วารสาร
เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด
JOURNAL OF MEDICAL TECHNOLOGY AND PHYSICAL THERAPY

นิพนธ์ต้นฉบับ
ORIGINAL ARTICLE

การตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีในทารกแรกเกิดด้วยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอต และการตรวจวัดจี-6-พีดีแอคทิวิตีเปรียบเทียบกับการตรวจหาการกลายพันธุ์ยีนจี-6-พีดี

สัมฤทธิ์ แดงวิบูลย์ [1,2] นพมาศ เข็มทองหลาง[3] และสุทธิพรรณ กิจเจริญ[3*]

Received : *November 19, 2017*
Revised: *March 10, 2018*
Accepted: *March 14, 2018*

บทคัดย่อ

ภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (จี-6-พีดี) เป็นภาวะพร่องเอนไซม์ที่พบมากที่สุดในประชากรทั่วโลก เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดีที่อยู่บนโครโมโซมเอ็กซ์ การวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีที่ใช้กันอยู่ทั่วไป คือ การตรวจด้วยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอตและการตรวจวัดจี-6-พีดีแอคทิวิตี การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีด้วยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอตและการตรวจวัดจี-6-พีดีแอคทิวิตีเปรียบเทียบการตรวจดีเอ็นเอ เพื่อหาการกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดี โดยได้ทำการศึกษาในตัวอย่างเลือดของทารกแรกเกิดที่ได้รับการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีด้วยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอต จากห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาล 3 แห่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยจำนวน 270 ราย เป็นเพศชาย 130 ราย และเพศหญิง 140 ราย ผลการศึกษาในเพศชายพบว่าการตรวจด้วยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอตมีความไวร้อยละ 98.1 และความจำเพาะร้อยละ 94.8 ส่วนการตรวจวัดจี-6-พีดีแอคทิวิตีมีความไวร้อยละ 100 และความจำเพาะร้อยละ 90.9 ผลการศึกษาในเพศหญิงพบว่าวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอตมีความไวร้อยละ 42.9 และความจำเพาะร้อยละ 100 และการตรวจวัดจี-6-พีดีแอคทิวิตีมีความไวร้อยละ 42.9 และความจำเพาะร้อยละ 96.2 การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีด้วยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอตมีความไวและความจำเพาะเทียบเท่าการตรวจวัดจี-6-พีดีแอคทิวิตีในเพศชายและหญิง แต่ทั้งวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอตและการตรวจวัดจี-6-พีดีแอคทิวิตียังมีความไวต่ำในการวินิจฉัยเพศหญิงที่มีการกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดี จึงจำเป็นต้องใช้การตรวจดีเอ็นเอเพื่อหาการกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดี เพื่อการวินิจฉัยที่ถูกต้อง ข้อมูลนี้เป็นประโยชน์สำหรับโรงพยาบาลต่างๆ ในการเลือกการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ งบประมาณ และจำนวนตัวอย่าง

คำสำคัญ: กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส, การตรวจคัดกรองจี-6-พีดี, ยีนจี-6-พีดี

---

[1]นักศึกษาบัณฑิตศึกษาสาขาพยาธิวิทยาคลินิกและการจัดการ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
[2]โรงพยาบาลขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น
[3]กลุ่มวิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
[*]ผู้รับผิดชอบบทความ: (e-mail: sutpra@kku.ac.th)

วารสาร
เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด
JOURNAL OF MEDICAL TECHNOLOGY AND PHYSICAL THERAPY

นิพนธ์ต้นฉบับ
ORIGINAL ARTICLE

Comparison of fluorescent spot test and G-6-PD activity assay versus G-6-PD mutation analysis for detection of G-6-PD deficiency in newborns

Samrit Dangwibul[1, 2], Noppmats Khemtonglang[3] and Suttiphan Kitcharoen[3*]

Abstract

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency, due to mutations in the X-linked G-6-PD gene, is the most common enzyme defect in the world. Fluorescent spot test (FST) and G-6-PD activity assay are widely used for diagnosis of G-6-PD deficiency. The aim of this study was to compare the effectiveness of FST and G-6-PD activity assay for detection of G-6-PD deficiency with G-6-PD mutation analysis. EDTA-blood samples of 270 neonates (130 males and 140 females) were recruited from three hospital laboratories in northeast Thailand after performing the FST. All samples were further investigated for G-6-PD activity and G-6-PD mutation. In male neonates, FST showed 98.1% sensitivity and 94.8% specificity, and G-6-PD activity assay had 100% sensitivity and 90.9% specificity). Among females, both FST and G-6-PD activity assay showed low sensitivity as 42.9% and retained high specificity of 100% and 96.2%, respectively. This study demonstrated a comparable effectiveness of FST and G-6-PD activity assay for diagnosis of G-6-PD deficiency. However, these 2 methods exhibited low sensitivity to identify females who carry G-6-PD gene mutation. The definitive diagnosis of these females requires molecular detection of G-6-PD mutation.This data is useful for each hospital to select a G-6-PD test which is fit for the propose of investigation, budget and number of samples.

Keyword: Glucose-6-phosphate dehydrogenase, G-6-PD screening, G-6-PD gene

[1] Postgraduate student in Clinical Pathology and Management, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University
[2] Khon Kaen Hospital, Khon Kaen
[3] Department of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University
*Corresponding author: (e-mail:sutpra@kku.ac.th)

บทนำ

ภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (จี-6-พีดี) ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดีที่อยู่บนเอ็กซ์โครโมโซม (X-chromosome) [1] เป็นภาวะพร่องเอนไซม์ที่พบมากที่สุดในประชากรทั่วโลกคือประมาณ 330 ล้านคน หรือร้อยละ 4.9[2] ภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของภาวะตัวเหลืองในทารกแรกเกิด ที่อาจรุนแรงจนเป็นสาเหตุการตายหรือสมองพิการอย่างถาวรได้ [3] ดังนั้นการวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีในทารกแรกเกิดได้อย่างถูกต้องโดยเร็ว จะช่วยป้องกันไม่ให้เกิดภาวะแทรกซ้อน ที่ร้ายแรงดังกล่าวได้

ในประเทศไทยมีรายงานความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีในทารกแรกเกิดที่มีภาวะตัวเหลืองสูงถึงร้อยละ 22.1%ในทารกเพศชาย และร้อยละ 10.1%ในทารกเพศหญิง [4] การวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีที่นิยมใช้กันอยู่ตามโรงพยาบาลทั่วไป คือการตรวจเชิงคุณภาพโดยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอต (fluorescent spot test; FST) ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบที่ง่ายทำได้รวดเร็วไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพง ส่วนการตรวจเชิงปริมาณโดยการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์จี-6-พีดีนั้น เป็นวิธีที่ใช้ในโรงพยาบาลขนาดใหญ่หรืองานวิจัย วิธีนี้ได้มีการนำมาประยุกต์ใช้กับเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ทำให้ตรวจวัดได้ครั้งละหลายรายสะดวก และรวดเร็วยิ่งขึ้น ในต่างประเทศมีรายงานว่าวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอตมีข้อจำกัดในการวินิจฉัยเพศหญิงที่เป็น heterozygote เนื่องจากมีระดับเอนไซม์ที่หลากหลายตั้งแต่ต่ำกว่าปกติจนถึงปกติ [5] อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยเพศหญิงที่เป็น heterozygote ได้อย่างถูกต้องตั้งแต่แรกๆ นั้นมีความสำคัญอย่างยิ่ง เพราะต้องให้การดูแลรักษาเหมือนกับเพศชายที่พร่องเอนไซม์จี-6-พีดี (hemizygote) หรือเพศหญิงที่พร่องเอนไซม์จี-6-พีดี (homozygote) [6] การตรวจดีเอ็นเอเพื่อหาการกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดี จึงเป็นวิธีที่สามารถวินิจฉัย heterozygote ได้อย่างถูกต้อง การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีในทารกแรกเกิด ด้วยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอต และการตรวจวัดจี-6-พีดีแอคทิวิตี เปรียบเทียบการตรวจกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดี ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์แก่โรงพยาบาลแต่ละแห่ง ในการพิจารณาเลือกการทดสอบที่เหมาะสมสำหรับการวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีในทารก แรกเกิด

วัสดุและวิธีการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา เป็นตัวอย่างเลือดของทารกแรกเกิดที่เหลือจากการตรวจกรองภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีในงานประจำของโรงพยาบาล 3 แห่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ซึ่งใช้วิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอตทั้งที่ให้ผลตรวจเป็นปกติ (normal) พร่องเอนไซม์บางส่วน (partial deficiency) และพร่องเอนไซม์สมบูรณ์ (complete deficiency) ในการเก็บตัวอย่างผู้ทำวิจัยจะทำการคัดเลือกตัวอย่างด้วยตนเองโดยคัดเลือกเฉพาะตัวอย่างเลือดที่เก็บไว้ไม่เกิน 7 วันที่อุณหภูมิ 2-8°C และนำมาที่สถานที่ทำวิจัย คือคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยบรรจุตัวอย่างเลือดในภาชนะควบคุมอุณหภูมิที่ 2-8°C ตลอดเวลา เก็บตัวอย่างเลือดทั้งหมด 270 รายเป็นเพศชาย 130 ราย และเพศหญิง 140 รายตัวอย่างเลือดทุกรายจะได้รับการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีด้วยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอตซ้ำอีกครั้ง และตรวจวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์จี-6-พีดี ภายในวันนั้นจากนั้นจะเตรียมดีเอ็นไว้เพื่อหาการกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดีทั้งนี้การศึกษาครั้งนี้ได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (HE571504)

การตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีด้วยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอต

การตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีด้วยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอต [7] มีหลักการคือเอนไซม์จี-6-พีดีในตัวอย่างเลือดรวม(whole blood) จะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของกลูโคส-6-ฟอสเฟต (glucose-6-phosphate; G-6-P) เป็น 6-ฟอสโฟกลูโคเนต (6-phosphogloconate; 6-PG) พร้อมกับรีดิวซ์NADP ให้เป็น NADPH ซึ่งจะเรืองแสงฟลูออเรสเซ้นต์ที่ความยาวคลื่น 365 nm ในการทดสอบจะใช้เลือดรวมปริมาตร 5 µL เติมลงใน microtiter U plate ที่ใส่น้ำยาสำหรับตรวจ (reaction mixture)

ไว้100 µL ผสมเลือดกับน้ำยาให้ผสมกันดี โดยการใช้ autopipette ดูดขึ้นลง และจับเวลาทันที หยดส่วนผสมของเลือดและน้ำยา 10 µL ลงบนกระดาษกรอง Whatman No.1 เมื่อครบเวลา 5 และ 15 นาที รอให้แห้งสนิทแล้วนำไปส่องดูการเรืองแสงฟลูออเรสเซ้นต์ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) ความยาวคลื่น 350 nm โดยอ่านผลเทียบกับหลอดควบคุม (control) ซึ่งมีส่วนผสมของเลือดรวมกับน้ำยาที่ไม่มี NADP จึงไม่มีการเรืองแสง ตัวอย่างเลือดรายที่ปกติ จะมีการเรืองแสงทั้งที่เวลา 5 นาที และ 15 นาทีรายที่เป็น partial deficiency จะมีการเรืองแสงเฉพาะที่เวลา 15 นาทีและรายที่เป็น completedeficiency จะไม่มีการเรืองแสงหรือเรืองแสงน้อยมากทั้งที่เวลา 5 และ 15 นาที ในการศึกษาครั้งนี้ deficiency นับรวมทั้ง partial deficiency และ complete deficiency ผู้ทำวิจัยได้สำรวจข้อมูลพื้นฐานในการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีด้วยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอตของโรงพยาบาลทั้ง 3 แห่ง พบว่า ทั้งหมดได้ทำตามขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ตามเอกสารประกอบน้ำยา ไม่มีการดัดแปลงวิธีตรวจ มีการควบคุมคุณภาพภายในก่อนรายงานผลการตรวจและเจ้าหน้าที่ผู้ทำการตรวจวิเคราะห์ได้ผ่านการฝึกอบรมทั้งหมด โดยผู้ทำวิจัยได้นำตัวอย่างเลือดทุกรายมาตรวจซ้ำ และได้ผลถูกต้องตรงกัน

การตรวจวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์จี-6-พีดี

การตรวจวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์จี-6-พีดีในตัวอย่างเลือดรวม ใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Beckman Synchron CX-4 และใช้น้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท Trinity Biotech (Trinity Biotech Plc, Co Wicklow, Ireland) ซึ่งมีหลักการเช่นเดียวกับวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอตโดยวัดการทำงานของเอนไซม์จี-6-พีดีจากค่าการดูดกลืนแสงของ NADPH ที่ความยาวคลื่น 340 nm ซึ่งจะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับแอคทิวิตีของเอนไซม์จี-6-พีดีในการทดสอบจะใช้เลือดรวม 10 µL เติมลงในน้ำยาที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (lysing reagent) 90 µLนำไปเขย่าด้วย Vortex mixer ให้เม็ดเลือดแดงแตกอย่างสมบูรณ์ แล้วนำ hemolysate ที่เตรียมได้ไปวัดด้วยเครื่อง Beckman Synchron CX-4 (Beckman Coulter Inc., CA, USA) ที่ได้ตั้งค่าพารามิเตอร์ของการทดสอบไว้แล้วตามเอกสารกำกับน้ำยาค่า cut-off ของภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดี (deficiency) ในการศึกษาครั้งนี้ คือแอคทิวิตีของเอนไซม์จี-6-พีดี≤ 8.2 U/gHb[8]

การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดี

ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดีได้สะกัดดีเอ็นเอ (DNA) จากเม็ดเลือดขาวของตัวอย่างเลือดทุกราย โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป DNAzol (Invitrogen Corp., CA, USA และทำการตรวจหาการกลายพันธุ์ยีนจี-6-พีดีที่พบบ่อยในคนไทยที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ G-6-PD Viangchan (871 G > A), G-6-PD Canton (1376 C > T), G-6-PD Union (1360 C > T), G-6-PD Kaiping (1388 G > A) และ G-6-PD Mahidol (487 G > A)[9] ด้วยเทคนิค allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR) เมื่อตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีนจี-6 พีดีในตัวอย่างที่เป็นเพศหญิง จะนำไปตรวจด้วยเทคนิค polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) เพื่อแยกว่าเป็น homozygote หรือ heterozygote ต่อไป [9] ทั้งนี้กำหนดให้การตรวจการกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดีเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ในการเปรียบเทียบความถูกต้องของผลการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดี โดยถือว่ามีภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดี เมื่อตรวจพบการกลายพันธุ์ชนิดใดชนิดชนิดหนึ่งใน 5 ชนิด ไม่ว่าจะเป็น hemizygote, homozygote หรือ heterozygote

ผลการศึกษา

การตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีในตัวอย่างเลือดของทารกแรกเกิดทั้งหมด 270 ราย เป็นตัวอย่างเลือดจากทารกเพศชาย130 ราย และเพศหญิง 140 ราย จะเห็นว่าการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดี พบความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีมากที่สุด คือ ร้อยละ 32.6 ส่วนการตรวจวัดเอนไซม์แอคทิวิตีและการตรวจด้วยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอตพบความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีน้อยลงตามลำดับคือ ร้อยละ 29.2 และ26.3 โดยการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดีทำให้พบ

ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีในทารกเพศหญิงมากถึงร้อยละ 25.0 เพิ่มขึ้นจากการตรวจวัดเอนไซม์แอคทิวิตีและการตรวจด้วยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอต ซึ่งพบเพียงร้อยละ 13.6 และ 10.1 ตามลำดับ สำหรับทารกเพศชายพบภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีมากกว่าทารกเพศหญิง ซึ่งการตรวจวัดเอนไซม์แอคทิวิตีพบความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีมากที่สุด คือ ร้อยละ 46.2 การตรวจด้วยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอตพบความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีร้อยละ 43.1 และการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดีพบความชุกน้อยที่สุดคือร้อยละ 35.6 ข้อมูลทั้งหมดดังแสดงใน**ตารางที่ 1**

ตัวอย่างที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดีมีจำนวน 88 รายนั้น พบว่า การกลายพันธุ์ที่พบมากที่สุดคือ Viangchan พบร้อยละ 73.9 รองลงมาเป็น Canton, Mahidol, Kaiping และ Union โดยพบร้อยละ 15.9, 4.5, 3.4 และ 2.3 ตามลำดับ (ไม่ได้แสดงข้อมูลในรูปตาราง)

เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีด้วยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอตกับการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดี พบว่าวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอตให้ผลการตรวจเป็นผลบวก (deficiency) ตรงกันจำนวน 67 ราย และมีผลลบ (normal) ตรงกันจำนวน 178 ราย โดยให้ผลบวกปลอม (false positive) จำนวน 4 ราย และผลลบปลอม (false negative) จำนวน 21 ราย

ส่วนการเปรียบเทียบผลการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีด้วยการตรวจวัดเอนไซม์แอคทิวิตี พบว่าให้ผลบวกตรงกันจำนวน 68 ราย และมีผลลบตรงกันจำนวน 171 ราย โดยให้ผลบวกปลอมมากกว่าวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอต คือ 11ราย และผลลบปลอมจำนวน 20 ราย ดังแสดงใน**ตารางที่ 2**

ตารางที่ 1 ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีที่ได้จากการตรวจด้วยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอต (FST) การตรวจวัดจี-6-พีดีแอคทิวิตี (G-6-PD activity) และการตรวจหาการกลายพันธุ์ (G-6-PD mutation)

Method	G-6-PD deficiency					
	Male (N = 130)		Female (N = 140)		All (N = 270)	
	n	%	n	%	n	%
FST	56	43.1	15	10.1	71	26.3
G-6-PD activity[1]	60	46.2	19	13.6	79	29.2
G-6-PD mutation	53	35.6	35	25.0	88	32.6

1cut-off value for G-6 PD deficiency ≤ 8.2 U/gHb [8]

การประเมินประสิทธิภาพของการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีด้วยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอตและการตรวจวัดเอนไซม์แอคทิวิตี โดยใช้การตรวจการกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดีเป็นวิธีมาตรฐานในการเปรียบเทียบ เมื่อคำนวณค่าความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ค่าการทำนายผลบวก (positive predictive value) และค่าการทำนายผลลบ (negative predictive value) พบว่า ทั้ง 2 วิธี มีค่าความไวใกล้เคียงกัน คือ ร้อยละ 76.1 และ 77.3 ตามลำดับ โดยมีค่าความไวในเพศชายสูงถึงร้อยละ 98.1 และ 100 ตามลำดับ และความไวในเพศหญิงต่ำเพียงร้อยละ 42.9 เท่ากัน สำหรับความจำเพาะมีค่าสูงใกล้เคียงกัน คือ ร้อยละ 97.8 และ 94.0 ตามลำดับ โดยค่าความจำเพาะทั้งในเพศชายและเพศหญิงมีค่าสูงกว่าร้อยละ 90 ทั้งหมด ข้อมูลทั้งหมดดังแสดงใน**ตารางที่ 3**

ตารางที่ 2 ผลการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดี ด้วยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอต (FST) และวิธีตรวจจี-6-พีดี แอคทิวิตี (G-6-PD activity) เปรียบเทียบกับการตรวจหาการกลายพันธุ์ (G-6-PD mutation)

Test	Result	G-6-PD mutation					
		Male (N = 130)		Female (N = 140)		All (N = 270)	
		Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
FST	Deficiency	52	4	15	0	67	4
	Normal	1	73	20	105	21	178
G-6-PD activity	Deficiency	53	7	15	4	68	11
	Normal	0	70	20	101	20	171

ตารางที่ 3ประสิทธิภาพของการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีด้วยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอต (FST) และวิธีตรวจจี-6-พีดีแอคทิวิตี (G-6-PD activity)

Parameter	FST			G-6-PD activity		
	Male	Female	All	Male	Female	All
Sensitivity (%)	98.1	42.9	76.1	100	42.9	77.3
Specificity (%)	94.8	100	97.8	90.9	96.2	94.0
Positive predictive value (%)	92.9	100	94.4	88.3	78.9	86.1
Negative predictive value (%)	98.6	84	89.4	100	83.5	89.5

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

การตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีด้วยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอตและการตรวจวัดเอนไซม์แอคทิวิตีเป็นวิธีที่นิยมใช้กันทั่วโลก [2] สำหรับประเทศในภูมิภาคอาเซียนรวมทั้งประเทศไทยนิยมทดสอบด้วยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอตเช่นกันวิธีนี้เป็นวิธีที่ได้รับการรับรองจาก International Council for Standardization in Haematology [7] สำหรับใช้ในการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีเนื่องจากวิธีการตรวจง่าย ใช้เวลาไม่นาน และราคาไม่แพง ในการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการประเมินประสิทธิภาพของการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีด้วยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอตและการตรวจวัดเอนไซม์แอคทิวิตี เปรียบเทียบกับการตรวจดีเอ็นเอเพื่อหาการกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดี ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นข้อมูลสำคัญประกอบการตัดสินใจเลือกใช้วิธีการทดสอบให้เหมาะกับแต่ละโรงพยาบาล

ในการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดี พบความชุกของการกลายพันธุ์ชนิดต่างๆ เรียงลำดับมากที่สุดไปหาน้อยที่สุด คือ Viangchan (ร้อยละ 73.9) Canton (ร้อยละ 15.9) Mahidol (ร้อยละ 4.5) Kaiping (ร้อยละ 3.4) และ Union (ร้อยละ 2.3) ใกล้เคียงกับรายงานของ Kitcharoen และคณะก่อนหน้านี้ [9] การกลายพันธุ์ชนิด Viangchan ที่พบมากในชาวไทยนี้ พบมากในชาวกัมพูชาและลาวเช่นกัน [10-12] ซึ่งทั้ง 3 ประเทศมีอาณาเขตติดต่อกัน ข้อมูลนี้เป็นอีกข้อมูลหนึ่งที่สนับสนุนว่าชาวไทยกัมพูชา และลาว น่าจะมีบรรพบุรุษร่วมกันและตั้งถิ่นฐานอยู่ในบริเวณนี้มาก่อน จากนั้นจึงมีชาวจีนและชาวพม่าย้ายถิ่นเข้ามาในพื้นที่นี้ จึงทำให้ตรวจพบการกลายพันธุ์ที่พบในชาวจีน ได้แก่ Canton, Kaiping และ Union [13-14] และการกลายพันธุ์ที่พบในชาวพม่า คือ Mahidol [15-16] ในจำนวนน้อยๆ นอกจากนี้ข้อมูลที่พบการกลายพันธุ์ชนิด Viangchan และ Canton รวมกันมากถึงประมาณร้อยละ 90 ยังมีประโยชน์สำหรับห้องปฏิบัติการในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ต้องการจัดตั้งการตรวจดีเอ็นเอเพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดี โดยควรตรวจหาการกลายพันธุ์ชนิด Viangchan และ Canton ก่อน

ผลจากการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีด้วยการตรวจดีเอ็นเอเพื่อหาการกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดีทำให้พบความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีสูงถึงร้อยละ 32.6 ทั้งนี้เนื่องจากสามารถตรวจพบภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีในเพศหญิงได้เพิ่มขึ้น **(ตารางที่ 1 และ 2)** แสดงให้เห็นว่าการวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีในเพศหญิงให้ถูกต้องนั้น จำเป็นต้องใช้การตรวจระดับดีเอ็นเอเพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดี นอกจากนี้ยังพบว่าความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีในเพศชายสูงกว่าที่เคยรายงานในประเทศไทยที่พบประมาณร้อยละ 21 [17-18] ส่วนหนึ่งอาจเป็นเพราะความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ศึกษา ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ตัวอย่างส่วนใหญ่เป็นทารกแรกเกิดที่ส่งตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีเพื่อหาสาเหตุของภาวะตัวเหลือง มิใช่ทารกแรกเกิดทั่วไป จึงมีโอกาสพบภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีได้สูงกว่า เนื่องจากภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีเป็นสาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งของภาวะตัวเหลืองในทารกแรกเกิด [1, 19] ในกรณีการตรวจวัดจี-6-พีดีแอคทิวิตีเพื่อการวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีนั้นอาจเป็นผลเนื่องมาจากการใช้ค่า cut-off ที่แตกต่างกัน สำหรับการศึกษาครั้งนี้ใช้ค่า cut-off ≤ 8.2 U/gHb ซึ่งเป็นค่า cut-off ที่คณะผู้วิจัยได้จากการการศึกษาโดยใช้ตัวอย่างที่เป็นประชากรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และตรวจวัดโดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Beckman Synchron CX-4 [8] ส่วนการศึกษาของ Louicharoen และคณะ [17] ใช้ค่า cut-off < 1.5 U/gHb และ Prachakthum และคณะ[18] ใช้ค่า cut-off ≤ 4.59 U/gHb ซึ่งเป็นค่า cut-off ที่ค่อนข้างต่ำ จึงทำให้โอกาสที่จะพบภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีมีน้อยกว่า

การประเมินประสิทธิภาพการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีด้วยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอตและการตรวจวัดจี-6-พีดีแอคทิวิตีเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน คือ การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดีผลการศึกษาในตัวอย่างทั้งหมดพบว่า มีค่าความไวร้อยละ 76.1 และ 77.3 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาแยกตามเพศ พบว่าในเพศชายมีค่าความไวสูงถึงร้อยละ 98.1 และ 100 ตามลำดับ โดยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอตไม่สามารถวินิจฉัยเพศชายที่มีการกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดีจำนวน 1 ราย

(**ตารางที่ 2**) ซึ่งรายนี้พบว่ามีเอนไซม์แอคทิวิตีเท่ากับ 4.6 U/gHb (ข้อมูลที่ไม่ได้แสดง) จึงทำให้การอ่านผลด้วยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอตคลาดเคลื่อนได้ เนื่องจากเป็นการดูการเรืองแสงฟลูออเรสเซ้นต์ด้วยตาเปล่า ในขณะที่ทั้ง 2 วิธีมีความไวต่ำในการวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีในเพศหญิง โดยมีค่าความไวเท่ากัน คือ ร้อยละ 42.9 ซึ่งพบว่าทั้ง 2 วิธีไม่สามารถวินิจฉัยเพศหญิงที่มีการกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดีจำนวน 20 ราย (**ตารางที่ 2**) ผลการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดีในเพศหญิงทั้ง 20 รายนี้ พบว่าเป็น heterozygote ทุกราย และมีเอนไซม์แอคทิวิตีอยู่ในช่วงระหว่าง 8.28 – 17.7 U/gHb (ข้อมูลที่ไม่ได้แสดง) ซึ่งสูงกว่าค่า cut-off ≤ 8.2 U/gHb ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

จึงอ่านผลได้เป็นปกติทั้ง 2 วิธี ส่วนความจำเพาะมีค่าสูงทั้ง 2 วิธี คือ ร้อยละ 97.8 และ 94.0 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม พบว่า วิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอตมีตัวอย่างเพศชายจำนวน 4 รายที่ให้ผลบวกปลอม และการตรวจวัดจี-6-พีดีแอคทิวิตีมีตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอมจำนวน 11 ราย เป็นเพศหญิง 4 ราย และเพศชาย 7 ราย ในจำนวนนี้มี 4 รายที่ให้ผลบวกปลอมโดยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอตด้วย (**ตารางที่ 2**) ทั้งหมดมีค่าเอนไซม์แอคทิวิตีตั้งแต่ 0.52 - 7.84 U/gHb (ข้อมูลที่ไม่ได้แสดง) ซึ่งต่ำกว่าค่า cut-off ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ จึงถือว่ามีภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดี แต่ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดี ซึ่งตัวอย่างเหล่านี้อาจจะมีการกลายพันธุ์ชนิดอื่นๆ ที่ไม่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้ เช่น Chinese-4, Chinese-5 หรือชนิดอื่นๆ ที่พบไม่บ่อยในคนไทย

ผลการประเมินประสิทธิภาพของการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีด้วยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอตที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ คล้ายกับผลการศึกษาของ Nantakomol และคณะ [20] ซึ่งได้ประเมินการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีด้วยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอตเปรียบเทียบกับการตรวจระดับดีเอ็นเอเช่นเดียวกับการศึกษาครั้งนี้ โดยทำการศึกษาในตัวอย่างเลือดของผู้ใหญ่สุขภาพดีจำนวน 295 ราย เป็นเพศชาย 67 ราย และเพศหญิง 228 ราย พบว่ามีความไวเพียงร้อยละ 43 และความจำเพาะร้อยละ 100 ค่าความไวที่ต่ำเป็นผลมาจากตัวอย่างที่ใช้ศึกษามีเพศหญิงมากกว่าเพศชายถึง 3.4 เท่า ซึ่งผู้วิจัยพบว่าเพศหญิงที่เป็น heterozygote มีเพียงร้อยละ 14.29 เท่านั้นที่มีค่าเอนไซม์แอคทิวิตีต่ำมากอยู่ในเกณฑ์ที่สามารถวินิจฉัยได้ด้วยวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอต กรณีของการตรวจวัดจี-6-พีดีแอคติวิตีจะสามารถลดผลบวกปลอมและลบปลอมลงได้โดยการศึกษาเพื่อหาค่า cut-off ที่เหมาะสม เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีเพิ่มมากขึ้น เช่น การศึกษาของ Miao และคณะ [21] ในทารกแรกเกิดที่ประเทศจีน พบว่า ในทารกเพศชาย การเพิ่มค่า cut-off จาก 2.10 U/gHb เป็น 2.35 U/gHb ทำให้ความไวเพิ่มจากร้อยละ 97.0 เป็นร้อยละ 99.1 แต่ความจำเพาะไม่เปลี่ยนแปลง (ร้อยละ 99.8 และ 99.7 ตามลำดับ) ส่วนในทารกเพศหญิง การเพิ่มค่า cut-off จาก 2.10 U/gHb เป็น 2.55 U/gHb ความไวเพิ่มจากร้อยละ 83.3 เป็นร้อยละ 97.6 แต่ความจำเพาะลดลงจากร้อยละ 99.8 เป็นร้อยละ 90.0 นอกจากนี้ผู้ทำการตรวจวัดจี-6-พีดีแอคติวิตีควรพิจารณาข้อมูลทางโลหิตวิทยาของตัวอย่างเลือดประกอบด้วย เช่น จำนวนเรติคูโลซัยต์ และจำนวนเม็ดเลือดขาว เนื่องจากทั้งเรติคูโลซัยต์และเม็ดเลือดขาวมีจี-6-พีดีแอคทิวิตีสูงกว่าเม็ดเลือดแดง [5] จากการศึกษาของ Khemtonglangพบว่าตัวอย่างเลือดที่มีจำนวนเม็ดเลือดขาวมากกว่า 20,000 cells/μL จะส่งผลทำให้จี-6-พีดีแอคทิวิตีสูงขึ้นกว่าความเป็นจริงได้ [22] และการกำจัดเม็ดเลือดขาวออกก่อนการตรวจวัด ทำให้ได้ค่าเอนไซม์แอคทิวิตีที่ถูกต้องมากขึ้น [23] สำหรับจำนวนเรติคูโลซัยต์นั้น มีผลไม่มากต่อการวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดี [9]

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีในเพศชายนั้น ทั้งวิธีฟลูออเรสเซ้นต์สปอตและการตรวจวัดจี-6-พีดีแอคทิวิตี มีความไวและความจำเพาะสูงมาก แต่ทั้ง 2 วิธียังมีความไวต่ำในการวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีในเพศหญิง การวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีในเพศหญิงให้ถูกต้อง จึงจำเป็นต้องใช้การตรวจดีเอ็นเอเพื่อหาการกลายพันธุ์ของยีนจี-6-พีดี ดังนั้นแต่ละโรงพยาบาลจึงควรพิจารณาเลือกใช้วิธีการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดีให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ จำนวนตัวอย่าง และงบประมาณ

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะเทคนิคการแพทย์และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำการศึกษาอิสระนี้ และขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ลิ่มทอง พรหมดี ที่ให้คำแนะนำเพิ่มเติมในการเตรียมต้นฉบับเพื่อการตีพิมพ์

เอกสารอ้างอิง

1. Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Lancet 2008; 371: 6474-.
2. Nkhoma ET, Poole C, Vannappagari V, Hall SA, Beutler E. The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis. Blood Cells Mol Dis 2009; 42: 26778-.
3. Tanphaichitr V. Glucose--6phosphate dehydrogenase (G--6-PD) deficiency. In: Intragumtornchai T. Hematology in practice. Bangkok: Beyond Enterprise; 2542. 11322-.
4. Nuchprayoon I, Sanpavat S, Nuchprayoon S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Thailand: G6PD Viangchan (871G>A) is the most common deficiency variant in the Thai population. Hum Mutat 2002; 19: 185.
5. Minucci A, Giardina B, Zuppi C, Capoluongo E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase laboratory assay: how, when, and why? IUBMB Life 2009; 61: 2734-.
6. Peters AL, Van Noorden CJ. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria: cytochemical detection of heterozygous G6PD deficiency in women. J Histochem Cytochem 2009; 57: 100311-.
7. Beutler E, Blume KG, Kaplan JC. International committee for standardization in haematology: recommended screening test for glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency. Br J Haematol 1979; 43: 465-7.
8. Donladlee C, Thanukarn T. Reference range of G-6-PD activity in adult using Trinity Biotech kit. [Bacherlor of Sciences]. Term paper in Medical Technology. Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University; 2012.
9. Kitcharoen S, Dechyotin S, Khemtonglang N, Kleesuk C, Relationship among glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) activity, G-6-PD variants and reticulocytosis in neonates of northeast Thailand. Clin Chim Acta 2015; 442: 125-9.
10. Louicharoen C, Nuchprayoon I. G6PD Viangchan (871 G > A) is the most commonG-6PD-deficient variant in the Cambodian population. J Hum Genet 2005; 50: 48–52.
11. Matsuoka H, Nguon C, Kanbe T, Jalloh A, Sato H, Yoshida S, *et al*. Glucose-6-phosphatedehydrogenase (G6PD) mutations in Cambodia: G6PD Viangchan (871 G > A) is the most common variant in the Cambodian population. J Hum Genet 2005; 50: 468–72.
12. Iwai K, Hirono A, Matsuoka H, Kawamoto F, Horie T, Lin K, *et al*. Distribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations in Southeast Asia. Hum Genet 2001; 108: 445–9.
13. Jiang W, Yu G, Liu P, Geng Q, Chen L, Lin Q, *et al*. Structure and function of glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient variants in Chinese population. Hum Genet 2006; 119: 463–78.

14. Jiang WY, Zhou BY, Yu GL, Liu H, Zeng JB, Lin QD, *et al*. G6PD genotype and its associated enzymatic activity in a Chinese population. Biochem Genet 2012; 50:34–44.
15. Matsuoka H, Wang J, Hirai M, Arai M, Yoshida S, Kobayashi T, *et al*. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Myanmar: G6PD Mahidol (487 G > A) is the most common variant in the Myanmar population. J Hum Genet 2004; 49: 544–7.
16. Nuchprayoon I, Louicharoen C, Charoenvej W. Glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations in Mon and Burmese of southern Myanmar. J Hum Genet 2008; 53: 48–54.
17. Louicharoen C, Sukkapan P, Nuchprayoon I. Kittiwatanasarn P. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Northeastern Thailand: prevalence and relationship to neonatal jaundice. Chula Med 2003; 47: 471-9.
18. Prachakthum S, Nunnarumit P, Pienvichit P, Chuansumrit A, Songdej D, Kajanachumpol S, Pakakasama S, Hongeng S. Genetic polymorphisms in Thai neonates with hyperbilirubinemia. Acta Paediatr 2009; 98:1106-10.
19. Kaplan M, Hammerman C. Neonatal screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency : biochemical versus genetic technologies. Semin Perinatol 2011;35:155-61.
20. Nantakomol D, Paul R, Palasuwan A, Day NP, White NJ, Imwong M. Evaluation of the phenotypic test and genetic analysis in the detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Malar J 2013; 12: 289-96.
21. Miao JK, Chen QX, Bao LM, Huang Y, Zhang J, Wan KX, Yi J, Wang SY, Zou L, Li TY. Determination of optimal cutoff value to accurately identify glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient heterozygous female neonates. Clin Chim Acta 2013; 424: 131-5.
22. Khemtonglang N. Genetic polymorphisms of *UGT1A1* and *G-6-PD* genes in neonates with hyperbilirubinemia. PhD Thesis in Medical Sciences. The Graduate School, Khon Kaen University; 2015.
23. Echler G. Determination of glucose-6-phosphate dehydrogenase levels in red cell preparations. *Am J Med Technol* 1983; 49: 259-62.