การศึกษาเปรียบเทียบการตรวจหาระดับเอนไซม์ G-6-PD ระหว่างวิธี Methylene blue reduction กับ Fluorescent spot test

อรพินธ์ ไชยารัศมี วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) MT(ASCP) *

สุรพร มาตระกูล วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) วท.ม. (ชีวเคมี) *

บทคัดย่อ

การตรวจหาความผิดปกติของเอนไซม์ G-6-PD ในผู้ป่วย Drug-induced hemolytic anemia เป็นสิ่งจำเป็นเพื่อช่วยในการวินิจฉัยแยกออกจากผู้ป่วย hemolytic disease เนื่องจากสาเหตุอื่น ปัจจุบันได้มีผู้เสนอวิธีการตรวจหาระดับเอนไซม์ G-6-PD ที่ง่าย, รวดเร็ว และสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายน้อย เช่น Methemoglobin reduction test และ Fluorescent screening test การศึกษาเปรียบเทียบครั้งนี้ก็เพื่อหาวิธีการตรวจเอนไซม์ G-6-PD ที่ง่าย, สิ้นเปลืองน้อย, รวดเร็ว และให้ผลการตรวจที่เชื่อถือได้มากที่สุด โดยทำการตรวจเลือดตัวอย่างจากผู้ป่วยรวมทั้งสิ้น 504 ราย เป็นชาย 243 ราย และหญิง 261 ราย

ผลการตรวจพบว่าระดับของเอนไซม์ G-6-PD ที่ตรวจด้วยวิธี Methylene blue reduction และวิธี Fluorescent spot ไม่มีความสัมพันธ์กันแต่ประการใด ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) = 0.04 ในเพศชาย และ 0.03 ในเพศหญิง ค่าที่ได้จากการตรวจทั้งสองวิธีในทั้งสองเพศมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

การตรวจหาเอนไซม์ G-6-PD ด้วยวิธี Methylene blue reduction พบว่าเพศชายร้อยละ 86.0 มีเอนไซม์ปกติ และเพศหญิงร้อยละ 93.1 มีเอนไซม์ปกติ ส่วนการตรวจด้วยวิธี Fluorescent spot พบว่าจะปกติในเพศชายเพียงร้อยละ 77.0 และเพศหญิงร้อยละ 88.1

การเปรียบเทียบทั้งสองวิธีการตรวจ พบว่า Fluorescent spot test (FS) เป็นวิธีการตรวจที่ sensitive มากกว่าวิธี Methylene blue reduction โดยสามารถตรวจวัดการพร่องเอนไซม์ G-6-PD ได้มากกว่า ทั้งยังมีความจำเพาะเจาะจงกว่าเพราะใช้ Substrate โดยตรงในการทดสอบเอนไซม์ นอกจากนี้ยังกินเวลาน้อย, ให้ผลการตรวจชัดเจนกว่า และสามารถตรวจได้จาก Blood specimen ที่เก็บไว้บนกระดาษกรองนานเป็นสัปดาห์ จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นวิธีการตรวจหาระดับเอนไซม์ G-6-PD ในห้องปฏิบัติการชันสูตรทั่วๆ ไป ที่ต้องการประหยัดทั้งเวลาและค่าใช้จ่าย ตลอดจนผลการตรวจที่เชื่อถือได้

---

* ภาควิชาคลินิคัลไมโครสโคปี คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Bull Chiang Mai AMS
Vol 14, No 3, September 1981.

บทนำ

อัตราการเกิด Hemolytic disease หลายรูปแบบได้เพิ่มมากขึ้นในระยะไม่นาน ที่ผ่านมานี้ ส่วนหนึ่งมีสาเหตุมาจากการพร่องเอนไซม์ทางกรรมพันธ์ เป็นผลให้เกิดความผิดปกติต่อการทำหน้าที่ รวมทั้งความมั่นคงแข็งแรงของผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง[1] ภาวะที่เรียกว่า Drug-induced hemolytic anemias อาจเกิดขึ้นได้จากการพร่องเอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งจากกลุ่มต่อไปนี้ คือ Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD), Glutathione reductase (GSSG-R) หรือการพร่องของระดับ Reduced glutathione (GSH) นอกจากนี้ ในกลุ่มของ Nonspherocytic congenital hemolytic anemia ก็อาจเกิดจากการพร่องเอนไซม์ Pyruvate kinase (PK), G-6-PD และที่พบไม่บ่อยนัก คือ การพร่อง GSH หรือ GSSG-R, Diphosphoglyceromutase, Triosephosphate isomerase หรือ ATPase สำหรับผู้ป่วยที่พร่อง G-6-PD นั้นพบได้ในชาวอเมริกันผิวดำเป็นกลุ่มแรก ระยะต่อมาได้มีรายงานพบได้ในประชากรของหลายประเทศ[2-4] และประมาณว่าปัจจุบันมีผู้ที่พร่องเอนไซม์ G-6-PD ทั่วโลกอยู่ราว 100 ล้านคน[5] ในประเทศไทยได้มีการศึกษาเกี่ยวกับอุบัติการการพร่องเอนไซม์ G-6-PD ในส่วนต่าง ๆ ของประเทศ โดยเฉพาะในภาคเหนือพบประชากรพร่องเอนไซม์ G-6-PD สูงถึง 12.5%[9]

การตรวจวินิจฉัยความผิดปกติเนื่องจากการพร่องเอนไซม์ G-6-PD ด้วยวิธีการทางชีวเคมีนั้น จะให้ประโยชน์อย่างมากทั้งในด้านการให้คำแนะนำแก่ผู้ที่มีความผิดปกติทางกรรมพันธุ์ ตลอดจนการสนับสนุนต่อการรักษาผู้ป่วย อย่างไรก็ตาม วิธีการตรวจที่จะวิเคราะห์หาความบกพร่องเอนไซม์ค่อนข้างจะสิ้นเปลือง, กินเวลานาน และต้องใช้อุปกรณ์พิเศษในการตรวจ ด้วยเหตุผลเหล่านี้ ในปัจจุบันจึงมีผู้คิดค้นหาวิธีการตรวจที่ง่าย, รวดเร็ว และสามารถใช้ผลการตรวจเพื่อแยกความผิดปกติของการพร่องเอนไซม์ทางกรรมพันธุ์ออกจากความผิดปกติกลุ่มอื่นได้

คณะผู้ศึกษาได้ทำการตรวจหาความบกพร่องเอนไซม์ G-6-PD จากสองวิธีการตรวจ คือ Methemoglobin reduction test[6] กับ Fluorescent screening test[7-8] เพื่อหาข้อเปรียบเทียบให้ได้วิธีการตรวจที่ทำได้ง่าย, กินเวลาน้อย และได้ผลการตรวจที่น่าพอใจ รวมทั้งสามารถนำไปใช้ได้ในห้องปฏิบัติการชันสูตรทั่วไปด้วย

วัสดุและวิธีการตรวจ

1. ตัวอย่างเลือดที่นำมาใช้ในการศึกษาทดลองเปรียบเทียบครั้งนี้ เป็นเลือดที่เจาะจากเส้นเลือดดำผสมกับ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งในปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่อเลือด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยได้จากผู้ป่วยที่มารับการตรวจทางโลหิตวิทยาของห้องปฏิบัติการชันสูตรคลินิคัลไมโครสโคปี้ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลนครเชียงใหม่ รวมด้วยกันทั้งสิ้น 504 ราย เป็นเพศชาย 243 ราย และเพศหญิง 261 ราย

2. วิธีการตรวจที่ได้นำมาใช้ในการตรวจเพื่อการศึกษาเปรียบเทียบครั้งนี้ มี 2 วิธี คือ

ก. Methemoglobin reduction test (Methylene blue หรือ M.B.)[6]

น้ำยา Combined sodium nitrite และ Glucose : เติมSodium nitrite (Merck) จำนวน 1.25 กรัม และ Glucose 5.0 กรัมลงใน Volumetric flask เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของน้ำยานี้เป็น 0.18 M $NaNO_2$ และ 0.28 M Glucose

สีย้อม 0.0004 M Methylene blue : เติม 0.15 กรัมTrihydrate methylene blue chloride (Mallinckrodt)ใน Volumetric flask เติมน้ำกลั่นให้ครบจำนวน 1,000 มิลลิลิตร

ใช้เลือดตัวอย่างจำนวน 200 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำยา Combined sodium nitrite และ Glucose จำนวน 10 ไมโครลิตร แล้วเติมสีย้อม Methylene blue ในปริมาณ 10 ไมโครลิตร ในหลอดแก้วขนาด 13x100 มิลลิเมตร เขย่าให้เข้ากันดี แล้วนำไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมงครึ่ง หลังการ incubate แล้วนำมาอ่านผลการตรวจ

ฮีโมโกลบินจะถูก oxidized โดย Sodium nitrite ให้เป็นเมทฮีโมโกลบินสีน้ำตาล แต่โดยที่กระบวนการ Glucose metabolism ของเม็ดเลือดแดงผ่านทาง Pentose phosphate patnway โดยมีเอนไซม์ G-6-PD ร่วมปฏิกริยาด้วย ทำให้เกิด NADPH และจะไปช่วย reduced ให้ Methemoglobin กลายเป็น Oxyhemoglobin ซึ่งมีสีแดง เมื่ออ่านผลเปรียบเทียบจะได้ดังนี้

- ในหลอดที่มีระดับเอนไซม์ G-6-PD ปกติ จะเห็นส่วนผสมมีสีแดง
- ในหลอดที่มีการพร่องของระดับเอนไซม์ G-6-PD จะเห็นส่วนผสมเป็นสีน้ำตาลซึ่งเป็นลักษณะของ Complete deficiency
- ในหลอดที่มีสีของส่วนผสมอยู่ระหว่างสีแดงและสีน้ำตาล แสดงว่าเป็นลักษณะของ Partial deficiency

ข. Fluorescent spot test (FS)[8]

Combined reagent solution :

Glucose-6-P, sodium salt, 10 mmol/l	1.0 ml
β-NADP, 7.5 mmol/l	1.0 ml
Saponin (Sigma), 10 gm/l	2.0 ml
Tris-HCl buffer, 750 mmol/l, pH 7.8	3.0 ml
Oxidized glutathione (GSSG), 8 mmol/l	1.0 ml
Distilled water	2.0 ml

น้ำยานี้เก็บได้นานหลายเดือนที่อุณหภูมิ -20°C

Bull Chiang Mai AMS
Vol 14, No 3, September 1981.

นำเลือดตัวอย่างจำนวน 10 ไมโครลิตรมาหยดบนกระดาษกรอง Whatman No 1 แล้วทิ้งไว้ให้แห้งในอุณหภูมิห้อง ตัดกระดาษกรองที่มีหยดเลือดแห้งนี้ใส่ลงไปในหลอดแก้วขนาด 13x100 มิลลิเมตร เติม Combined reagent solution ลงไปจำนวน 100 ไมโครลิตร เขย่าหลอดแก้วให้ผสมกันดีแล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C นานระหว่าง 15-20 นาที เขย่าหลอดแก้วแล้วดูดเอาส่วนผสมในหลอดมา 10 ไมโครลิตรหยดบนกระดาษกรองที่สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 5-10นาที แล้วนำมาตรวจดูภายใต้แสงคลื่นยาวของ Ultraviolet lampการเตรียมตัวอย่างเลือดที่จะให้ผลบวก (Deficient Control)ทำได้โดยการผสมเลือดปกติกับน้ำยา แล้วหยดลงบนกระดาษกรองทันที

ในเลือดที่มีระดับเอนไซม์ G-6-PD ปกติ จะเกิดแสงเรืองของ NADPH ที่สร้างมาจาก NADP ร่วมกับ G-6-PD บางส่วนของ NADPH จะถูก oxidized โดย GSSG ในปฏิกริยานี้ด้วย แต่อัตราการ catalyzed โดย Glutathione reductase มักจะช้ากว่าอัตราการสร้าง NADPH เม็ดเลือดแดงที่มีเอนไซม์ G-6-PD ในปริมาณ 20 % ของระดับปกติจะไม่ทำให้เกิดแสงเรืองต่อแสงอุลทราไวโอเล็ท การอ่านผลมีดังนี้

ถ้าให้ผลบวก คือผู้ป่วยขาดเอนไซม์ G-6-PD ชนิด Complete deficiency จุดที่หยด Incubation mixture จะไม่เกิดแสงเรือง และจะ Grading เท่ากับ 0 ในทางตรงกันข้ามถ้าให้ผลลบ คือผู้ป่วยมีระดับเอนไซม์ G-6-PD เพียงพอ ก็จะพบว่าจุดที่หยด mixture นี้ ให้แสงเรืองสีเขียวต่อแสงอุลทราไวโอเล็ท ซึ่งสามารถจะ Grading ได้ตั้งแต่ 1+ จนถึง 4+ ตามความมากน้อยของการเกิดแสงเรือง แต่ถ้าจุดของ mixture นี้ให้แสงเรืองเพียงเล็กน้อย ก็ถือว่าให้ผลการตรวจเป็น Partial deficiency และจะ Grading ให้เป็น $\pm$ เท่านั้น

ผลการทดลอง

การวัดระดับของเอนไซม์ G-6-PD โดย Methylene blue reduction test และ Fluorescent spot test พบว่าค่าที่ได้จากทั้งสองวิธีการตรวจนี้ไม่มีความสัมพันธ์กัน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) = 0.04 ในเพศชาย และ 0.03 ในเพศหญิง การทดสอบ X^2 ก็ให้ผลของค่าในทั้งสองวิธีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ดังได้แสดงไว้ในตารางที่ 1

การตรวจหาระดับเอนไซม์ F-6-PD ปกติในเพศชาย จำนวน 243 รายด้วยวิธี Methylene blue reduction พบร้อยละ 86.0 และด้วยวิธี Fluorescent spot พบร้อยละ 77.0 ส่วนในเพศหญิง จำนวน 261 ราย เมื่อตรวจด้วยวิธี Methylene blue reduction พบร้อยละ 93.1 และวิธี Fluorescent spot พบร้อยละ 88.1 และได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 แล้ว

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจวัดระดับเอนไซม์ G-6-PD ในเพศชายและหญิงด้วยวิธีการตรวจ MB และ FS

SEX	Total Number	Methylene blue reduction test / Fluorescent spot test									X^2	p	r
		N/N	P/N	D/N	N/P	P/P	D/P	N/D	P/D	D/D			
Male	243	181	1	6	20	0	4	8	0	23	114.64	<0.05	0.04
Female	261	227	2	2	10	0	4	8	0	8	86.15	<0.05	0.03
Both	504	408	3	8	30	0	8	16	0	31	211.94	<0.05	0.03

N = Normal, P = Partial deficiency, D = Deficiency.

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนร้อยละของเพศชายและเพศหญิง ที่มีระดับเอนไซม์ G-6-PD ปกติ ด้วยวิธีการตรวจ MB และ FS

SEX	Total Number	Methylene blue reduction test		Fluorescent spot test	
		Normal	%	Normal	%
Male	243	209	86.0	187	77.0
Female	261	243	93.1	230	88.1

บทวิจารณ์

จากการทดลองศึกษาเปรียบเทียบวิธีการ ตรวจหาระดับเอนไซม์ G-6-PD ทั้งของวิธี Methylene blue (MB) และ Fluorescent spot (FS) ทั้งในเพศชายและหญิง ให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และพบว่าวิธี FS มีความจำเพาะเจาะจงและความไวมากกว่าวิธีMB ในการวัดระดับความพร่องของเอนไซม์ G-6-PD ในเพศชาย มักจะวัดได้ง่ายและเห็นได้ชัดเจน เพราะเป็นการพร่องชนิด complete deficiency แต่ในเพศหญิงนั้น เป็นการพร่องชนิด Heterozygous หรือ Partial deficiency จะเห็นได้ไม่ค่อยชัดเจน จากการทดลองพบว่าวิธี FS จะสามารถทำการตรวจให้เห็นได้ชัดเจนกว่าในวิธี MB ทั้งนี้เนื่องจากวิธี MB อาศัยการดูสีของเมทฮีโมโกลบินซึ่งเป็นสีน้ำตาล เปรียบเทียบกับสีของ Oxyhemoglobin ที่เป็นสีแดง หากเกิดการพร่อง

Bull Chiang Mai AMS
Vol 14, No 3 September 1981.

ชนิด Partial deficiency สีที่เกิดขึ้นจะอยู่ระหว่างน้ำตาลอมแดง ซึ่งจะเปรียบเทียบเพื่อแยกกับสีปกติได้ค่อนข้างยาก และระยะเวลาของการตรวจโดยวิธี MB นี้ต้องนำมา incubate นานอย่างน้อย 3 ชั่วโมงถึง 3 ชั่วโมงครึ่ง เพราะถ้าหากระยะเวลาของการ incubate ไม่สมบูรณ์ ก็จะทำให้ผลที่ได้เป็น False positive ได้ การตรวจด้วยวิธี MB เป็นจำนวนมากๆ ก็ไม่ค่อยจะสะดวกนัก ส่วนวิธี FS นั้น ใช้เวลาในการ incubate เพียง 15-20 นาทีก็สามารถอ่านผล ได้จากการเกิดแสงเรืองต่อแสงอุลทราไวโอเล็ท ซึ่งสะดวกและเหมาะสมสำหรับการตรวจตัวอย่างเลือดเป็นจำนวนมากราย นอกจากนี้หากไม่สามารถทำการตรวจได้ทันทีจากเลือดที่เจาะมาใหม่ๆ ก็สามารถที่จะหยดเก็บไว้บนกระดาษกรอง แล้วนำไปตรวจได้ในภายหลังนานเป็นสัปดาห์ แต่วิธี MB นั้น การตรวจจากเลือดที่เจาะมาใหม่ไม่เกิน 36 ชั่วโมงจึงจะให้ผลดี (7)

จากการเปรียบเทียบผลการตรวจทั้งสองวิธีนี้ แม้ว่าจะไม่มีความสัมพันธ์กันในตัวเลขทางสถิติ แต่ผลการตรวจพบเอนไซม์ G-6-PD ในระดับปกติและระดับของการพร่องในตัวอย่างเลือดส่วนใหญ่มักจะไปด้วยกันได้ ปัจจัยต่างๆ ที่เป็นสาเหตุให้ผลของการตรวจตัวอย่างเลือดบางราย มีความแตกต่างกันในสองวิธีการตรวจนั้น พอจะสรุปได้เป็นข้อๆ สำหรับผู้ที่สนใจจะนำเอาวิธีใด วิธีหนึ่งในสองวิธีการตรวจนี้ไปใช้ในการตรวจหาระดับเอนไซม์ G-6-PD ในห้องปฏิบัติการชันสูตร ได้พึงให้ความระมัดระวัง เพื่อป้องกันความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นได้ ดังนี้

1. เลือดที่มี anemia มาก ๆ หากตรวจด้วยวิธี MB ควรปรับค่าฮีมาโตคริต ให้อยู่ในช่วง 40-45 % ก่อน โดยการปั่นแยกเอาพลาสม่าออกบางส่วนก่อนที่จะนำเลือดนั้นมาทำการตรวจ เพราะเลือดที่มีเม็ดเลือดแดงน้อย จะทำให้อัตราส่วนของ Sodium nitrite ต่อปริมาณฮีโมโกลบินสูงเกินความสามารถของเอนไซม์ G-6-PD ในการ reduced เปลี่ยนกลับเมทฮีโมโกลบิน ทำให้ผลการตรวจกลายเป็น Falsely deficiency ได้

2. เลือดที่มี Jaundice มากๆ ระดับบิลิรูบิน จะทำให้การเกิดแสงเรืองต่อแสงอุลทราไวโอเล็ทมีมากกว่าปกติ อาจทำให้การตรวจพวก Partial deficiency โดยวิธี FS กลายเป็นพวกที่มีเอนไซม์ G-6-PD ระดับปกติได้

3. โดยวิธี MB นั้น การอ่านผลสามารถบอกได้จากสีที่เปลี่ยนกลับไปเป็น Oxyhemoglobin และง่ายต่อการบอกระดับในรายที่มีการขาดเอนไซม์ การอ่านผลอาจยืดออกไปจนถึง 3 ชั่วโมงครึ่ง แต่ไม่ควรนานไปกว่านั้น ซึ่งถ้าหากยังเป็นสีน้ำตาลที่ระยะเวลานี้ ก็ถือได้ว่าผู้ป่วยขาดเอนไซม์ G-6-PD แต่การอ่านสีของระดับ Partial deficiency นั้นค่อนข้างยาก

4. เลือดที่เป็น Methemoblobinemia อยู่แล้ว อาจจะเนื่องมาจากความผิดปกติของพวก Reducing system อื่นใด หรือมีฮีโมโกลบินผิดปกติก็ตาม จะให้ผลการตรวจ G-6-PD โดยวิธี MB เป็น Falsely deficiency ได้

5. สำหรับห้องปฏิบัติการที่มีการตรวจเอนไซม์ G-6-PD นานๆ ครั้ง อาจจะใช้วิธีได้ แต่ถ้ามี Specimen มากหรือการออกไปเก็บ Specimen จากการสำรวจในชนบทควรใช้วิธี FS

ซึ่งเป็นวิธีการตรวจที่ให้ความไว, มีความจำเพาะเจาะจง, กินเวลาน้อย และยังให้ผลการตรวจที่น่าเชื่อถือได้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Rapoport, S : The regulation of glycolysis in mammalian erythrocytes. Essays Biochem 4:69, 1968.

2. Chan, TK and Todd, D : Characteristics and distribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient variants in South China. Am J Hum Genet 24:475, 1972.

3. Saldanha,PH et al : Distribution and heredity of erythrocyte G-6-PD activity and electrophoretic variants among different racial groups at Sao Paulo. Brazil J Med Genet 6:48, 1969.

4. Stamatoyannopoulos, G et al : Electrophoretic diversity of glucose-6-phosphate dehydrogenase among Greeks. Am J Hum Genet 22:587, 1970.

5. Carson, PE and Frischer, H : Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and related disorders of the pentose phosphate pathway. Am J Med 41:774, 1966.

6. Brewer, GJ et al : The methemoglobin reduction test for primaquine-type sensitivity of erythrocytes : a simplified procedure for detecting a specific hypersusceptibility to drug hemolysis. J A M A 180:386, 1962.

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

8. Beutler, E and Mitchell, M : Special modifications of the fluorescent screening method for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Blood 32:816, 1968.

9. Flatz, G and Tantachamroon, T : Glucose-6-phosphate dehydrogenase in the population of Northern Thailand. Human Genetik 10:335, 1970.

Bull Chiang Mai AMS
Vol 14, No 3, September 1981.

A B S T R A C T

COMPARISON OF THE METHYLENE BLUE REDUCTION AND FLUORESCENT SPOT TEST IN THE DETECTION OFG-6-PD DEFICIENCY.

Orapin Chaiyarasamee BS, MT(ASCP)*
Suraporn Matragoon BS, MS*

It was later found that G-6-PD deficiency had a widespread racial and geographic distribution. Drug-induced hemolytic anemia due to F-6-PD deficiency has a high frequency among Caucasians and Orientals. These non-Negro type deficient individuals are more susceptible to hemo lysis following ingestion of several drugs and fava beans.The detection of G-6-PD deficiency level in essential for the differential diagnosis from hemolytic diseases with other causes.

Several screening tests are developed for the diagnosis of G-6-PD deficiency. Most demonstrate the presence or absence of G-6-PD by testing the ability of the red cells to generate NADPH from NADP, a reaction which directly depends on the availability of G-6-PD. The two methods using for the comparison in this study are Methemoglobin reduction test (MB) and Fluorescent spot test (FS).

The detection of G-6-PD level by the methods of MB and FS has been performed in EDTA blood specimens from 243 males and 261 females. No correlation between the two methods was achieved with a correlation coefficient of 0.04 in male and 0.03 in female subjects.

The normal level of G-6-PD detected from these subjects were 86.0 % in males and 93.1 % in females by Methylene blue reduction test. The Fluorescent spot test demonstrated normal G-6-PD of 77.0 % in males and 88.1 in females.

The Fluorescent spot test tends to be a useful specific test

* Department of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University.

applied to screening for G-6-PD deficiency states. The advantage of this method is the elimination of time consuming, fresh blood specimens and the need of special equipments.