

การกำหนดช่วงอ้างอิงของการทดสอบ Dihydrorhodamine 123 โดยใช้เครื่อง BD FACSLyric ในประเทศไทย สำหรับการวินิจฉัยโรค Chronic Granulomatous Disease

ณิกานต์ นาคประดิษฐ์* วุฒิไกร คงแสนคำ และ จารุภา สูงสถิตานนท์

ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

โรค chronic granulomatous disease (CGD) เป็นความบกพร่องทางภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดที่เกิดจากความผิดปกติของเอนไซม์ NADPH oxidase ส่งผลให้ร่างกายไม่สามารถสร้างสารอนุมูลอิสระในช่วง oxidative burst ซึ่งกลไกนี้มีความจำเป็นอย่างยิ่งในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ทำให้มีการติดเชื้อซ้ำและเกิดแกรนูโลมา (granuloma) ในหลายอวัยวะของร่างกาย การทดสอบมาตรฐานที่ช่วยในการวินิจฉัยโรค CGD คือ ไดไฮโดรโรดามีน 123 (dihydrorhodamine 123; DHR assay) ด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมตรีซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็ว ง่ายและมีความไวสูง การทดสอบนี้ให้บริการโดยห้องปฏิบัติการทางด้านเซลล์และอนุชีววิทยา ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลมานานกว่า 10 ปี แต่ไม่เคยมีรายงานถึงค่าอ้างอิงในกลุ่มประชากรไทย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อกำหนดช่วงอ้างอิงของการทดสอบ DHR assay ด้วยเครื่อง BD FACSLyric สำหรับใช้เป็นแนวทางในการแปลผลทางห้องปฏิบัติการ โดยรวบรวมผลการตรวจวิเคราะห์จากตัวอย่างคนปกติ จำนวน 285 ราย ระหว่างปี พ.ศ. 2562-2566 ผลการศึกษาพบว่า ช่วงอ้างอิง (2.5^{th} - 97.5^{th} percentiles) ของค่า stimulation index (SI) อยู่ในช่วง 105-304 ค่ามัธยฐานของความเข้มการเรืองแสง (median fluorescence intensity; MFI) ของตัวอย่าง unstimulated อยู่ในช่วง 12-39 และของตัวอย่าง PMA-stimulated อยู่ในช่วง 2,631-6,664 โดยกำหนดค่า SI เท่ากับ 105 ซึ่งเป็นค่าที่ตำแหน่ง 2.5^{th} percentile เป็นค่า cut-off สำหรับการแปลผล เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วย พบว่าการทดสอบ DHR assay มีความไว 100% และความจำเพาะ 97.5% นอกจากนี้ยังพบรูปแบบความผิดปกติของผลการทดสอบในผู้ป่วยซึ่งช่วยสนับสนุนการวินิจฉัยโรค CGD ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: ไดไฮโดรโรดามีน 123, Chronic granulomatous disease, DHR assay

*ผู้นิพนธ์หลัก: nichakarn_ni@hotmail.com

วันที่ส่ง: 19 ธันวาคม 2568

วันที่แก้ไข: 4 พฤษภาคม 2569

วันที่ตอบรับ: 5 พฤษภาคม 2569



Establishment of Reference Interval of Dihydrorhodamine 123 Assay Using the BD FACSLyric in Thai population for Diagnosis of Chronic Granulomatous Disease

Nichakarn Narkpradit*, Wuttikrai Kongsankum and Jarupa Soongsathitanon

Department of Immunology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Abstract

Chronic granulomatous disease (CGD) is a primary immunodeficiency caused by defects in the NADPH oxidase complex. This impairment inhibits the generation of reactive oxygen species (ROS) during the oxidative burst, a process essential for eliminating bacterial and fungal pathogens. The main clinical features of the disease are recurrent infections and granulomatous formation in various organs. The flow cytometric dihydrorhodamine 123 (DHR) assay is a standard method for evaluating oxidative burst activity and is widely utilized to support CGD diagnosis. This method is rapid, simple to perform, and highly sensitive. In the Cellular and Molecular Biology Laboratory, Department of Immunology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, the DHR assay has been used as a diagnostic test for CGD for decade, however, reference values have not yet been established or reported. This study aimed to establish reference values for DHR assay using the BD FACSLyric flow cytometry to support accurate laboratory interpretation. Data were collected from 285 healthy individuals between 2019 to 2023. The reference interval (2.5th-97.5th percentiles) for the stimulation index (SI) ranged from 105 to 304. The median fluorescence intensity (MFI) of unstimulated samples ranged from 12 to 39, while PMA-stimulated samples ranged from 2,631 to 6,664. The SI cut-off value was defined as 105, corresponding to the 2.5th percentile. Using this cut-off, the DHR assay demonstrated a sensitivity of 100% and a specificity of 97.5%. Furthermore, abnormal DHR patterns have been observed in the patients, which effectively support the diagnosis of CGD.

Keywords: Dihydrorhodamine 123, chronic granulomatous disease, DHR assay

*Corresponding author: nichakarn_ni@hotmail.com

Received date: December 19, 2025

Revised date: May 4, 2026

Accepted date: May 5, 2026

1. บทนำ

โรค chronic granulomatous disease (CGD) จัดอยู่ในกลุ่มโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องปฐมภูมิ (primary immunodeficiency; PID) มีสาเหตุจากการบกพร่องของ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase complex ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดฟาโกไซต์ (phagocyte) ทำให้ไม่สามารถสร้าง reactive oxygen species (ROS) ในการทำลายจุลชีพแบคทีเรียและเชื้อราเมื่อเข้ามาอยู่ภายในเซลล์ สำหรับจุลชีพที่เป็นสาเหตุมักเป็นเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราชนิดที่สร้างเอนไซม์ catalase เช่น *Aspergillus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia cepacia*, *Nocardia* spp. และ *Salmonella* spp. เป็นต้น^(1-4, 12-14) โรคนี้สามารถถ่ายทอดพันธุกรรมได้ 2 แบบ ประกอบด้วย แบบ X-linked recessive พบได้ประมาณร้อยละ 70 ของผู้ป่วย CGD และแบบ Autosomal recessive พบได้ประมาณร้อยละ 30⁽¹⁻²⁾

โรค CGD เป็นโรคที่พบน้อย โดยมีรายงานอุบัติการณ์ทั่วโลกประมาณ 1 ต่อ 250,000 การเกิดมีชีพ⁽⁵⁾ สำหรับประเทศไทยยังไม่มีรายงานอุบัติการณ์ระดับประชากรอย่างเป็นระบบ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในกลุ่มโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องปฐมภูมิในเด็กไทย พบผู้ป่วย CGD ประมาณร้อยละ 8 ของผู้ป่วย PID ที่ได้รับการวินิจฉัย⁽⁶⁾ ซึ่งมีสัดส่วนใกล้เคียงกับข้อมูลจากต่างประเทศ กล่าวคือ การศึกษาในภูมิภาคเอเชีย เช่น ประเทศจีนพบประมาณร้อยละ 6.25⁽⁷⁾ และประเทศอินเดียประมาณร้อยละ 4⁽⁸⁾ ขณะที่ประเทศในทวีปยุโรป เช่น ประเทศอิตาลีพบร้อยละ 4-5 ของผู้ป่วย PID⁽⁹⁾ ผู้ป่วยโรค CGD มักได้รับการวินิจฉัยตั้งแต่วัยเด็ก โดยอาการมักปรากฏตั้งแต่ช่วงแรกเกิดจนถึงวัยเด็กตอนต้นและประมาณร้อยละ 80-90 ของผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยก่อนอายุ 5 ปี⁽⁵⁾ อาการทางคลินิกที่สำคัญ ได้แก่ การติดเชื้อซ้ำของแบคทีเรียและเชื้อรา การติดเชื้อเรื้อรังที่ต่อมน้ำเหลืองเกิดเป็นฝีหนองตามผิวหนังหรือในเนื้อเยื่อชั้นลึกและอวัยวะภายใน โดยอาการทางคลินิกที่แสดงออกจะมีตั้งแต่เล็กน้อยไปจนถึงขั้นรุนแรงซึ่งในผู้ป่วย X-linked CGD มักจะพบอาการรุนแรงของโรคได้ตั้งแต่วัยเด็ก⁽¹⁰⁻¹¹⁾

สำหรับการวินิจฉัยโรค CGD ในอดีตนิยมใช้การย้อมฟาโกไซด์ด้วยสารไนโตรบลูเตตราโซเลียม (nitroblue tetrazolium; NBT slide test) ซึ่งมีคุณสมบัติในการเปลี่ยนเป็นตะกอนสีน้ำเงินเมื่อเกิดปฏิกิริยารีดักชันกับสารซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide) หนึ่งใน ROS ที่เกิดขึ้นเมื่อมีการกระตุ้นด้วย PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) โดยการวินิจฉัยความผิดปกติจะอาศัยการนับจำนวนฟาโกไซด์ที่มีตะกอนสีน้ำเงินบนแผ่นฟิล์มเลือด (blood slide) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นคำนวณเป็นร้อยละต่อจำนวนของฟาโกไซด์ทั้งหมด ประชากรปกติจะมีจำนวนฟาโกไซด์ที่เกิดตะกอนสีน้ำเงินภายหลังการกระตุ้นด้วย PMA ร้อยละ 90-100 ส่วนผู้ที่ป่วยเป็นพาหะเพศหญิงจะพบการเปลี่ยนแปลงลดลงเหลือร้อยละ 30-70 ในขณะที่ผู้ป่วย CGD ที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ X-linked recessive จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงนี้ นอกจากนี้วิธี NBT slide test ไม่สามารถช่วยจำแนกโรค CGD ในผู้ป่วยที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ Autosomal recessive ได้เนื่องจากจะยังเห็นตะกอนสีน้ำเงินในฟาโกไซด์แต่มีปริมาณที่ลดลง ดังนั้นร้อยละของฟาโกไซด์ที่มีการเปลี่ยนแปลงจึงอยู่ในเกณฑ์ปกติ อีกทั้ง NBT slide test ยังใช้เวลาในการทำทดสอบนาน ต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญและสามารถทำให้เกิดผลบวกปลอมหรือผลลบปลอมได้⁽¹¹⁻¹³⁾

ในปัจจุบันการใช้สีย้อมไดไฮโดรโรดามีน 123 (Dihydrorhodamine 123; DHR assay) ถือเป็นมาตรฐานในการวินิจฉัยโรค CGD อีกวิธีหนึ่ง โดยสาร ROS โดยเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่เกิดขึ้นภายในฟาโกไซด์ที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA จะทำปฏิกิริยากับสารไดไฮโดรโรดามีน 123 เกิดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์สีเขียว-เหลืองที่วัดได้โดยใช้เครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ เพื่อนับจำนวนเซลล์ที่เกิดสารเรืองแสงนี้เทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น การใช้สัญญาณจากฟลูออเรสเซนส์จะถูกวัดด้วยเซ็นเซอร์ในเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์แทนการนับด้วยตาผ่านกล้องจุลทรรศน์ช่วยเพิ่มความไวในการตรวจวิเคราะห์ และปริมาณเซลล์ที่ถูกวัดจะมีจำนวนมากกว่าการนับบนแผ่นฟิล์มเลือด นอกจากนี้ DHR assay สามารถบอกได้ถึงชนิดของความผิดปกติทางพันธุกรรมในโรค CGD จากรูปแบบของกราฟฮิสโตแกรมที่เกิดจากความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์และความเข้มของการเรืองแสง (fluorescence intensity) เกิดเป็นรูปแบบแตกต่างกันระหว่างชนิด X-linked CGD, พาหะของ X-linked CGD และ autosomal recessive CGD⁽¹¹⁻¹⁵⁾ ซึ่งการทราบถึงชนิดของความผิดปกติจะช่วยเป็นแนวทางในการค้นหาความผิดปกติในระดับยีนและช่วยเป็นข้อมูลประกอบในการให้คำแนะนำปรึกษาทางด้านพันธุกรรมให้กับครอบครัวของผู้ป่วยได้

DHR assay เป็นวิธีการทดสอบมาตรฐานที่ได้การยอมรับอย่างแพร่หลายในการวินิจฉัยโรค CGD จากรายงานการศึกษาในต่างประเทศพบว่าค่า stimulation index (SI) ของกลุ่มคนปกติจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง BD FACSCalibur มีค่ามัธยฐาน 39.7 ± 13.8 (IQR: 32.0-50.6)⁽¹²⁾ ขณะที่การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง BD FACSsort มีค่าเฉลี่ย 158.7 ± 65 ⁽¹⁶⁾ อย่างไรก็ตามค่าอ้างอิงดังกล่าวอาจแตกต่างกันไปตามลักษณะประชากรและชนิดของเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ สำหรับข้อมูลค่าอ้างอิงในการวินิจฉัยโรค CGD ด้วยเทคนิค DHR assay ในประเทศไทยยังมีจำกัด การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ

กำหนดช่วงอ้างอิงของการทดสอบ DHR assay จากกลุ่มคนปกติโดยใช้เครื่อง BD FACSLyric ซึ่งเป็นเครื่องที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ด้วยหลักการฟลูออโรไซโตเมทรีที่พบได้แพร่หลายในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ของประเทศไทย รวมทั้งวิเคราะห์ผลการทดสอบในผู้ป่วยที่สงสัยโรค CGD เพื่อสนับสนุนการแปลผลให้มีความถูกต้องและแม่นยำมากยิ่งขึ้น

2. วัสดุและวิธีการ

2.1 กลุ่มตัวอย่าง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาย้อนหลัง (retrospective study) จากผลการทดสอบ DHR assay ของห้องปฏิบัติการทางด้านเซลล์และอณูชีววิทยา ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ระหว่างปี พ.ศ. 2562-2566 จำนวนทั้งสิ้น 573 ราย ซึ่งประกอบไปด้วย กลุ่มบุคคลปกติ (normal controls) จำนวน 285 ราย และกลุ่มผู้ป่วยที่แพทย์สงสัยโรค CGD จำนวน 288 ราย การศึกษาได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล เลขที่ใบรับรอง COA no. Si 061/2024 ลงวันที่ 23 มกราคม พ.ศ. 2567

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัคร (Inclusion criteria)

- ผลการทดสอบ DHR assay ของบุคคลปกติ (normal control) ซึ่งไม่มีประวัติโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือการติดเชื้อฉวยโอกาส ไม่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันในช่วง 1 เดือนก่อนการตรวจโดยตัวอย่างดังกล่าวไม่จำกัดเพศและอายุ
- ผลการทดสอบ DHR assay ของผู้ป่วยที่แพทย์สงสัยเป็นโรค CGD โดยไม่จำกัดเพศและอายุ

เกณฑ์การคัดออกอาสาสมัคร (Exclusion criteria)

- ผู้ที่มีผลการทดสอบ DHR assay มากกว่า 1 ครั้ง โดยเลือกเฉพาะผลการทดสอบครั้งแรกมาใช้ในการวิเคราะห์

2.2 ไคไฮโดรโรตามีน 123 (DHR assay)

การทดสอบ DHR assay ดำเนินการโดยดัดแปลงจากวิธีของ Vowells S.J. และคณะ⁽¹⁶⁾ ตัวอย่างเลือดเก็บในหลอดที่มี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งจะถูกเตรียมใน 2 สภาวะ ได้แก่ หลอดที่ไม่ได้กระตุ้น (unstimulated) และหลอดที่กระตุ้นด้วย phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA stimulated) โดยเติมเลือดปริมาตร 100 μ L ผสมกับ 4 mL lysing solution [155 mM NH_4Cl , 20 mM NaHCO_3 และ 1 mM EDTA (pH8.0)] จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่แรง 350 $\times$ g ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 5 นาที ก่อนเทส่วน supernatant ที่ทิ้งและล้างตะกอนเม็ดเลือดขาวด้วย Hank's balanced salt solution (HBSS) ที่ปราศจากแคลเซียมและแมกนีเซียม ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free HBSS)

หลังจากนั้นเติมสาร DHR (Molecular probes, USA) ปริมาตร 1.8 μ L [(ความเข้มข้น 29 $\mu\text{mol/L}$) ที่มี catalase ความเข้มข้น 1,000 U/mL] และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม PMA ที่ความเข้มข้น 6.5×10^2 nmol/L ในหลอดกระตุ้น บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องฟลูออโรไซโตมิเตอร์

2.3 ฟลูออโรไซโตเมทรี

ตัวอย่างทั้งหมดถูกวิเคราะห์โดยเครื่องฟลูออโรไซโตมิเตอร์ รุ่น BD FACSLyric (BDIS, San Jose, USA) ด้วยโปรแกรม FACSsuite acquisition and application software ซึ่งก่อนทำการทดสอบจะต้องทำการ calibrate เครื่องด้วย CS&T bead ทุกครั้ง การวิเคราะห์ข้อมูลจะเก็บทั้งหมด 50,000 event ต่อ 1 ตัวอย่าง การกระจายตัวของประชากรเม็ดเลือดขาวแสดงในรูปแบบแผนภาพการกระจาย (dot plot) โดยแกน X แทนค่า FSC (forward scatter) และแกน Y แทนค่า SSC (side scatter) และกำหนดขอบเขตการเลือก (gate) ที่ตำแหน่งของเซลล์นิวโทรฟิล สำหรับการเกิด oxidative burst จะแสดงผลในรูปแบบกราฟฮิสโตแกรม โดยแกน X แทนค่า สัญญาณความเข้มของการเรืองแสง (fluorescence intensity) ของ DHR (PE-A) ภายหลังถูกกระตุ้นด้วย PMA ขณะที่แกน Y แทนค่า จำนวนเซลล์ (events/count)

ค่า Stimulation index (SI) คำนวณได้ ดังนี้

$$\text{Stimulation index (SI)} = \frac{\text{median fluorescence intensity ของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA}}{\text{median fluorescence intensity ของเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น}}$$

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้งหมดดำเนินการจากข้อมูลกลุ่มคนปกติ โดยนำเสนอเป็นช่วงอ้างอิง (reference interval) ของค่ามัธยฐานของความเข้มการเรืองแสง (median fluorescence intensity; MFI) สำหรับตัวอย่าง unstimulated, ตัวอย่าง PMA-stimulated รวมถึงค่า SI เนื่องจากข้อมูลมีการแจกแจงแบบไม่ปกติ (non-normal distribution) จึงใช้วิธี Interquartile range method ซึ่งคำนวณจากสูตร $Q1-1.5$ (IQR) และ $Q3+1.5$ (IQR) ในการตรวจสอบข้อมูลผิดปกติ (outliers/extreme value) เพื่อให้ข้อมูลมีความเหมาะสม และคำนวณหาช่วงอ้างอิงด้วยวิธี percentile-based โดยกำหนดขอบเขตเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 2.5 และ 97.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics version 25.0 นอกจากนี้ได้ทำการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation; %CV) เพื่อประเมินความแปรปรวนของข้อมูลในกลุ่มตัวอย่าง

3. ผลการศึกษา

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ประกอบด้วยกลุ่มคนปกติ (normal controls) จำนวน 285 ราย ซึ่งใช้สำหรับกำหนดค่าอ้างอิงของห้องปฏิบัติการ กลุ่มดังกล่าวไม่มีข้อมูลเพศและอายุถูกบันทึกไว้ และกลุ่มผู้ป่วยที่แพทย์สงสัยโรค CGD จำนวน 288 ราย มีอายุมัธยฐาน 5 ปี (IQR 1-14 ปี) ประกอบด้วยเพศชาย 147 คน (ร้อยละ 51.04) และเพศหญิง 141 คน (ร้อยละ 48.96)

เมื่อนำค่า MFI ของตัวอย่าง unstimulated และ PMA-stimulated รวมถึงค่า SI จากกลุ่มคนปกติมาตรวจสอบการกระจายของข้อมูลและค่าผิดปกติ (outlier) ด้วยวิธี IQR และแสดงผลด้วยภาพ box plot (Fig. 1) พบว่ามีข้อมูลบางค่าอยู่ในช่วง outlier แต่มีจำนวนไม่มากและไม่พบข้อบ่งชี้ถึงความผิดปกติของข้อมูล ดังนั้นข้อมูลทั้งหมดจึงถูกนำมาคำนวณหาช่วงอ้างอิง (reference interval)

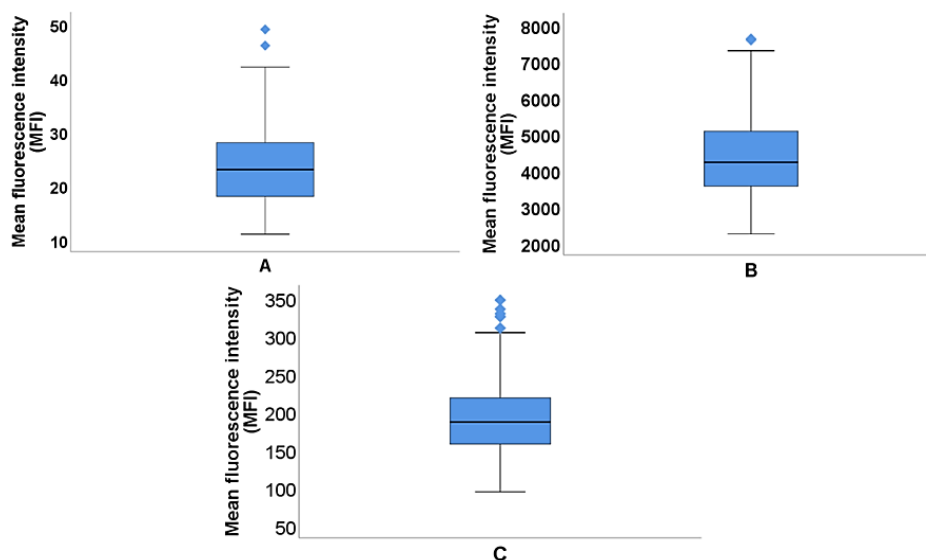


Fig. 1 Box plots showing the distribution of median fluorescence intensity (MFI) during the oxidative burst in normal controls. (A) Unstimulated MFI; (B) PMA-stimulated MFI; and (C) Stimulation Index (SI). Statistical outliers were identified based on the interquartile range method.

ช่วงอ้างอิงคำนวณโดยใช้วิธี non-parametric percentile method (2.5th-97.5th percentiles) ตามแนวทางของ CLSI (C28-A3) ผลการวิเคราะห์พบว่า ค่า MFI ของตัวอย่าง unstimulated มีช่วงอ้างอิง 12-39 ค่า MFI ของตัวอย่าง PMA-

stimulated มีช่วงอ้างอิง 2,631-6,664 และค่า SI มีช่วงอ้างอิง 105-304 ดังแสดงใน Table 1 จากนั้นจึงกำหนดค่า SI เท่ากับ 105 ซึ่งเป็นค่า lower limit (2.5th percentile) เป็นค่า cut-off สำหรับการแปลผล โดยค่าที่มี SI $\geq$ 105 จัดเป็นผลปกติ ขณะที่ค่า SI $<$ 105 จัดเป็นผลผิดปกติ

Table 1 Median, interquartile Range (IQR), and reference intervals for MFI and stimulation index (SI) in normal controls.

Parameter	Median	IQR	2.5 th percentile	97.5 th percentile
unstimulated MFI	23	11	12	39
PMA-stimulated MFI	4,218	1,528	2,631	6,664
Stimulation index (SI)	186	62	105	304

เมื่อประเมินประสิทธิภาพของค่า SI cut-off ที่ 105 สำหรับการวินิจฉัยโรค CGD โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่มีผลผิดปกติ พบว่าการทดสอบ DHR assay จากเครื่อง BD FACSLyric มีความไว (sensitivity) 100% และมีความจำเพาะ (specificity) 97.5% ค่าความจำเพาะที่ลดลงสัมพันธ์กับการพบผลบวกложว (false positive) ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น สภาพสิ่งส่งตรวจไม่เหมาะสม ชนิดของสารกันเลือดแข็ง EDTA มีผลต่อค่า oxidative burst ของนิวโทรฟิลในตัวอย่างคนปกติ บางราย ทำให้พบค่า SI ต่ำกว่า 105 ทั้งนี้ การยืนยันผลการทดสอบสามารถพิจารณาาร่วมกับรูปแบบกราฟฮิสโตแกรมเพื่อเพิ่มความถูกต้องและความแม่นยำมากยิ่งขึ้น และเมื่อคำนวณค่า %CV ของ SI พบว่า เท่ากับ 24.61% ซึ่งบ่งชี้ถึงความแปรปรวนของข้อมูลประชากรที่ศึกษา

นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษารูปแบบของกราฟฮิสโตแกรมผลการทดสอบ DHR assay ของผู้ป่วยระหว่างปี พ.ศ. 2562-2566 พบผู้ป่วยที่มีลักษณะผิดปกติทั้งหมด 7 ราย ประกอบด้วย X-linked CGD จำนวน 3 ราย autosomal recessive CGD จำนวน 3 ราย และพาหะของ X-linked CGD จำนวน 1 ราย นอกจากนี้ยังพบมารดาของผู้ป่วยจำนวน 2 รายที่มีลักษณะฮิสโตแกรมผิดปกติ โดยตัวอย่างลักษณะของฮิสโตแกรมแสดงดัง (Fig. 2)

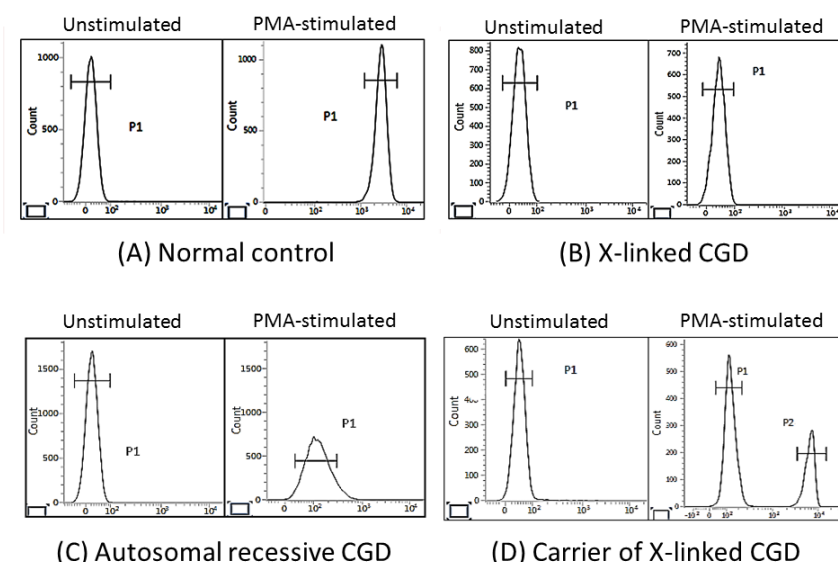


Fig. 2 Representative histograms of DHR assay patterns. (A) Normal control demonstrating a marked rightward shift in fluorescence after PMA stimulation; (B) X-linked CGD showing an absent oxidative burst with no shift after stimulation; (C) Autosomal recessive CGD demonstrating reduced oxidative burst activity; and (D) X-linked CGD carrier showing a bimodal distribution, representing two distinct neutrophil populations.

ลักษณะฮิสโตแกรมของตัวอย่างคนปกติแสดงดัง (Fig. 2A) เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย PMA พบว่าตำแหน่งสูงสุด (peak) ของค่า MFI เลื่อนไปทางด้านขวา แสดงถึงความสามารถในการสร้าง ROS ในกระบวนการ oxidative burst ได้ตามปกติ ส่วนในผู้ป่วย X-linked CGD (Fig. 2B) peak ของค่า MFI อยู่ใกล้เคียงกับตัวอย่างที่ไม่ได้รับการกระตุ้น แสดงถึงความสามารถในการสร้าง ROS อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่ผู้ป่วย autosomal recessive CGD (Fig. 2C) peak ของค่า MFI เลื่อนไปทางด้านขวาเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างคนปกติ สะท้อนถึงความสามารถในการสร้าง ROS ที่ลดลงแต่ยังคงเหลือการทำงานอยู่บางส่วน สำหรับฮิสโตแกรมของกลุ่มพาหะ X-linked CGD (Fig. 2D) peak ของค่า MFI แบ่งออกเป็นเซลล์ได้สองกลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มของนิวโทรฟิลที่ไม่สามารถสร้าง ROS ได้ และกลุ่มที่ยังสามารถสร้าง ROS ได้ตามปกติ รายละเอียดทางคลินิกของผู้ป่วยที่มีผล DHR assay ผิดปกติจำนวน 7 ราย รวมทั้งมารดาของผู้ป่วย 2 ราย แสดงดัง Table 2

Table 2 Clinical characteristics of patients with abnormal DHR assay results.

Patient No.	Sex	Age	Clinical Features	Stimulation Index (SI)	DHR assay histogram result
No. 1	Male	1 year	Recurrent infection, Submandibular abscess, Pneumonia (mycoplasma), Subacute fever+splenomegaly	2	X-linked CGD
No. 2	Male	3 years	Recurrent pneumonia, Lymphadenitis, Perianal abscess	1	X-linked CGD
No. 3	Male	5 months	Pulmonary TB, Severe unusual recurrent infection	2	X-linked CGD
No. 4	Female	11 years	Catalase positive bacteria (<i>S. aureus</i>) Recurrent infection	39	Autosomal recessive CGD
No. 5	Female	10 years	Recurrent infection, Pulmonary TB, Abscess right foot	19	Autosomal recessive CGD
No. 6	Female	14 years	Recurrent infection, Prolong fever for 12 weeks, Liver abscess	7	Autosomal recessive CGD
No. 7	Female	5 years	Chronic Diarrhea, MDS (GATA mutation) Invasive pulmonary aspergillosis	1/147	Carrier of X-linked CGD
No. 8	Female	29 years	No Clinical manifestation	2/269	Carrier of X-linked CGD
No. 9	Female	29 years	No Clinical manifestation	3/154	Carrier of X-linked CGD

No. 1-6 are patients who were abnormal in DHR assay. No. 8 and No. 9 are mothers of the patient No. 2 and No. 3).

Abbreviation: TB = tuberculosis, MDS = Myelodysplastic Syndrome

จาก Table 2 พบว่าผู้ป่วยรายที่ 1-6 มีค่า SI ต่ำกว่าค่าของคนปกติอย่างชัดเจน โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่แสดงลักษณะฮิสโตแกรมแบบ X-linked CGD อย่างไรก็ตาม ในผู้ป่วยที่แสดงลักษณะฮิสโตแกรมแบบ autosomal recessive CGD พบค่า SI เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ขณะที่ผู้ป่วยรายที่ 7 แสดงลักษณะฮิสโตแกรมแบบ bimodal pattern คล้ายพาหะ X-linked CGD โดยมีค่า SI สองค่า (ต่ำและสูง) บ่งบอกถึงการมีเซลล์นิวโทรฟิลสองกลุ่มที่มีความสามารถในการสร้าง ROS แตกต่างกัน

นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้รวบรวมข้อมูลอาการสำคัญทางคลินิกของผู้ป่วย (n = 288) จากใบปรึกษาแพทย์ที่ส่งตรวจ DHR assay เพื่อแสดงลักษณะอาการที่พบบ่อยในผู้ป่วยที่สงสัยโรค CGD โดยสรุปดัง Table 3

Table 3 Clinical characteristics and prevalence of suspected abnormal DHR results based on clinical consultation (n = 288).

Clinical characteristics	Percentage
Abscess and Recurrent infection	37
Fever	16
TB	12
Lymphadenitis	10
Recurrent pneumonia and Septicemia	8
Diarrhea and Osteomyelitis	2
Bone marrow transplantation	1
Other (ex. Crohn's disease, gastroenteritis, hypothyroidism, CA nasopharynx)	14

จาก Table 3 พบว่าอาการที่พบบ่อยในผู้ป่วยที่สงสัยโรค CGD ได้แก่ การเกิดฝีและติดเชื้อซ้ำ (37%) รองลงมา ได้แก่ อาการไข้ (16%) และวัณโรค (12%) ผลดังกล่าวสะท้อนถึงลักษณะการติดเชื้อที่พบบ่อยในผู้ป่วย CGD ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญที่สนับสนุนการพิจารณาการส่งตรวจ DHR assay เพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรค

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดสอบ

จากการศึกษาครั้งนี้ได้กำหนดช่วงอ้างอิงของการทดสอบ DHR assay สำหรับห้องปฏิบัติการด้วยเครื่อง BD FACSLyric พบว่าค่า SI อยู่ในช่วง 105-304 (2.5th-97.5th percentiles) โดยมีแนวโน้มสอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ใช้เครื่อง BD FACSort ซึ่งมีค่าเฉลี่ย SI เท่ากับ $158.7 \pm 65^{(16)}$ แม้ว่าค่า SI อาจแตกต่างกันไปตามชนิดของเครื่องและลักษณะประชากรที่ศึกษา

เมื่อประเมินประสิทธิภาพของค่า SI cut-off ที่ 105 (2.5th percentile) พบว่า DHR assay มีความไว 100% และมีความจำเพาะ 97.5% แสดงถึงความสามารถในการสนับสนุนการวินิจฉัยโรค CGD ในเบื้องต้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตาม พบผลบวกปลอมในบางตัวอย่างซึ่งอาจสัมพันธ์กับปัจจัยทั้งก่อนและระหว่างการทดสอบ เช่น การเก็บและขนส่งตัวอย่างที่ไม่เหมาะสม คุณภาพของสิ่งส่งตรวจ ชนิดของสารกันเลือดแข็ง รวมถึงการดำเนินการทดสอบที่ล่าช้า นอกจากนี้ พบว่า %CV ของค่า SI ในกลุ่มคนปกติ เท่ากับ 24.61% สะท้อนถึงความแปรปรวนของข้อมูลประชากร โดยอาจเกิดจากความแตกต่างทางชีวภาพของแต่ละบุคคล (biological variation) หรือ inter-assay variability ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยน lot ของน้ำยา การ calibrate เครื่องมือในแต่ละวัน และความแตกต่างของผู้ปฏิบัติงาน

ขณะเดียวกัน ลักษณะของฮิสโตแกรมจากการตรวจ DHR assay สามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการแปลผลการตรวจได้⁽¹⁷⁾ โดยผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าลักษณะฮิสโตแกรมมีความสอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ อย่างไรก็ตาม การแปลผลการทดสอบ DHR assay ไม่ควรพิจารณาค่าใดค่าหนึ่งเพียงอย่างเดียว แต่ควรพิจารณาร่วมกันทั้งค่า SI ลักษณะของฮิสโตแกรม และข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย ทั้งนี้การยืนยันการวินิจฉัยควรอาศัยผลการตรวจทางพันธุกรรมร่วมด้วย เนื่องจากภาวะบางอย่างที่มีผลต่อการพัฒนาและการทำงานของนิวโทรฟิลอาจส่งผลต่อการทดสอบดังกล่าว กรณีผู้ป่วยรายที่ 7 จาก Table 2 พบลักษณะฮิสโตแกรมคล้ายแบบพาหะ X-linked CGD ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน GATA⁽¹⁸⁾

การศึกษาครั้งนี้มีข้อจำกัดบางประการ ประการแรก เนื่องจากการศึกษาย้อนหลังจากข้อมูลภายในห้องปฏิบัติการ จึงไม่สามารถควบคุมปัจจัยบางประการได้ เช่น ไม่พบข้อมูลเพศและอายุของกลุ่มตัวอย่างคนปกติซึ่งอาจมีผลต่อการตีความผลการศึกษาและไม่สามารถประเมินความแตกต่างของค่าที่ศึกษาตามช่วงอายุได้ ประการที่สอง จำนวนตัวอย่างผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น CGD และพาหะมีจำนวนค่อนข้างจำกัด เนื่องจากเป็นโรคที่พบได้ไม่บ่อย ประการที่สาม คือ การศึกษา

ดำเนินการในห้องปฏิบัติการแห้งเดียวและใช้เครื่องโพลไซโตมิเตอร์รุ่นเดียว อย่างไรก็ตาม ทำให้มีข้อจำกัดในการนำช่วงอ้างอิงไปประยุกต์ใช้กับห้องปฏิบัติการที่ใช้เครื่องมือหรือเงื่อนไขการทดสอบที่แตกต่างกัน

นอกจากนี้ ปัจจัยก่อนการวิเคราะห์ เช่น ชนิดของสารกันเลือดแข็งมีผลต่อการทดสอบ โดยมีรายงานว่าสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA ส่งผลต่อการกระตุ้นนิวโทรฟิลในกระบวนการ oxidative burst⁽¹⁹⁾ ทั้งนี้การศึกษาที่แสดงว่า สามารถใช้เลือดที่เก็บใน EDTA สำหรับการตรวจ DHR assay ได้หากทำการวิเคราะห์ภายในเวลา 6 ชั่วโมงหลังเก็บตัวอย่าง⁽²⁰⁾

โดยสรุปผลการศึกษารั้วนี้ได้ให้ข้อมูลเกี่ยวกับค่าอ้างอิงและลักษณะของฮิสโตแกรมของ DHR assay ซึ่งเป็นประโยชน์ในการแปลผลการตรวจและช่วยสนับสนุนในการวินิจฉัยโรค CGD สำหรับห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

1. Saleem N, Ahmed TA, Bashir M. Chronic granulomatous disease. JPMA 2016; 66: 97-100.
2. Lemaigre C, Suarez F, Martellosio JP, *et al.* Late Onset of Chronic Granulomatous Disease Revealed by Paecilomyces lilacinus Cutaneous Infection. JCI 2022; 42: 60-3. <https://doi.org/10.1007/s10875-021-01140-1>.
3. Arnold DE, Heimall JR. A Review of Chronic Granulomatous Disease. Adv Ther 2017; 34: 2543-57. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0636-2>.
4. Kutluğ Ş, Şensoy G, Birinci A, *et al.* Seven chronic granulomatous disease cases in a single-center experience and a review of the literature. Asian Pac J Allergy Immunol 2018; 36: 35-41. <https://doi.org/10.12932/ap0859>.
5. Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB, *et al.* Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. Medicine 2000; 79: 155-69. <https://doi.org/10.1097/00005792-200005000-00003>.
6. Benjasupattananan P, Simasathien T, Vichyanond P, *et al.* Clinical characteristics and outcomes of primary immunodeficiencies in Thai children: an 18-year experience from a tertiary care center. J Clin Immunol 2009; 29: 357-64. <https://doi.org/10.1007/s10875-008-9273-5>.
7. Wu J, Zhong W, Yin Y, *et al.* Primary immunodeficiency disease: a retrospective study of 112 Chinese children in a single tertiary care center. BMC Pediatr 2019; 19: 410. <https://doi.org/10.1186/s12887-019-1729-7>.
8. Chinnabhandar V, Yadav SP, Kaul D, *et al.* Primary immunodeficiency disorders in the developing world: data from a hospital-based registry in India. Pediatr Hematol Oncol 2014; 31: 207-11. <https://doi.org/10.3109/08880018.2013.805346>.
9. Lougaris V, Pession A, Baronio M, *et al.* The Italian Registry for Primary Immunodeficiencies (Italian Primary Immunodeficiency Network; IPINet): Twenty years of experience (1999-2019). J Clin Immunol 2020; 40: 1026-37. <https://doi.org/10.1007/s10875-020-00844-0>.
10. Chiriaco M, Salfa I, Ursu GM, *et al.* Immunological aspects of X-Linked chronic granulomatous disease female carriers. Antioxidants (Basel, Switzerland) 2021; 10. <https://doi.org/10.3390/antiox10060891>.
11. Yu JE, Azar AE, Chong HJ, *et al.* Considerations in the diagnosis of chronic granulomatous disease. J Pediatric Infec Dis Soc 2018; 7 (suppl 1): S6-S11. <https://doi.org/10.1093/jpids/piy007>.
12. Sanabria D, Giménez V, Martínez de Cuéllar C, *et al.* Chronic granulomatous disease. Diagnosis by the dihydrorhodamine assay. Revista Chilena de Pediatría 2020; 91: 19-26. <https://doi.org/10.32641/rchped.v91i1.986>.



13. Yusof N, Yasin NM, Yousuf R, *et al.* Comparison of neutrophil respiratory oxidative burst activity between flow cytometry using dihydrorhodamine (DHR) 123 and conventional nitroblue tetrazolium test (NBT). *Bangladesh J Med Sci* 2022; 21: 626-33. <https://doi.org/10.3329/bjms.v21i3.59577>.
14. Lutzkanin K, McKeone DJ, Greiner R, *et al.* A novel mutation in chronic granulomatous disease: treating the family, not just the patient. *Front Pediatr* 2019; Vo 7 - 2019. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00107>.
15. Quach A, Glowik S, Putty T, *et al.* Delayed Blood Processing Leads to Rapid Deterioration in the Measurement of the Neutrophil Respiratory Burst by the Dihydrorhodamine- 123 Reduction Assay. *Cytometry Part B, Clinical cytometry* 2019; 96: 389-96. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21767>.
16. Vowells SJ, Sekhsaria S, Malech HL, *et al.* Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *J Immunol Methods* 1995; 178: 8997. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)00247-t](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)00247-t).
17. Jirapongsananuruk O, Malech HL, Kuhns DB, *et al.* Diagnostic paradigm for evaluation of male patients with chronic granulomatous disease, based on the dihydrorhodamine 123 assay. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 374-9. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.58>.
18. Spinner MA, Sanchez LA, Hsu AP, *et al.* GATA2 deficiency: a protean disorder of hematopoiesis, lymphatics, and immunity. *Blood* 2014; 123: 809-21. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-07-515528>.
19. Freitas M, Porto G, Lima JL, Fernandes E. Isolation and activation of human neutrophils in vitro. The importance of the anticoagulant used during blood collection. *Clin Biochem* 2008; 41: 570-5. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.12.021>.
20. Prince HE, Lapé-Nixon M. Influence of specimen age and anticoagulant on flow cytometric evaluation of granulocyte oxidative burst generation. *J Immunol Methods* 1995; 188: 129-38. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00210-3](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00210-3).