ประการแรกเลือดตัวอย่างที่นำมาตรวจเป็นเลือดที่เก็บไว้ไม่ต่ำกว่าสองวันถึงเจ็ดวัน บางคราวอาจเก็บไว้นานถึงสองสัปดาห์ ถ้าเม็ดเลือดแดงไม่แตกจะสามารถเก็บเลือดไว้ได้ 1-2 สัปดาห์ ที่ 4°ซ หรือ 5 วัน ที่ 25°ซ (Beutler *et al.*1979)แต่เลือดที่เก็บไว้นาน ๆ จะเกิด auto-haemolysis ได้ ถ้าเม็ดเลือดแดงแตก เอ็นไซม์ต่างๆที่อยู่ใน

ผนังเม็ดเลือดแดง โดยเฉพาะ proteolytic enzyme จะทำลาย เอ็นไซม์ จี 6 พีดี เป็นสาเหตุทำให้เลือดปกติให้ผลเป็น intermediate หรือ deficiency ได้ วิธีแก้คือควรใช้เลือดตัวอย่างที่เจาะมาใหม่ ๆ ไม่ควรเก็บเลือดไว้นานประการที่สอง ถ้าเลือดตัวอย่างมีเม็ดเลือดแดงอายุน้อยอยู่มาก ซึ่งจะยังไม่แสดงความผิดปกติออกมา ดังนั้นเลือดที่พร่อง จี 6 พีดี อาจให้ผลเป็นปกติได้ (Weatherall 1983) ในกรณีเช่นนี้ควรปั่นเลือดและนำเม็ดเลือดแดงอายุมาก ซึ่งตกอยู่ก้นหลอดมาทดสอบ (วิจารณ์ พานิช, 2524)

ข้อสรุป

การตรวจภาวะพร่อง จี 6 พีดี ด้วยวิธี Fluorescent spot test ที่ปรับปรุงโดยคณะผู้วิจัย มีข้อได้เปรียบกว่าวิธี screening โดยทั่วไป คือ

1. ใช้เป็นวิธี semiquantitative evaluation ได้
2. มีความจำเพาะสูง
3. ใช้ปริมาณเลือดน้อยมาก
4. รวดเร็ว
5. ราคาถูก
6. เป็นวิธีง่าย ๆ ไม่ยุ่งยากซับซ้อน
7. น้ำยาผสมที่เตรียมไว้แล้ว สามารถเก็บไว้ได้นานถึง 2 ปี

ข้อเสนอแนะ

1. ควรใช้เลือดที่เจาะใหม่ ๆ ไม่ควรเก็บไว้นาน เพื่อป้องกันผลผิดพลาดที่เกิดจากเม็ดเลือดแดงแตก

2. ในกรณีที่ต้องการตรวจแต่เฉพาะ จี 6 พีดี จากชนกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง ไม่จำเป็นต้องเจาะเลือดจากเส้นเลือด เจาะเพียงปลายนิ้ว และเก็บเลือดใน capillary tube ขนาด 5-10 µl

3. เลือดที่นำมาตรวจด้วยวิธีนี้จะเก็บไว้ได้นาน เมื่อเลือดแห้งอยู่บนกระดาษกรอง แต่ความไวในการตรวจภาวะ intermediate (heterozygote) อาจไม่ดีเท่าที่ควร

4. วิธี methaemoglobin reduction test เป็นวิธี screening ที่นำมาใช้ก่อน และได้รับความนิยมสูง ใช้กันแพร่หลาย มีความเชื่อถือได้ใกล้เคียงกับวิธี fluorescence ข้อควรระวังของวิธีนี้ อยู่ที่น้ำยาที่เตรียมไว้ไม่สามารถเก็บได้นาน จึงต้องควรตรวจสภาพของน้ำยาอยู่เสมอ ซึ่งบางครั้งต้องทำวิธี quantitative test ควบคู่ไปด้วยเพื่อป้องกันการวินิจฉัยที่ผิดพลาด

เอกสารอ้างอิง

วิจารณ์ พาณิช 2524 ภาวะพร่อง จี-6-พีดี ในเวชปฏิบัติ แพทยสภาสาร 10 (8) : 211-219.

Berger L. 1961. The semi-quantitative determination of the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in red cells. Tentative Tech. Bull. No. 400, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.

Beutler E, Dern RJ and alving AS. 1955. The hemolytic effect of primaquine. VI An in vitro test for sensitivity of erythrocytes to primaquine. J. Lab. and Clin Med 45 : 40.

Beutler E, Yeh M and Fairbanks VE. 1962. The normal human female as a mosaic of X-chromosome activity : Studies using the gene for G6PD deficiency as a marker. Proc Nat Acad Sci 48: 9-16.

Beutler E. 1966. A series of new screening procedures for pyruvate kinase deficiency, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, and glutathione reductase deficiency. Blood. 28 : 553-562.

Beutler E. 1967 Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Am J Clin Pathol 47: 303-311.

Beutler E, Blume KG, Daplan JC, Lohr GW, Ramot B and Valentine WN. 1979. International committee for standardization in haematology : Recommended screening test for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. British J of Haematology. 43 : 465-467.

Boon WH. 1977. Acute haemolysis in Southeast Asia. Medical Progress. March : 12-14.

Brew GJ, Tarlov AR and Alving AS. 1960. Methaemoglobin reduction test. A new, simple in vitro test for identifying primaquine-sensitivity. Bull Wld Hlth Org. 22 : 633-640.

Chan TK, Todd D, Tso DC. 1976. Drug-induced haemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Brit Med J 2 : 1227-1229.

Charoenlarp P, Areekul S, Harinasuta T, Sirivorasan P. 1972. The haemolytic effect of a single dose of 45 mg. of primaquine in G6PD deficient Thais. J Med Ass Thailand 55 : 631-638.

Chin W, Bear DM, Colwell EJ, Kosakal S. 1973. A comparative evaluation of sulfalene-trimethoprim and sulphormethoxine-pyrimethamine against falciparum malaria in Thailand Amer J Trop Med Hyg 22 : 308-311.

Desforges JF. 1976. Current concept in genetics. Genetic implications of G6PD deficiency. New Eng Med 294: 1438-1439.

Gaetani GD, Mareni C, Ravazzolo R, Salvidlo E. 1976. Haemolytic effects of two sulphonamides evaluated by a new method. Brit J Haematol 32 : 183-191.

Gall JC, Brewer GJ and Dern RJ. 1965. Studies of G6PD activity of individual erythrocytes: The methemoglobin elution test for identification of females heterozygous for G6PD deficiency. Am J Hum Genet 17:359-368.

Glader BE. 1976. Evaluation of the hemolytic role of aspirin in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. J Pediatr 89 : 1027-1028.

Ham TH, Grauel JA, Dunn RF, Murphy JR, White J G, Kellermeyer RW. 1973. Physical properties of red cells as related to effects in vivo. VI. Oxidant drugs producing abnormal intracellular concentration of hemoglobin with a rigid-red-cell hemolytic syndrome. J Lab Clin Med 82 : 898-910.

Horecker BL and Smyrniotis PZ 1968. Methods in Enzymology. Vol 1 : 323-334.

Chulalinet
3 0021 00194763 9

Lampe R M, Kirdpon S, Mansuwan P, and Benenson M W. 1975. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Thai Children with typhoid fever. J. of Pediatrics. 4:576-578.

Lahr GW, Waller HD. 1974. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In : Bergmeyer HU, ed. Methods of enzymatic analysis. New York : Academic Press : 636.

Moore GS, Calabrese EJ. 1979. The possible role of hypertension in aggravating hemolytic episodes in G6PD deficient persons. Med Hypotheses 5 : 453-462.

Motulsky AG and Campbell-Kraut JM 1960. Population genetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency of the red cell. Proc Conf on Genetic Polymorph and Geograph. Variations in Diseases, Feb. 23-25.

Solem E 1984. Glucose-6 phosphate dehydrogenase deficiency : an easy and sensitive quantitative assay for the detection of female heterozygotes in red blood cells. Clinica Chimica Acta 142 : 153-160.

Solem E, Pirzer C, Siege M, Kollmann F, Romero-Saravia O, Bartsch-Trefs and Kornhuber B. 1985. Mass screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency : Improved fluorescent spot test. Clinica Chimica Acta 152 : 135-142.

Tarlov AR, Brewer GT, Carson PE and Alving AS. 1962. Primaquine sensitivity. Arch Int Med. 109: 209-234.

Weatherall DJ. 1983. Haemolytic anemia. Oxford Textbook of Medicine. Edited by Weatherall DJ, Ledingham JGG and Warrel DA : 19.54- 19.66.

Zinkham WH and Lenhard RE. 1959. Metabolic abnormalities of erythrocytes from patients with congenital nonspherocytic hemolytic anemia. J Pediat 55 : 319.