วารสาร
เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด
JOURNAL OF MEDICAL TECHNOLOGY AND PHYSICAL THERAPY

นิพนธ์ต้นฉบับ
ORIGINAL ARTICLE

การตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ในทารกแรกเกิดด้วยเครื่องตรวจหาสารเคมีอัตโนมัติ

สุธีรัตน์ ศรีศุภลักษณ์

บทคัดย่อ

การตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ในโรงพยาบาลพระปกเกล้าใช้วิธีตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ ด้วยเครื่องอัตโนมัติ SYNCHRON LX® i725 โดยใช้ชุดน้ำยา Trinity Biotech G-6-PD การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ โดยศึกษาถึงความถูกต้องและความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ พบว่ามีความถูกต้อง และความแม่นยำดี โดยมีค่า within run และ between run CV สำหรับ normal control เท่ากับร้อยละ 1.43 และ 4.82 และมีค่าเท่ากับร้อยละ 7.14 และ 9.35 สำหรับ deficiency control ตามลำดับ เมื่อศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง SYNCHRON LX® i725 กับวิธี methemoglobin reduction (MR) test ในตัวอย่างเลือดผู้ใหญ่ที่มาตรวจสุขภาพ 30 รายและตัวอย่างเลือดทารกเหลืองแรกเกิด 20 ราย พบว่ามีผลสอดคล้องกัน กล่าวคือ ผู้ใหญ่ 2 รายที่ให้ผลตรวจ MR test เป็น deficiency มีระดับเอนไซม์ 0.2 และ 0.5 U/gHb และเด็กทารก 5 รายที่ให้ผลตรวจ MR test เป็น deficiency มีระดับเอนไซม์อยู่ระหว่าง 0.4 - 1.7 U/g Hb จากการประยุกต์ใช้เครื่อง SYNCHRON LX® i725 ตรวจวิเคราะห์ภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ในทารกเหลืองแรกเกิดจำนวน 558 ราย ได้ข้อมูลระดับเอนไซม์ G-6-PD ในกลุ่ม deficiency , partial deficiency , normal activity และ increase activity เป็น 0 - 7 , 7 - 16, 16 - 29 และ > 29 U/gHb ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าร้อยละ 12.9 ของเด็กทารกเหลืองแรกเกิดมีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD และพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิงในอัตราส่วน 5 : 1 และเด็กหญิงที่มีภาวะพร่องเอนไซม์มีระดับเอนไซม์ G-6-PD โดยเฉลี่ยสูงกว่าเด็กชายที่มีภาวะพร่องเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.025$) พบว่าร้อยละ 74.0 ของเด็กทารกเหลืองแรกเกิด กลุ่ม normal activity มีระดับเอนไซม์ G-6-PD ในเพศชายและหญิงเท่ากับ 20.67 ± 2.71 และ 21.09 ± 2.78 U/gHb ตามลำดับ เมื่อศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย bilirubin ในทารกเหลืองแรกเกิดแต่ละกลุ่ม พบว่ามีค่าเฉลี่ย bilirubin แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) ผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าสามารถนำเครื่องตรวจหาสารเคมีอัตโนมัติมาใช้ในการตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ได้ ซึ่งควรมีการศึกษาเปรียบเทียบกับวิธีตรวจดีเอ็นเอต่อไป

คำสำคัญ: G-6-PD, methemoglobin reduction (MR) test, เครื่องตรวจหาสารเคมีชนิดอัตโนมัติ, บิริรูบิน

กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลพระปกเกล้า จ.จันทบุรี

วารสาร
เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด
JOURNAL OF MEDICAL TECHNOLOGY AND PHYSICAL THERAPY

นิพนธ์ต้นฉบับ
ORIGINAL ARTICLE

Detection of G-6-PD deficiency in newborns using automatic chemistry analyzer

Suteerat Srisupaluk

Abstract

At Prapokklao Hospital, the quantitative spectrophotometric method with SYNCHRON LX® i725 automatic machine and Trinity Biotech G-6-PD kit are used to detect the G-6-PD enzyme deficiency. The objective of this study is to evaluate the reliability of this method by studying accuracy and precision. The results show that the method is accurate and precise. The G-6-PD levels of normal and deficiency controls were within the assigned ranges provided by the manufacturer. The within run and between run CV for normal control were 1.43 % and 4.82 %, respectively and those for the deficiency control were 7.14 % and 9.35 %, respectively. We then compared the levels of G-6-PD enzyme determined using the SYNCHRON LX® i725 with the Trinity Biotech G-6-PD kit and the methemoglobin reduction (MR) test on 30 healthy adults and 20 clinically icteric neonates. The results show a good agreement between the two methods. Two adult G-6-PD deficient subjects had G-6-PD levels of 0.2 and 0.5 U/gHb whereas 5 neonates with G-6-PD deficiency had G-6-PD levels between 0.4 - 1.7 U/gHb. Further application of this SYNCHRON LX® i725 method to detect the G-6-PD deficiency was performed on 558 clinically icteric neonates. The subjects were categorized into 4 groups; Deficiency, Partial deficiency, Normal activity and Increase activity with the enzyme levels of 0 - 7, 7 - 16, 16 - 29 and > 29 U/gHb, respectively. This study showed that 12.9 % of neonates had G-6-PD deficiency and boys had more G-6-PD deficiency than girls with the ratio of 5:1. The girls with G-6-PD deficient had average G-6-PD enzyme level significantly higher than boys. Moreover, 74.01% of the neonates with normal activity had the average enzyme level of 20.67 ± 2.71 and 21.09 ± 2.78 in boys and girls, respectively. Significant difference on the average bilirubin levels in neonates were demonstrated ($P < 0.001$). The study indicates that the automatic chemistry analyzer can effectively be used to identify the G-6-PD deficiency. However, further comparison of the method with DNA analysis is required.

Key words: G-6-PD, Methemoglobin reduction (MR) test, Automatic chemistry analyzer, Bilirubin

Department of Clinical Pathology, Prapokklao Hospital, Chantaburi

บทนำ

G-6-PD เป็น house keeping enzyme ที่พบได้ในทุกเซลล์ โดยเฉพาะเม็ดเลือดแดง มีหน้าที่สำคัญนอกเหนือจากการเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาแรกของ hexose monophosphate pathway โดยช่วยเปลี่ยน glucose-6-phosphate ให้เป็น 6-phosphoglucono-lactone แล้ว ยังช่วย reduce NADP เปลี่ยนไปเป็น NADPH เมื่อขาดเอนไซม์ G-6-PD จึงไม่มีการสร้าง NADPH ซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญมากในการรักษาเม็ดเลือดแดงให้คงรูปไม่แตกทำลายได้โดยง่าย เนื่องจากในร่างกายมีการสร้าง reactive oxygen species (ROS) อยู่ตลอดเวลา ROS เหล่านี้ทำให้เกิดภาวะ oxidation ขึ้นกับเนื้อเยื่อของร่างกาย ทำลายส่วนที่เป็นไขมันของผิวเซลล์ ทำให้เอนไซม์สูญเสียหน้าที่ ทำลายโครงสร้างของ DNA และทำให้เซลล์ตาย การขาดเอนไซม์ G-6-PD ทำให้เกิด oxidation ขึ้นกับผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้เม็ดเลือดแดงอายุสั้นและเกิดการแตกซึ่งและทำให้มี heme metabolism เพิ่มขึ้น และทำให้ระดับ bilirubin ในกระแสเลือดสูงขึ้นได้ เด็กทารกแรกเกิดที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD (G-6-PD deficiency) อาจเกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงอย่างรุนแรง มีผลให้มีการเพิ่มขึ้นของ bilirubin ในซีรัม ซึ่งอาจก่อให้เกิด severe hyperbilirubinemia และ kernicterus ได้[1] และระหว่างที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนถูกสร้างออกมามาก การวัดเอนไซม์อาจได้ค่าสูงหรือปกติได้[2] ภาวะพร่อง G-6-PD มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ X-linked เมื่ออยู่ในเพศชายจะทำให้เกิดภาวะพร่อง G-6-PD ชัดเจน ขณะที่เพศหญิงที่เป็น heterozygote มีโครโมโซม X ผิดปกติเพียงตัวเดียว อาจมีเอนไซม์ G-6-PD ปกติหรือต่ำก็ได้[2]

การตรวจคัดกรองภาวะพร่อง G-6-PD ทางห้องปฏิบัติการอาจใช้วิธี fluorescent spot test หรือวิธี methemoglobin reduction (MR) test แต่ควรจะวินิจฉัยภาวะพร่อง G-6-PD ด้วยวิธีวิเคราะห์เอนไซม์เชิงปริมาณ (quantitative enzyme assay) ซึ่งอาศัยหลักการ spectrophotometry จากปฏิกิริยา reduction ของ NADP ให้เป็น NADPH[3] ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลพระปกเกล้าได้เคยตรวจหาภาวะพร่อง G-6-PD ทั้งวิธี MR test และ fluorescent spot test ในทารกแรกเกิดแต่ให้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจนัก จึงมักได้รับการร้องขอให้ตรวจโดยวิธีตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลพระปกเกล้าจึงได้เปลี่ยนวิธีการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD จากวิธีเดิมมาเป็นวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่องตรวจหาสารเคมีอัตโนมัติ ซึ่งเป็นวิธีที่มีใช้ในต่างประเทศ[4] การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์นี้ โดยศึกษาถึง ความถูกต้อง (accuracy) และความแม่นยำ (precision) การเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD เชิงปริมาณด้วยเครื่อง SYNCHRON LX® i725 โดยใช้ชุดน้ำยา Trinity Biotech G-6-PD kit กับวิธี methemoglobin reduction (MR) test การประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD เชิงปริมาณ ในทารกแรกเกิด และการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย bilirubin ในทารกเหลืองแรกเกิดแต่ละกลุ่มระดับเอนไซม์ G-6-PD

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. ตัวอย่างเลือด

1.1 ตัวอย่างเลือดได้จากผู้มาตรวจสุขภาพที่โรงพยาบาลพระปกเกล้า ทั้งเพศชายและเพศหญิง 30 รายอายุตั้งแต่ 20 ปี ขึ้นไป ซึ่งคัดเลือกและอนุญาตให้ตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD เจาะเลือดโดยใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง

1.2 ตัวอย่างเลือดจากทารกเหลืองแรกเกิดทั้งชายและหญิงที่มารดามาคลอด ณ โรงพยาบาลพระปกเกล้า ระหว่างเดือนตุลาคม 2550 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2551 ที่แพทย์ส่งตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD และระดับ bilirubin จำนวน 558 ตัวอย่าง

เกณฑ์การคัดออก ผู้ใหญ่และทารกเหลืองแรกเกิดที่มีประวัติได้รับการให้เลือดมาก่อน

2. วิธีการศึกษา

2.1 การตรวจหาความถูกต้อง (accuracy) และความแม่นยำ (precision) ของวิธีวิเคราะห์

นำ G-6-PD CONTROL, NORMAL Catalog No.G6888 (assigned range 9.4-17.5 U/gHb) และ G-6-PD CONTROL, DEFICIENT Catalog No.G5888 (assigned range 1.4 - 2.6 U/g Hb) มาตรวจด้วยเครื่อง SYNCHRON LX® i725 ในเวลาเดียวกัน (within-run) 20 ครั้ง และตรวจทุกวัน (between-run) 20 ครั้ง หาค่า mean , SD และ % CV

2.2 การเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD เชิงปริมาณด้วยเครื่อง SYNCHRON LX® i725 โดยใช้ชุดน้ำยา Trinity Biotech G-6-PD กับวิธี methemoglobin reduction (MR) test

ตัวอย่างเลือดผู้มาตรวจสุขภาพ 30 รายและตัวอย่างเลือดทารกเหลืองแรกเกิด 20 ราย ที่ได้รับการคัดเลือกตามเกณฑ์และเป็นเลือดใหม่ (fresh blood) จะถูกนำไปตรวจวิเคราะห์ภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD 2 วิธี ดังนี้

2.2.1 วิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่อง SYNCHRON LX® i725 ใช้น้ำยา Trinity Biotech G-6-PD kit ด้วยวิธีการตรวจที่ได้ปรับปรุงใช้กับเครื่องในระบบ SYNCHRON CX 4 /5 อาศัยหลักการเอนไซม์ G-6-PD reduced NADP ไปเป็น NADPH เมื่อมี G 6 P อัตราการเกิด NADPH เป็นอัตราส่วนกับ G-6-PD activity สามารถวัดได้ด้วยวิธี spectrophotometry โดยวัดการเพิ่มขึ้นของ NADPH ในการดูดกลืนแสงที่ 340 nm

วิธีการตรวจ ผสมตัวอย่างเลือด 25 µl กับ red cell lysing reagent 225 µl ผสมให้เข้ากันดีนำไปตรวจด้วยเครื่อง SYNCHRON LX®i725 ที่มีน้ำยา G-6-PD working reagent ใส่ภาชนะบรรจุไว้ในเครื่อง สั่งตรวจตามโปรแกรมที่ตั้งไว้ วิธีนี้ Linearity สูงถึง 2,500 U/L เปลี่ยน G-6-PD activity (U/L) ไปเป็น G-6-PD activity (U/gHb) ได้ตามสูตร

$$\text{G-6-PD (U/g Hb)} = \frac{\text{G-6-PD (U/L)}}{10 \times \text{Hemoglobin Value of Sample (g/dl)}}$$

ค่าที่บริษัทตรวจได้ในผู้มีสุขภาพดีชายและหญิง 90 คนมีค่าอยู่ในช่วง 7.0 - 20.5 U/gHb ในการทำปฏิกิริยาที่ 37 ^{O}ซ ใช้เวลาในการตรวจแต่ละครั้งประมาณ 10 นาที

2.2.2 วิธี methemoglobin reduction (MR) test[5,6]

3. การประยุกต์ใช้เครื่องตรวจหาสารเคมีชนิดอัตโนมัติ SYNCHRON LX® i725 ในการตรวจวิเคราะห์ภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD เชิงปริมาณด้วย Trinity Biotech G-6-PD kit

ตัวอย่างเลือดทารกเหลืองแรกเกิดซึ่งได้รับการคัดเลือกแล้ว 558 ตัวอย่างที่เป็นเลือดใหม่ (fresh blood) จะถูกนำมาตรวจหาระดับเอนไซม์ G-6-PD เชิงปริมาณด้วยเครื่อง SYNCHRON LX® i725 โดยใช้น้ำยา Trinity Biotech G-6-PD kit

4. การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย bilirubin ในทารกเหลืองแรกเกิดแต่ละกลุ่มระดับเอนไซม์ G-6-PD

ตรวจวิเคราะห์ระดับ bilirubin ในตัวอย่างเลือดทารกเหลืองแรกเกิดซึ่งได้รับการคัดเลือกและตรวจวัดระดับเอนไซม์ G-6-PD แล้ว 558 ตัวอย่าง โดยการเจาะเลือดเด็กใส่หลอด capillary ที่เคลือบด้วย heparin นำมาตรวจหาระดับ bilirubin ด้วยเครื่อง bilirubinometer[7]

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระดับเอนไซม์ G-6-PD ในทารกเพศชายและหญิงแต่ละกลุ่มด้วยสถิติ Independent t-test และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระดับบิลิรูบินในทารกเพศชายและทารกเพศหญิงแต่ละกลุ่มด้วยสถิติ One -way ANOVA โดยกำหนดนัยสำคัญทางสถิติ ที่ P-value < 0.05

ผลการศึกษา

ความถูกต้อง และแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

ผลการศึกษาความถูกต้องและความแม่นยำของวิธีการตรวจวิเคราะห์ พบว่ามีข้อมูลความถูกต้องและความแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ดี ดังแสดงใน **ตารางที่ 1**

ตารางที่ 1 ผลการศึกษาความถูกต้องและความแม่นยำ

	G-6-PD (U/gHb)			
	Normal control (G 6888) *		Deficient control (G 5888) *	
	Within run N = 20	Between run N = 20	Within run N = 20	Between run N = 20
Mean	14.67	14.10	1.54	1.39
SD	0.21	0.68	0.11	0.13
% CV	1.43	4.82	7.14	9.35

*Assigned ranges ของ G-6-PD Control

Normal control (G 6888) : 9.4-17.5 U/gHb Deficient control (G 5888) : 1.4-2.6 U/gHb

การเปรียบเทียบผลการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ด้วยเครื่อง SYNCHRON LX® i725 และวิธี MR test

ในตัวอย่างเลือดผู้ใหญ่ที่มาตรวจสุขภาพ 30 ราย พบผู้ใหญ่ 2 รายที่ให้ผลการตรวจด้วยวิธี MR test เป็น Deficiency มีระดับเอนไซม์ 0.2 และ 0.5 U/gHb ผู้ใหญ่ 3 ราย ตรวจ MR test ให้ผลเป็น Partial Deficiency มีระดับเอนไซม์อยู่ระหว่าง 8.8 - 11.4 U/gHb ผู้ใหญ่ 25 ราย ตรวจ MR test ให้ผล Normal มีระดับเอนไซม์อยู่ระหว่าง 10.2 - 24.0 U/gHb ดังแสดงใน **ตารางที่ 2**

ตารางที่ 2 ผลการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ด้วยเครื่อง SYNCHRON LX(i725 และวิธี methemoglobin reduction (MR) test ในผู้ใหญ่

MR-Test	จำนวน	ระดับเอนไซม์ที่วัดได้ด้วยวิธี SYNCHRON LX® i725 (U/gHb)
		Mean ± SD (ค่าต่ำ – ค่าสูง)
Deficiency	2	0.2,0.5
Partial deficiency	3	10.13 ± 1.30 (8.8 - 11.4)
Normal	25	13.27 ± 3.03 (10.2 - 24.0)

ในตัวอย่างเลือดทารกเหลืองแรกเกิด 20 รายพบเด็กทารก 5 รายที่ให้ผลตรวจด้วยวิธี MR test เป็น Deficiency มีระดับเอนไซม์อยู่ระหว่าง 0.4 - 1.7 U/gHb เด็กทารก 3 รายที่ให้ผลตรวจ MR test เป็น Partial deficiency มีระดับเอนไซม์อยู่ระหว่าง 12.9 - 15.6 U/gHb และเด็กทารก 12 ราย ที่ให้ผลตรวจMR test เป็น Normal มีระดับเอนไซม์อยู่ระหว่าง 19.3 - 24.2 U/gHb ดังแสดงใน **ตารางที่ 3**

ตารางที่ 3 การตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ด้วยเครื่อง SYNCHRON LX®i725 และวิธี methemoglobin reduction (MR) test ในเด็กทารกเหลืองแรกเกิด

MR-Test	**จำนวน**	**ระดับเอนไซม์ (U/gHb)**
		Mean ± SD (ค่าต่ำ – ค่าสูง)
Deficiency	5	1.18 ± 0.54 (0.4 - 1.7)
Partial deficiency	3	14.33 ± 1.36 (12.9 - 15.6)
Normal	12	21.89 ± 1.39 (19.3 - 24.2)

การประยุกต์ใช้เครื่องตรวจหาสารเคมีชนิดอัตโนมัติ SYNCHRON LX® i725 ในการตรวจวิเคราะห์ภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD เชิงปริมาณด้วย Trinity Biotech G-6-PD kit

ผลการตรวจวิเคราะห์ภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ในทารกเหลืองแรกเกิด ข้อมูลระดับเอนไซม์ G-6-PD ที่ได้จากการวิเคราะห์ถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ **กลุ่มที่ 1: Deficiency** มี ระดับเอนไซม์ อยู่ระหว่าง 0 - 7 U/gHb จัดเป็นกลุ่มที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD จากค่าอ้างอิงของบริษัทผู้ผลิต **กลุ่มที่ 2: Partial deficiency** มีระดับเอนไซม์ อยู่ระหว่าง 7 - 16 U/gHb ทั้งนี้จากการเปรียบเทียบกับวิธี MR test ในกลุ่มทารกเหลืองแรกเกิด พบกลุ่มที่ตรวจ MR test ได้ผลเป็น Partial deficiency มีค่าระดับเอนไซม์สูงสุด 15.6 U/gHb **กลุ่มที่ 3: Normal activity** มีระดับเอนไซม์อยู่ระหว่าง 16 - 29 U/gHb จากข้อมูลตรวจวิเคราะห์ระดับ bilirubin ในตัวอย่างเลือดทารกเหลืองแรกเกิดซึ่งได้รับการคัดเลือกและตรวจวัดระดับเอนไซม์ G-6-PD แล้ว 558 ตัวอย่าง พบทารกเหลืองแรกเกิดที่มีระดับเอนไซม์มากกว่า 29 U/gHb ทุกราย มีระดับ bilirubin สูงกว่า 14 mg/dl **กลุ่มที่ 4: Increase activity** มีระดับเอนไซม์ > 29 U/gHb จัดเป็นกลุ่มที่มี severe hemolysis[2,8] ผลการศึกษาพบว่าร้อยละ 12.9 ของเด็กทารกเหลืองแรกเกิด มีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ในกลุ่ม deficiency โดยพบว่าเด็กเพศชายมีภาวะพร่องเอนไซม์มากกว่าเด็กเพศหญิง ในอัตราส่วน 5:1 และเด็กเพศหญิงที่มีภาวะพร่องเอนไซม์มีระดับเอนไซม์ G-6-PD โดยเฉลี่ยสูงกว่าเด็กเพศชายที่มีภาวะพร่องเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.025$) ต่างจากกลุ่มอื่นๆ ที่ค่าเฉลี่ยระดับเอนไซม์ไม่แตกต่างกันระหว่างเพศชายและเพศหญิง ($P > 0.05$) ในกลุ่ม Normal activity ร้อยละ 74.01 ของเด็กทารกเหลืองแรกเกิดมีระดับเอนไซม์ G-6-PD เฉลี่ยในเพศชายและเพศหญิงเท่ากับ 20.67 ± 2.71 และ 21.09 ± 2.78 ตามลำดับ ดังแสดงใน **ตารางที่ 4**

ตารางที่ 4 ผลการศึกษาภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ในทารกเหลืองแรกเกิดจำนวน 558 ราย

กลุ่มทารกเหลืองแรกเกิด	ร้อยละ	อัตราส่วนชาย:หญิง	ระดับเอนไซม์ G-6-P-D (U/gHb)		
			ชาย Mean ± SD	หญิง Mean ± SD	P – value *
Deficiency	12.9	5 : 1	1.30 ± 0.73	2.79 ± 1.98	0.025
Partial deficiency	12.4	1 : 5.3	12.35 ± 2.24	11.84 ± 2.46	0.531
Normal activity	74.0	1.2 : 1	20.67 ± 2.71	21.09 ± 2.78	0.120
Increase activity	0.7	1 : 1	36.60 ± 9.19	34.55 ± 6.86	0.826

*Independent t-test เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระดับเอนไซม์ในทารกชายและหญิงแต่ละกลุ่ม

ค่าเฉลี่ยของ bilirubin ในทารกเหลืองแรกเกิดที่มีระดับ G-6-PD แตกต่างกัน

ตรวจวิเคราะห์ระดับ bilirubin ในตัวอย่างเลือดทารกเหลืองแรกเกิดซึ่งได้รับการคัดเลือกและตรวจวัดระดับ เอนไซม์ G-6-PD แล้ว พบว่ากลุ่มเด็กชายและหญิงมีค่าเฉลี่ย bilirubin แตกต่างกันทั้ง 4 กลุ่มระดับเอนไซม์ G-6-PD อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) โดยกลุ่มที่ 1: Deficiency มีค่าเฉลี่ย bilirubin สูง และกลุ่มที่ 4: Increase activity มีค่าเฉลี่ย bilirubin สูงมาก ดังแสดงใน **ตารางที่ 5**

ตารางที่ 5 ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของระดับ bilirubin ในทารกเหลืองแรกเกิดทั้ง 4 กลุ่ม

กลุ่มทารกเหลืองแรกเกิด	ระดับบิลิรูบิน (mg/dl)			
	ชาย Mean ± SD (ค่าต่ำ – ค่าสูง)	P – value *	หญิง Mean ± SD (ค่าต่ำ – ค่าสูง)	P- value *
Deficiency	15.65 ± 4.16 (N= 60)	< 0.001	13.67 ± 3.33 (N=12)	< 0.001
Partial deficiency	12.01 ± 3.43 (N = 11)		12.56 ± 2.35 (N=58)	
Normal activity	11.40 ± 3.58 (N = 224)		11.55 ± 3.37 (N=189)	
Increase activity	20.50 ± 6.08 (N = 2) (16.2-24.8)		16.15 ± 2.47 (N=2) (14.4 - 17.9)	

*One-way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระดับ bilirubin ในทารกเหลืองแรกเกิด 4 กลุ่ม

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

วิธีตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD เชิงปริมาณ ซึ่งวัดโดยหลักการ spectrophotometry ได้มีผู้ศึกษาไว้หลายรายงานวิจัย สามารถใช้ตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ได้[3,9,10,11] โรงพยาบาลพระปกเกล้าได้นำวิธีนี้มาใช้ตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ด้วยน้ำยา Trinity Biotech G-6-PD kit โดยดัดแปลงให้ใช้กับเครื่องตรวจหาสารเคมีชนิดอัตโนมัติ SYNCHRON LX® i725 เพื่อให้มั่นใจว่าสามารถใช้วิธีนี้ได้ การศึกษาครั้งนี้จึงได้ศึกษาความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ พบว่ามีความถูกต้องและความแม่นยำดี (ตารางที่ 1) และให้ผลการศึกษาเปรียบเทียบกับวิธี methemoglobin reduction (MR) test ที่สอดคล้องกันในตัวอย่างทารกเหลืองแรกเกิด (ตารางที่ 3) แต่ในผู้ใหญ่ (ตารางที่ 2) พบว่ามีระดับเอนไซม์ซ้อนทับกันระหว่างกลุ่ม Partial Deficiency (8.8 - 11.4 U/gHb) และกลุ่ม Normal (10.2 - 24.0 U/gHb) ซึ่งมีผู้ศึกษาเปรียบเทียบการตรวจวัดระดับเอนไซม์ G-6-PD วิธีอื่นกับวิธี DNA analysis พบว่ามีระดับเอนไซม์ซ้อนทับกันเช่นเดียวกัน กลุ่มหญิง heterozygote (0.1 - 7.1 U/gHb) กลุ่มชาย Normal (6.2 - 9.6 U/gHb)[10] ระดับเอนไซม์ในตัวอย่างทารกแรกเกิดจะสูงกว่าในตัวอย่างผู้ใหญ่ (ตารางที่ 2 และ 3) ซึ่งได้มีผู้ศึกษาไว้ว่า ค่าเฉลี่ย G-6-PD activity ในเม็ดเลือดแดงเด็กแรกเกิดจะสูงกว่าในผู้ใหญ่ประมาณร้อยละ 174[3] ซึ่งสาเหตุของภาวะเหลืองในทารกแรกเกิดในประเทศไทยที่สำคัญเกิดจากหมู่เลือด ABO แม่-ลูกไม่เข้ากัน และภาวะติดเชื้อ[2] จากการประยุกต์ใช้วิธีนี้ตรวจวิเคราะห์ภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ในทารกเหลืองแรกเกิดจำนวน 558 ราย (ตารางที่ 4) พบภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD เพียงร้อยละ 12.9 ที่อาจเป็นสาเหตุให้เกิดภาวะเหลืองในทารกแรกเกิด[1,2] มีรายงานการศึกษาในภาคเหนือของประเทศไทย พบภาวะพร่องเอนไซม์ในทารกเหลืองแรกเกิดในอัตราที่แตกต่างกันมาก คือ ร้อยละ 64 และร้อยละ 6.5[2] ผลการศึกษาครั้งนี้พบจำนวนเด็กทารกเหลืองแรกเกิดกลุ่มภาวะพร่องเอนไซม์ (Deficiency) ในเพศชายมากกว่าเพศหญิงในอัตราส่วน 5:1 ซึ่งมีผู้ศึกษาชายและหญิงที่ประเทศกรีซพบในอัตราส่วน 2.1:1[11] และเด็กหญิงที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ มีระดับเอนไซม์ G-6-PD โดยเฉลี่ยสูงกว่าเด็กชายที่มีภาวะพร่องเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.025) ซึ่งมีผู้ศึกษาพบว่าในหญิงที่เป็น heterozygote อาจมีระดับเอนไซม์ G-6-PD

ต่ำกว่าปกติหรืออยู่ในเกณฑ์ปกติก็ได้ จากผลการศึกษาของ Maffi Donatella และคณะ พบว่าหญิงที่เป็น heterozygote มีระดับเอนไซม์ G-6-PD อยู่ระหว่าง 0.1 - 7.1 U/gHb[10] เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ได้จัดกลุ่มทารกเหลืองแรกเกิดในกลุ่มที่ 1: Deficiency (ระดับเอนไซม์ G-6-PD 0 - 7 U/gHb) จึงอาจจะมีเด็กหญิงที่เป็น heterozygote อยู่ในกลุ่มนี้ด้วยก็ได้

จากการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย bilirubin ในทารกเหลืองแรกเกิดแต่ละกลุ่มระดับเอนไซม์ G-6-PD พบว่าทั้ง 4 กลุ่มทั้งเพศชายและเพศหญิงมีระดับ bilirubin แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) โดย กลุ่มที่ 1: Deficiency มีค่าเฉลี่ย bilirubin สูง แต่กลุ่มที่ 4: Increase activity มีค่าเฉลี่ย bilirubin สูงมาก (ตารางที่ 5) ซึ่งแสดงถึงภาวะ severe hemolysis สอดคล้องกับทฤษฎีที่มีผู้ศึกษาไว้ว่าระดับเอนไซม์ G-6-PD จะสูงที่สุดในเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนระหว่างที่มี hemolysis เมื่อเม็ดเลือดแดงแก่ถูกทำลายเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนจะถูกสร้างออกมามาก จึงตรวจวัดระดับเอนไซม์ G-6-PD ได้สูง ทำให้ตรวจผู้มีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ผิดพลาดเป็นผู้ที่ไม่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ได้ ซึ่งจะต้องตรวจซ้ำ 2-3 เดือนภายหลังจากเกิด hemolysis แล้ว[2,8] ผลการศึกษาทั้งหมดนี้ชี้ให้เห็นว่าสามารถนำเครื่องตรวจหาสารเคมีอัตโนมัติมาใช้ในการตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ได้ ซึ่งเป็นประโยชน์มากสำหรับใช้ตรวจในทารกแรกเกิดได้ผลการวิเคราะห์เป็นข้อมูลเชิงปริมาณ มีการควบคุมคุณภาพผลการตรวจในเด็กทารกเหลืองแรกเกิดเปรียบเทียบกับวิธี MR test พบว่า ให้ผลสอดคล้องกันดี ผลการศึกษาพบจำนวนเด็กชายมีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD มากกว่าเด็กหญิงสอดคล้องกับลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ X-linked และค่าเฉลี่ย bilirubin จะสูงในกลุ่มเด็กชายหรือหญิงกลุ่มที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD สอดคล้องกับการที่ภาวะพร่องเอนไซม์ทำให้มีโอกาสเกิดภาวะเหลืองได้

การตรวจด้วยวิธีที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นวิธีตรวจแบบรวดเร็ว ไม่ต้องใช้ความชำนาญเฉพาะตัวในการอ่านผลและไม่ต้องมีพื้นที่สำหรับตรวจวิเคราะห์ โดยเฉพาะ ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลพระปกเกล้าให้บริการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ตลอด 24 ชั่วโมง ทำให้ได้ตรวจเลือดใหม่ (fresh blood) จึงสามารถวัดระดับเอนไซม์ได้ถูกต้องกว่าเลือดเก่า และตรวจได้ก่อนจะให้เลือดผู้ป่วย ช่วยการวินิจฉัยของแพทย์ได้มากโดยเฉพาะในเด็กทารกแรกเกิดที่มีภาวะเหลือง โรงพยาบาลที่มีเครื่องตรวจหาสารเคมีอัตโนมัติในระบบ SYNCHRON CX 4/5 สามารถตรวจด้วยวิธีนี้ได้เช่นกัน เท่าที่ทราบโรงพยาบาลพระปกเกล้าเป็นโรงพยาบาลเพียงแห่งเดียวในประเทศไทยที่ใช้วิธีนี้ในการตรวจ G-6-PD ทำให้ไม่อาจเปรียบเทียบผลการตรวจกับห้องปฏิบัติการอื่นได้ หากได้มีการศึกษาเปรียบเทียบกับวิธี DNA analysis[10] เพิ่มเติมด้วย จะทำให้สามารถจัดกลุ่มภาวะพร่องเอนไซม์ และปกติได้ถูกต้องมากขึ้นและทราบค่า cut off ระดับเอนไซม์ ของกลุ่มหญิงที่เป็น heterozygote ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น เนื่องจากหญิงที่เป็น heterozygote บางรายอาจเกิดภาวะ severe hemolysis ได้[11]

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลพระปกเกล้าทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือร่วมมือ และสนับสนุนข้อมูล จนทำให้บรรลุวัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. รัชดา เครสซี่. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency: ปัจจัยเสี่ยงแฝงของการเกิด Kernicterus. ใน: รุจาภา นิ่มสังข์ (บรรณาธิการ) การประชุมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง ความก้าวหน้าของความรู้เรื่องบิลิรูบินและการฝึกปฏิบัติการ วันที่ 2-4 พฤษภาคม 2550 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2550:14-20.
2. วรวรรณ ตันไพจิตร. Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency ใน: ทิพย์ ศรีไพศาล, วิชัย ประยูรวิวัฒน์, กิตติ ต่อจรัส (บรรณาธิการ) โลหิตวิทยา1995. กรุงเทพฯ: ชัยเจริญ 2538: 189-98.

3. Wolfe L, Manley PE. Disorder of erythrocyte metabolism. In: Arceci RJ, Hann IM, Smith OP(eds) Pediatric Hematology. Massachusetts: Blackwell Publishing ,2006: 171-92.
4. http://209.85.175.104/search?q =cache: LkX3IfB4g9cJ:guineab4u.blogspot.c Accessed on 6 March 2008
5. สุรพร มาตระกูล. Glucose-6-phosphatedehydrogenase (G-6-PD) (Methemogolbin Reduction screening test) ใน: นิมิตร มรกต (บรรณาธิการ) คู่มือปฏิบัติการชันสูตรโรค ฉบับปรับปรุง. เชียงใหม่: ชมรมเทคนิคการแพทย์ภาคเหนือ 2525 : 138-40.
6. Brewer GJ, Tarlov AR, Alving AS. The methemogolbin reduction test for primaquine type sensitivity of erythrocyte. J Am Assoc 1962 ; 180: 386-88.
7. นภดล ทับเปรม, จุรีรัตน์ ดาดวง, เรวัตร ทักษิณะมณี, ลิ่มทอง พรหมดี. การศึกษาเปรียบเทียบการตรวจวัดบิลิรูบินในเด็กแรกคลอด 3 วิธีที่ใช้ในงานประจำ. วารสารเทคนิคการแพทย์ 2550; 35: 1868-76.
8. Herschel M, Beutler E. Low Glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme activity level at the time of hemolysis in a male neonate with the African type of deficiency. Blood cells, Mol Dis 2001; 27: 918-23.
9. Frank JE. Diagnosis and management of G 6 PD deficiency. Am Family Physician 2005; 72: 1277-82.
10. Maffi D, Pasquino MT, Caprari P, Caforio MP, Cianciulli P, Sorrentino F et al. Identification of G6PD mediterranean mutation by amplification refractory mutation system. Clin Chim Acta 2002; 321: 43-47.
11. Reclos GJ, Hatzidakis CJ, Schulpis KH. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency neonatal screening: preliminary evidence that a high percentage of partially deficient female neonates are missed during routine screening. J Med Screen 2000; 7: 46-51.