

อุปกรณ์วิเคราะห์ฐานกระดาษสำหรับการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี



นายภูริทัต แก้วอาสา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Paper-based analytical device for detection of Glucose-6-
phosphate dehydrogenase deficiency

Mr. Phuritak Kaewarsa



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Hematology Sciences

Department of Clinical Microscopy

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	อุปกรณ์วิเคราะห์ฐานกระดาษสำหรับการตรวจภาวะพร่อง เอนไซม์จีซิกพีดี
โดย	นายภูริทัต แก้วอาสา
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงดาว นันทโกมล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา หลายวัฒนไพศาล

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ดร.ศิริกัลยา บริมสัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงดาว นันทโกมล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา หลายวัฒนไพศาล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรรถกร ปาละสุวรรณ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา เตือนฉาย)

ภูริทัต แก้วอาสา : อุปกรณ์วิเคราะห์ฐานกระดาษสำหรับการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี (Paper-based analytical device for detection of Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.ดวงดาว นันทโกมล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. วนิตา หลายวัฒนไพศาล, 140 หน้า.

ภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีเป็นความผิดปกติทางพันธุกรรมซึ่งมีเม็ดเลือดแดงที่ไวต่อสารอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตามในสภาวะปกติผู้ที่มีการพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีมักไม่แสดงอาการ แต่ภายหลังจากได้รับสารอนุมูลอิสระอาทิเช่น ยาต้านมาลาเรียไพพรมาควินจะชักนำให้เม็ดเลือดแดงที่พร่องเอนไซม์จีซิกพีดีเกิดการแตกทำลายจำนวนมากซึ่งพบได้บ่อยในประเทศแถบเอเชีย ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีที่ถูกต้องถือว่ามีสำคัญอย่างยิ่งในการป้องกันผู้ที่ภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีจากภาวะเม็ดเลือดแดงแตกแบบฉับพลัน งานวิจัยชิ้นนี้ผู้วิจัยได้ประดิษฐ์อุปกรณ์ของไหลฐานกระดาษแบบใหม่ “G6PD-PAD” สำหรับนำมาตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีเชิงปริมาณวิเคราะห์เป็นครั้งแรก โดยอาศัยเทคนิค Wax printing ในการผลิตสร้างลวดลายวงกลมของหลุมปฏิกิริยาบนอุปกรณ์ตรวจของไหลฐานกระดาษและใช้หลักการตรวจวัดระดับความเข้มสีบนกระดาษ G6PD-PAD ที่อาศัยปฏิกิริยาเคมีจากการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีผ่านปฏิกิริยารีดักชันเปลี่ยน TNBT เป็น Formazan ภายหลังจากมีการบันทึกภาพถ่ายอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี G6PD-PAD ด้วยเครื่องสแกนเนอร์และวิเคราะห์ระดับความเข้มสีของภาพถ่ายนั้นด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS6 ผลการศึกษาพบว่าระดับความเข้มสีที่เกิดบน G6PD-PAD มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีมี ($r^2 = 0.802$, $p < 0.001$) โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจเท่ากับ 0.46-13.5 IU/gHb ($r^2 = 0.973$) การวิเคราะห์ความต่างของผลตรวจจากทั้งสองวิธีด้วยสถิติ Bland - Altman พบว่าผลจากการตรวจด้วย G6PD-PAD สามารถยอมรับได้เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน (ค่าเฉลี่ยความต่างของผลตรวจเท่ากับ 1 IU/gHb) ขีดจำกัดในการตรวจเท่ากับ 0.381 IU/gHb งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงความสามารถของอุปกรณ์ตรวจของไหลฐานกระดาษ G6PD-PAD ในการนำมาประยุกต์ใช้ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี ซึ่งมีขั้นตอนการตรวจที่ไม่ยุ่งยาก ราคาถูกประมาณ 4 บาทต่อการตรวจ เป็นประโยชน์อย่างมากต่อการวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีในพื้นที่ห่างไกล

ภาควิชา	จุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ปีการศึกษา	2559	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5776661437 : MAJOR CLINICAL HEMATOLOGY SCIENCES

KEYWORDS: G6PD DEFICIENCY / GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE DEFICIENCY / PAPER BASED ANALYTICAL DEVICES / QUANTITATIVE G6PD TEST / QUALITATIVE G6PD TEST

PHURITAT KAEWARSA: Paper-based analytical device for detection of Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. ADVISOR: ASST. PROF. DUANGDAO NANTAKOMOL, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. WANIDA LAIWATTANAPAISAL, Ph.D., 140 pp.

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency is a genetic haemolytic disorder. Most persons with G6PD deficiency are asymptomatic, but exposure to oxidant drugs, such as the anti-malarial drug primaquine, may induce haemolysis, which is commonly found in Asian countries. A reliable test is necessary for diagnosing the deficiency to prevent an acute haemolytic crisis. This study proposes a novel quantitative method to detect G6PD deficiency using paper-based analytical devices (G6PD-PAD). Wax printing was utilized for fabricating circular reaction zone patterns in paper. The colorimetric assay is based on the formation of formazan via a reduction of tetra-nitro blue tetrazolium (TNBT) by the G6PD enzyme on G6PD-PAD. Detection was achieved by capturing the colour using a desktop scanner and the colour intensity was analysed with Adobe Photoshop CS6. The results showed that the color intensity by G6PD-PAD was highly correlated with the G6PD activity analysed by the standard biochemical assay (SBA) ($r^2 = 0.802, p < 0.001$). The linear range of G6PD activity assay was 0.46-13.5 IU/gHb ($r^2 = 0.973$). Moreover, good agreement by Bland-Altman bias plot was demonstrated between G6PD-PAD and the SBA (mean bias 1 IU/gHb). The detection limit was 0.381 IU/gHb of G6PD activity. This study demonstrates the feasibility of using G6PD-PAD. This simple, low-cost test (\$0.1/test) should be useful for diagnosing G6PD deficiency in resource-limited settings.

Department: Clinical Microscopy Student's Signature

Field of Study: Clinical Hematology Advisor's Signature

Sciences Co-Advisor's Signature

Academic Year: 2016

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุลวงได้ อันเนื่องมาจากความกรุณาและความช่วยเหลือของ ผศ.ดร. ดวงดาว นันทโกมล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ ผศ.ดร.วนิดา หลายวัฒนไพศาล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งได้ให้ความเอาใจใส่ คำแนะนำ คำปรึกษา ร่วมแก้ไขปัญหาต่างๆ และสนับสนุนข้าพเจ้าตลอดมาในทุกๆด้าน จนวิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์ไปด้วยดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. อรรถกร ปาละสุวรรณ กรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร. วิจิตรา เตือนฉาย กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย และ ดร. ศิริกัลยา บริมสัน ประธานหลักสูตรที่ให้คำปรึกษาแนะแนวทางการพัฒนางานวิจัยให้ดียิ่งขึ้น และกรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณบุคลากรในคณะสหเวชศาสตร์ ทั้งภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิกและภาควิชาเคมีคลินิก ที่ให้ยืมสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือวิจัย น้ำยาสารเคมี และให้ความช่วยเหลือข้าพเจ้ามาโดยตลอด เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลศิริราช และศูนย์วิจัยโรงพยาบาลศิริราชที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างเลือดให้เพื่อใช้ในการวิจัย

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์จากโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช และขอขอบพระคุณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนการศึกษาเพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษาที่ทำให้ข้าพเจ้าได้สำเร็จการศึกษาระดับมหาบัณฑิต

ขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง สาขาวิชาวิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิกและสาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ ที่คอยร่วมทุกข์ร่วมสุข คอยให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจกันมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ บิดามารดา และครอบครัว ที่ให้โอกาสได้รับการศึกษาเล่าเรียน ตลอดจนคอยช่วยเหลือสนับสนุนค่าใช้จ่ายอื่นๆ และให้กำลังใจจนสามารถสำเร็จการศึกษาได้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ต
สารบัญภาพ	ณ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย.....	1
2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	4
3. ขอบเขตงานวิจัย.....	4
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
1. เอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส	5
1.1 การป้องกันสภาวะความเครียดของเซลล์ (Oxidative stress defense).....	5
1.2 พันธุศาสตร์ของเอนไซม์จีซิกพีดี	7
1.3 โครงสร้างของเอนไซม์จีซิกพีดี	9
1.4 ภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี.....	10
1.5 ระบาดวิทยา.....	11
1.6 การจัดแบ่งกลุ่มผู้มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี	12
1.7 อาการทางคลินิกของภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีและแนวทางการรักษา.....	13
1) ภาวะโลหิตจางเนื่องจากเกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงจากการได้รับยา.....	14
2) ภาวะโลหิตจางเนื่องจากเกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงจากการติดเชื้อโรค.....	15

3) อาการแพ้ถั่วปากอ้า (favism).....	15
4) ภาวะตัวเหลืองในเด็กแรกเกิด (neonatal jaundice).....	16
5) ภาวะโลหิตจางเรื้อรังแบบเม็ดเลือดแดงไม่กลม	16
1.8 อายุขัยเม็ดเลือดแดงในผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี	16
2. การตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี	17
2.1 การตรวจวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี	18
1) Fluorescent spot test.....	18
2) Methemoglobin reduction test.....	18
3) Brilliant cresyl blue test.....	19
4) Ascorbate-cyanide screening test.....	19
5) ชุดตรวจคัดกรอง CareStart™ G6PD deficiency	20
6) ชุดตรวจคัดกรอง BinaxNow® G6PD	20
7) Cytochemical staining	22
8) Cytofluorometric assay	23
9) Biochemical G6PD activity.....	23
2.2 การตรวจความผิดปกติทางพันธุกรรมบนยีนจีซิกพีดี.....	25
1) PCR-RFLP.....	25
3. การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการบนกระดาษ (lab on paper)	29
3.1 การพัฒนาวิธีการสร้างลวดลายต่างๆบนกระดาษ	29
1) Photolithography	29
2) Polydimethylsiloxane (PDMS) plotting	30
3) Ink jet printing.....	31
4) Plasma treatment	31

5) Wax printing	31
6) Wax screen printing	32
7) Wax dipping.....	32
8) Flexographic printing	33
9) Laser cutting.....	34
10) Laser treatment.....	35
3.2 การพัฒนาด้านการออกแบบอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ.....	35
3.3 เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปฏิกิริยาบนกระดาษ	36
1) การวิเคราะห์ผลเชิงปริมาณวิเคราะห์ของความเข้มสีจากภาพถ่าย	36
1.1 ภาพถ่าย.....	36
1.2 ระบบสี.....	37
1.3 โปรแกรมและการนำมาประยุกต์ใช้ตรวจวัดสารบนกระดาษ.....	40
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	42
1. กลุ่มตัวอย่าง (Population and sampling)	42
2. เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	46
2.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	46
2.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	47
2.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	48
3. วิธีดำเนินการวิจัย	49
3.1 การผลิตอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ โดยเทคนิค wax printing.....	49
3.1.1 การทดสอบปริมาตรน้ำยาที่เหมาะสมในการตรึงลงบนอุปกรณ์ตรวจ วิเคราะห์ฐานกระดาษ.....	50
3.2 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี	51

3.2.1	การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของน้ำยาในหลอดทดลอง	51
	1. การทดสอบเติม 5 mM EDTA ใน tris-HCl buffer	52
	2. การทดสอบวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีในหลอดทดลอง	52
3.2.2	การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของน้ำยาบนกระดาษ	52
	1. การทดสอบหาจำนวนหยดที่เหมาะสมของ G6P ในการตรึง	53
	2. การทดสอบหาจำนวนหยดที่เหมาะสมของ NADP ⁺ ในการตรึง	53
	3. การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TNBT ในการตรึง	53
	4. การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1-methoxyPMS	54
3.2.3	การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมอื่นๆ ในการตรวจวินิจฉัยภาวะพร่อง เอนไซม์จีซิกพีดีด้วยอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลฐานกระดาษ	54
	1. การทดสอบหาอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างเลือดกับน้ำยาที่ใช้ตรวจ	54
	2. การทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรวจวินิจฉัย	55
	3. การทดสอบหาระบบสีที่เหมาะสมในการรายงานผล	55
3.3	การศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ	56
3.3.1	การทดสอบความแม่นยำของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ	56
3.3.2	การสร้างกราฟมาตรฐานในการแปลผลของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่อง เอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ	56
3.3.3	การทดสอบหาขีดจำกัด หรือ limit of detection (LOD) ในการตรวจของ อุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ	57
3.3.4	การทดสอบการรบกวนจากปริมาณเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างเลือดครบส่วน	57
3.3.5	การทดสอบการรบกวนจากปริมาณเม็ดเลือดขาวในตัวอย่างเลือดครบส่วน	58
3.3.6	การทดสอบสารรบกวนบนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ	59
	1. การทดสอบการรบกวนจากไขมัน (lipemic)	60
	2. การทดสอบการรบกวนจากฮีโมโกลบิน (hemolysis)	61

3. การทดสอบการรบกวนจากบิลิรูบิน (icteric).....	62
3.4 การทดสอบตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐาน กระดาษที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธีที่ใช้อยู่ปัจจุบันและวิธีมาตรฐาน	63
3.4.1 การตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีวิธี fluorescent spot test....	63
3.4.2 การตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐาน กระดาษ.....	65
3.4.3 การตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี	66
3.4.4 การตรวจวิเคราะห์จีโนไทป์ของกลุ่มตัวอย่าง	67
1. การสกัดดีเอ็นเอ	67
2. วิเคราะห์จีโนไทป์	68
3.4.5 การวิเคราะห์ข้อมูล	70
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	71
1. ลักษณะรูปแบบอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ	71
2. ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพี ดีด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ	72
2.1 ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของน้ำยาในหลอดทดลอง	72
2.1.1 ผลการทดลองเติม 5 mM EDTA ลงใน tris-HCl buffer	74
2.1.2 ผลการทดลองวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีเบื้องต้นในหลอดทดลอง....	75
2.2 ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของน้ำยาบนกระดาษ.....	76
2.2.1 ผลการทดสอบหาจำนวนหยดที่เหมาะสมของ G6P ในการตรึง.....	76
2.2.2 ผลการทดสอบหาจำนวนหยดที่เหมาะสมของ NADP ⁺ ในการตรึง	77
2.2.3 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TNBT ในการตรึง	78
2.2.4 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1-methoxyPMS.....	79
2.3 ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี ..	80

2.3.1	ผลการทดสอบหาอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างเลือดกับน้ำยาที่ใช้ตรวจ	80
2.3.2	ผลการทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรวจวินิจฉัย.....	82
2.3.3	ผลการทดสอบหาระบบสีที่เหมาะสมในการรายงานผล	83
3.	ผลการศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐาน กระดาศ	85
3.1	ผลการทดสอบความแม่นยำของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐาน กระดาศ	85
3.2	ผลการสร้างกราฟมาตรฐานในการแปลผลของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิก พีดีฐานกระดาศ	86
3.3	ผลการทดสอบหาขีดจำกัด หรือ limit of detection (LOD) ในการตรวจของ อุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาศ.....	87
3.4	ผลการทดสอบการรบกวนจากปริมาณเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างเลือดครบส่วน	87
3.5	ผลการทดสอบการรบกวนจากปริมาณเม็ดเลือดขาวในตัวอย่างเลือดครบส่วน.....	89
3.6	ผลการทดสอบสารรบกวนบนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาศ	90
4.	ผลการทดสอบตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐาน กระดาศที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธีที่ใช้อยู่ปัจจุบันและวิธีมาตรฐาน.....	91
4.1	คุณลักษณะกลุ่มตัวอย่าง	91
4.2	ผลการประเมินประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐาน กระดาศกับวิธีตรวจอื่นๆ	95
บทที่ 5	สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	100
1.	สรุปผลการวิจัย	100
2.	อภิปรายผลการวิจัย	102
	รายการอ้างอิง	107
	ภาคผนวก.....	125

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 140



สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	จำนวน exon ขนาดของ exon และ intron บนยีนจีซิกพีดี	9
ตารางที่ 2	การจัดแบ่งกลุ่มผู้มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีตามหลักเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก ..	13
ตารางที่ 3	ยาและสารเคมีที่ควรระมัดระวังและหลีกเลี่ยงในกลุ่มผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี ...	14
ตารางที่ 4	ความผันแปรของยีนจีซิกพีดีที่พบบ่อยที่สุดในประเทศไทยกับเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้....	26
ตารางที่ 5	เทคนิคการตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี หลักการตรวจและการรายงานผล ..	28
ตารางที่ 6	การเตรียมตัวอย่างมาตรฐาน	57
ตารางที่ 7	วิธีการตรวจวัดไตรกลีเซอไรด์	60
ตารางที่ 8	วิธีการตรวจวัดค่าฮีโมโกลบิน.....	61
ตารางที่ 9	วิธีการตรวจวัด total bilirubin	62
ตารางที่ 10	วิธีการตรวจวัด conjugated bilirubin	63
ตารางที่ 11	การวิเคราะห์ DiaplexC™ G6PD Genotyping Kit (Asian type).....	68
ตารางที่ 12	การเตรียม mastermix ต่อ 1 reaction.....	69
ตารางที่ 13	การตั้งค่าเครื่อง PCR Thermo cycler.....	69
ตารางที่ 14	ผลการทดสอบความแม่นยำของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี.....	86
ตารางที่ 15	ผลการทดสอบหาขีดจำกัดในการตรวจของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี ..	87
ตารางที่ 16	ผลการทดสอบสารรบกวนบนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ	91
ตารางที่ 17	ผลการตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดกลุ่มตัวอย่าง	92
ตารางที่ 18	ผลการจำแนกกลุ่มตัวอย่างตามระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี.....	94
ตารางที่ 19	ผลการตรวจคัดกรองเชิงคุณภาพวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี fluorescent spot test และ อุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ (cutoff= 4.59 IU/gHb)	98
ตารางที่ 20	ผลการประเมินประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษในการรายงานผลเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (cutoff= 4.59 IU/gHb)	98

ตารางที่ 21 ผลการตรวจคัดกรองเชิงคุณภาพวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี fluorescent spot test และ อุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาศ (cutoff=3.44 IU/gHb)..... 99

ตารางที่ 22 ผลการประเมินประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาศในการรายงานผลเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (cutoff=3.44 IU/gHb)..... 99



สารบัญภาพ

รูปที่ 1	วิถี pentose phosphate และทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีในการต่อต้านอนุมูลอิสระ.....	6
รูปที่ 2	การต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์.....	7
รูปที่ 3	ตำแหน่งของยีนจีซิกพีดีบนโครโมโซมตำแหน่ง Xq28	8
รูปที่ 4	ตำแหน่งการกลายพันธุ์บนยีนจีซิกพีดีที่พบได้บ่อย.....	8
รูปที่ 5	โครงสร้าง 3 มิติโมเลกุลเชิงคู่ของเอนไซม์จีซิกพีดี.....	10
รูปที่ 6	ความชุกและความหลากหลายของภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีที่พบทั่วโลก	11
รูปที่ 7	ความชุกภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี และโรคมาลาเรียทั่วโลก.....	12
รูปที่ 8	ลักษณะเม็ดเลือดแดงที่ปรากฏบนเสมียร์เลือด	15
รูปที่ 9	ตัวอย่างผลการตรวจคัดกรองผู้มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี	18
รูปที่ 10	ปฏิกิริยาของการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยวิธี MRT	19
รูปที่ 11	ผลกระทบของสารกันเลือดแข็งต่อการตรวจ ascorbate-cyanide screening test	20
รูปที่ 12	ตัวอย่างผลของชุดตรวจคัดกรอง CareStart™ G6PD deficiency	21
รูปที่ 13	ชุดตรวจคัดกรอง BinaxNow® G6PD	21
รูปที่ 14	ปฏิกิริยาการรีดิวซ์ tetrazolium salt จากการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี	22
รูปที่ 15	เม็ดเลือดแดงที่ผ่านการย้อมสีด้วยวิธี cytochemical	22
รูปที่ 16	หลักการของเทคนิค cytofluorometric assay	23
รูปที่ 17	ผลการตรวจ cytofluorometric assay	24
รูปที่ 18	ผล gel electrophoresis ของความผันแปรชนิด Canton ในเพศหญิง	27
รูปที่ 19	ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ ด้วยเทคนิค photolithography	30
รูปที่ 20	การเกิดปฏิกิริยา esterification ของกระดาษกับสาร AKD	31
รูปที่ 21	ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษด้วยเทคนิค wax screen printing.....	32

รูปที่ 22 ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ ด้วยเทคนิค wax dipping	33
รูปที่ 23 หลักการสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ ด้วยเทคนิค flexographic printing.....	34
รูปที่ 24 หลักการสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ ด้วยเทคนิค laser cutting	34
รูปที่ 25 ระบบสี CMYK และ ระบบสี RGB	37
รูปที่ 26 วงล้อสี (Hue: 0-360°)	38
รูปที่ 27 ความแตกต่างของพื้นที่ระบบสี HSV และ HLS.....	38
รูปที่ 28 พื้นที่ระบบสี CIE Lab.....	39
รูปที่ 29 ขั้นตอนการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Photoshop	40
รูปที่ 30 ขนาดของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ: PAD.....	49
รูปที่ 31 แสดงขั้นตอนการพิมพ์อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ.....	50
รูปที่ 32 สมการปฏิกิริยาการเกิดสีของ formazan บนอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี....	51
รูปที่ 33 แผนผังการเตรียมตัวอย่างเลือดสำหรับการทดสอบสารบวทที่ความเข้มข้น 4 ระดับ	59
รูปที่ 34 ลำดับขั้นตอนการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี ด้วยวิธี FST	64
รูปที่ 35 ขั้นตอนการตรวจด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ.....	65
รูปที่ 36 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างวัตรระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี.....	66
รูปที่ 37 ลำดับขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ	67
รูปที่ 38 อุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ: G6PD PAD.....	71
รูปที่ 39 ผลการตรวจวัตรระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีตัวควบคุมที่ระดับความเข้มข้น 0.5-12 mM G6P	72
รูปที่ 40 ผลการตรวจวัตรระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีตัวควบคุมที่ระดับความเข้มข้น 0.5-2.5 mM NADP ⁺	73

รูปที่ 41 ผลการตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซีจีพีดีตัวควบคุมที่ระดับความเข้มข้น 100, 200 และ 300 mM tris-HCL buffer และมีช่วงของ pH ตั้งแต่ 7.6-7.8.....	74
รูปที่ 42 ผลการตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซีจีพีดีตัวควบคุม เมื่อทำการทดลองเติม 5 mM EDTA ลงใน tris-HCL buffer เปรียบเทียบกับไม่ได้เติม (0 mM EDTA)	75
รูปที่ 43 ผลการทดลองวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซีจีพีดีเบื้องต้นในหลอดทดลอง.....	75
รูปที่ 44 ผลการทดสอบหาจำนวนหยดที่เหมาะสมของ 4 mM G6P ในการตรึงลงบนกระดาษ	76
รูปที่ 45 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ G6P ในการตรึงลงบนกระดาษ	77
รูปที่ 46 ผลการทดสอบหาจำนวนหยดที่เหมาะสมของ 2.5 mM NADP ⁺ ในการตรึงลงบนกระดาษ ...	78
รูปที่ 47 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TNBT ในการตรึงลงบนกระดาษ.....	79
รูปที่ 48 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1-methoxyPMS	80
รูปที่ 49 ผลการทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างตัวอย่างเลือดกับน้ำยาที่ใช้ในการตรวจ	81
รูปที่ 50 ผลการทดสอบลดอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างเลือดกับน้ำยาที่ใช้ในการตรวจ.....	81
รูปที่ 51 ผลการทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรวจวินิจฉัยด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซีจีพีดีฐานกระดาษ 10 ถึง 40 นาที	82
รูปที่ 52 ผลการทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรวจวินิจฉัยด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซีจีพีดีฐานกระดาษ 5 ถึง 25 นาที.....	83
รูปที่ 53 ผลการเปรียบเทียบระดับความเข้มสีของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซีจีพีดีฐานกระดาษในระบบสี RGB และ ระบบสี CMYK.....	84
รูปที่ 54 กราฟผลการทดสอบความแม่นยำของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซีจีพีดีฐานกระดาษ	85
รูปที่ 55 กราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวินิจฉัยด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซีจีพีดีฐานกระดาษ.....	86
รูปที่ 56 ผลการทดสอบการรบกวนจากปริมาณเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างเลือดครบส่วนต่อผลการตรวจด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซีจีพีดีฐานกระดาษ.....	88
รูปที่ 57 ผลการศึกษาผลกระทบของเม็ดเลือดขาวในตัวอย่างเลือดครบส่วนต่อผลการตรวจด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซีจีพีดีฐานกระดาษ.....	89

รูปที่ 58 ผลการทดสอบสารบวบนอนุปรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระตาศ hemolysis lipemic และ icteric..... 90

รูปที่ 59 ผลการประเมินระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีกลุ่มตัวอย่าง..... 93

รูปที่ 60 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีกับระดับความเข้มสีที่ได้จากการตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี 95

รูปที่ 61 กราฟผลการวิเคราะห์ด้วยสถิติ Bland and Altman analysis และ Passing and Bablok regression..... 96



บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย

ภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (Glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency: G6PD) เป็นความผิดปกติทางพันธุกรรมบนโครโมโซม X ตำแหน่ง Xq28 [2] โดยเอนไซม์จีซิกพีดีเป็นเอนไซม์ในกระบวนการ pentose phosphate pathway ที่มีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในการสร้าง NADPH ที่ทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในการเปลี่ยนกลูตาไธโอน (glutathione) จากรูปออกซิไดซ์ให้กลับมาอยู่ในรูปรีดิวซ์ เพื่อใช้กำจัดอนุมูลอิสระภายในเซลล์เม็ดเลือดแดง จากที่กล่าวในข้างต้นเอนไซม์จีซิกพีดีจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อเม็ดเลือดแดงในการป้องกันไม่ให้เซลล์ถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น [3] ภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีสามารถพบได้บ่อย คาดว่ามีประชากรมากกว่า 400 ล้านคนทั่วโลกมีรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีนี้ [4] ซึ่งมีรูปแบบการกลายพันธุ์ที่หลากหลายแตกต่างกันกว่า 440 ชนิดทั่วโลก โดยเฉพาะในแถบประเทศที่มีการแพร่ระบาดของโรคมาลาเรีย เช่นในประเทศไทย [5] ซึ่งพบว่ามีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีนี้ถึงร้อยละ 11.98 [6] ถึง 14.2 [7, 8] และมีรูปแบบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Viangchan (871G>A), G6PD Canton (1376G>T) และ G6PD Mahidol (487G>A) มากที่สุดเป็นสองอันดับแรกของประเทศ ซึ่งจัดอยู่ใน WHO Class II (ผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีรุนแรง) และ WHO Class III [9] (ผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีปานกลาง)ตามลำดับ โดยมีการตั้งชื่อรูปแบบการกลายพันธุ์ ตามสถาบัน เมือง หรือภูมิภาคที่ค้นพบ

เนื่องจากยีนที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์จีซิกพีดีอยู่บนโครโมโซม X ทำให้ในเพศชายที่มีรูปแบบโครโมโซมเพศ XY เมื่อได้รับโครโมโซม X ที่มีความผิดปกติของยีนจีซิกพีดีจากมารดา (hemizygote) จะมีระดับการแสดงออกของเอนไซม์จีซิกพีดีต่ำสัมพันธ์กับรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดี แต่ในขณะเพศหญิงที่มีรูปแบบโครโมโซมเพศ XX ผู้ที่ได้รับโครโมโซม X ที่มีความผิดปกติของยีนจีซิกพีดีเพียงข้างเดียว (heterozygote) จะมีระดับการแสดงออกของเอนไซม์จีซิกพีดีต่ำหรือปกติก็ได้ [10] และจะมีการแสดงออกของเอนไซม์จีซิกพีดีต่ำสัมพันธ์กับรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีก็ต่อเมื่อได้รับการถ่ายทอดโครโมโซม X มีความผิดปกติของยีนจีซิกพีดีทั้งสองข้าง (homozygote) [3] ดังนั้นการตรวจระดับพันธุกรรมเพื่อหาตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีบนโครโมโซม X เพียงอย่างเดียว จะไม่สอดคล้องกับระดับการแสดงออกของเอนไซม์ อีกทั้งการตรวจระดับพันธุกรรมต้องอาศัยบุคลากรที่มีทักษะความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ ต้องใช้เครื่องมือวิเคราะห์สารพันธุกรรมทางด้านอณูวิทยาที่มีราคาสูงมาก และใช้ระยะเวลาการตรวจที่ยาวนาน ทำให้

ไม่เป็นที่แพร่หลาย ผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีมักไม่แสดงอาการในภาวะปกติ อย่างไรก็ตามเม็ดเลือดแดงที่พร่องเอนไซม์จีซิกพีดีมีไวต่อการถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระได้มากกว่าเม็ดเลือดปกติ จึงมีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะ oxidative stress เมื่อได้รับสารอนุมูลอิสระ เช่น ลูกเหม็น (naphthalene) ถั่วปากอ้า (fava bean) สารสกัดสมุนไพรมะรุม หรือภายหลังจากรักษาด้วยยาต้านมาลาเรียบางชนิด [11-13] เช่น tafenoquine, chloroquine, primaquine [14] เป็นต้น อันจะส่งผลให้เม็ดเลือดแดงแตกฉับปล้นรุนแรงได้ และเกิดภาวะแทรกซ้อนตามมาจนอาจเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ [15] โดยเฉพาะอย่างยิ่งยา primaquine ที่ใช้ฆ่าเชื้อมาลาเรียในระยะ gametocyte และป้องกันการแพร่เชื้อ กลุ่มคนปกติจะได้รับยาปริมาณ 0.75 mg/kg หรือ 45 mg หนึ่งครั้งต่อสัปดาห์ รับประทานต่อเนื่องเป็นเวลา 8 สัปดาห์ แต่สำหรับผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีปานกลางและรุนแรงจะต้องปรับลดขนาดยาลงเหลือ 0.5 mg/kg หรือ 30 mg และ 0.25 mg/kg หรือ 15 mg ตามลำดับ วันละครั้ง เป็นเวลา 7-14 วัน เพื่อป้องกันการเกิดภาวะซีดจากการแตกของเม็ดเลือดแดงอย่างเฉียบพลัน (acute hemolytic anemia: AHA) [16] ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีที่ทราบถึงปริมาณการทำงานของเอนไซม์เป็นตัวเลขที่ถูกต้องถือว่ามีความสำคัญเป็นอย่างมากในการจัดจำแนกระดับความพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี เพื่อหลีกเลี่ยงการได้รับสารอนุมูลอิสระหรือยาบางชนิดดังกล่าว และเพื่อปรับขนาดของยาให้เหมาะสม

วิธีการตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีมีอยู่ด้วยกันหลากหลายวิธี โดยอาศัยหลักการการตรวจวัดปริมาณ NADPH ที่ผลิตขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีที่มีคุณสมบัติเป็น reducing agent และเป็นสาร fluorescence ที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 340 nm [17] ได้แก่ วิธีตรวจคัดกรอง methemoglobin reduction test [18, 19] วิธีตรวจคัดกรอง fluorescent spot test [20] และวิธีการตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี biochemical G6PD activity [21, 22] เป็นต้น ซึ่งแต่ละวิธียังมีข้อจำกัดอยู่มาก เช่น 1) วิธีตรวจคัดกรอง methemoglobin reduction test (MRT) ที่ต้องใช้ระยะเวลาในการบ่มปฏิกิริยาถึง 3 ชั่วโมง และต้องอาศัยการสังเกตการเปลี่ยนสีของน้ำยา ในบางครั้งสีที่ก้ำกึ่งทำให้ยากต่อการออกผลและเกิดความผิดพลาด 2) วิธีตรวจคัดกรอง fluorescent spot test (FST) ในปัจจุบันวิธีนี้ได้รับความนิยมอย่างมากเนื่องใช้ระยะเวลาในการตรวจสั้น แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากสามารถวินิจฉัยผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีแบบรุนแรงได้เท่านั้น ทำให้ไม่สามารถตรวจผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์แบบปานกลางได้ อีกประการหนึ่งคือ วิธีการดูการเรืองจะต้องอาศัยที่มีดในการสังเกตสีเรืองแสงภายใต้แสงยูวี ทำให้ผู้ทดสอบอาจสัมผัสหรือได้รับแสงยูวีในปริมาณสูงซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ทดสอบได้ 3) วิธีการตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี (biochemical G6PD activity) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวัดเชิงปริมาณวิเคราะห์ ต้องอาศัยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ทำให้มี

ต้นทุนที่สูง ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเมื่อดัดแปลงที่ยุ่งยาก ถึงแม้ปัจจุบันการตรวจระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีจะมีเครื่องอัตโนมัติในการตรวจแล้ว แต่ยังคงใช้เวลาการตรวจที่นาน

ปัจจุบันอุปกรณ์ตรวจทางห้องปฏิบัติการบนกระดาษได้รับความนิยมอย่างมาก เพราะมีความสะดวกรวดเร็ว พกพาได้ง่าย และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในตรวจวินิจฉัยได้หลายโรค ในปี ค.ศ. 2007 กลุ่มคณะวิจัย Whiteside ได้ทำการพัฒนาการตรวจทางห้องปฏิบัติการบนกระดาษให้มีขนาดเล็กและสามารถตรวจวิเคราะห์สารหลายๆอย่างได้พร้อมกัน [23] ซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีในนามอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (microfluidic paper-based analytical devices: μ PAD)[24] โดยอาศัยหลักการการออกแบบกระดาษให้มีส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เป็นลวดลายต่างๆ ตามวัตถุประสงค์ในการตรวจบนกระดาษ การสร้างลวดลายต่างๆ บนกระดาษมีเทคนิคต่างๆ ดังนี้ photolithography [25], polydimethylsiloxane (PDMS) plotting [26], inkjet printing [27], plasma treatment [28, 29], wax printing [30, 31], wax screen-printing [32] และ wax dipping [33] ซึ่งสามารถวิเคราะห์ผลการตรวจได้หลากหลายวิธี เช่น การสังเกตสีที่เกิดขึ้น และใช้กล้องถ่ายภาพเพื่อวิเคราะห์ผลเชิงปริมาณวิเคราะห์จากความเข้มของสีผ่านทางโปรแกรม ImageJ [34] Adobe Photoshop CS2 [33] การวัดระยะทางของสีที่ปรากฏ [35] การใช้เครื่อง electrochemical analyzer [36] เป็นต้น

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะนำอุปกรณ์วิเคราะห์ฐานกระดาษมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเทคนิควินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี เพื่อที่จะสามารถคัดแยกผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น กล่าวคือ สามารถรายงานผลได้ทั้งเชิงคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์โดยมีกระบวนการตรวจที่ไม่ยุ่งยาก ด้วยเทคนิค wax printing ทำให้สามารถสร้างลวดลายบนกระดาษเป็นอุปกรณ์ตรวจของไหลฐานกระดาษได้ โดยการพิมพ์หมึกที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic wax) ลงบนกระดาษที่มีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) เพื่อให้กระดาษมีอาณาเขตที่ไม่ชอบน้ำ เกิดลวดลายช่องทางการไหลของสารน้ำบนกระดาษตามการออกแบบจากโปรแกรม Microsoft PowerPoint 2010 ซึ่งวิธีนี้อาศัยเครื่องมือพื้นฐานทั่วไปเพียงไม่กี่อย่าง ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก จึงทำให้มีต้นทุนในการผลิตต่ำ ความเร็วในการผลิตอุปกรณ์ตรวจขึ้นอยู่กับความสามารถของเครื่องพิมพ์ที่ใช้ คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำเทคนิค wax printing นี้ มาใช้ในการออกแบบและผลิตอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี โดยอาศัยหลักการของ cytochemical Staining ในการตรวจวัดปริมาณ NADPH ที่ถูกผลิตขึ้นจากกระบวนการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี จากคุณสมบัติในการรีดิวซ์ของ NADPH ที่จะรีดิวซ์ Tetranitro blue tetrazolium เป็นผลิตภัณฑ์ formazan [37] บนกระดาษ และวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากความเข้มของสีผ่านทางโปรแกรม Adobe Photoshop CS6 [33] ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า อุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีที่ผลิตขึ้นมาได้นี้ จะสามารถลดระยะเวลาขั้นตอนในการ

ตรวจ และลดค่าใช้จ่ายสำหรับผู้ป่วยที่ต้องได้รับการรักษา พร้อมทั้งสามารถคัดแยกผู้มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีได้อย่างถูกต้องแม่นยำและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 2.1 เพื่อพัฒนาอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยหลักการของไหลฐานกระดาษ
- 2.2 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของชุดทดสอบในการนำมาตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีในตัวอย่างเลือดผู้บริจาคโลหิต

3. ขอบเขตงานวิจัย

คณะผู้วิจัยจะทำการพัฒนาเทคนิคในการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจที่ได้ กับวิธีการตรวจที่มีอยู่ในปัจจุบัน อันได้แก่ fluorescent spot test และ biochemical G6PD activity จากการสุ่มตัวอย่างเลือดจากหลอด 3.2% Sodium citrate และ CPDA ของผู้บริจาคโลหิต ที่ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลศิริราช ระหว่างเดือน สิงหาคม ถึง พฤศจิกายน พ.ศ. 2559 จำนวน 322 ราย

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

ได้อุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีแบบใหม่ ซึ่งอาศัยหลักการของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลฐานกระดาษที่มีประสิทธิภาพดีกว่าเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ที่มีอยู่ในปัจจุบัน โดยที่มีการใช้ปริมาณตัวอย่างเลือดและน้ำยาในการตรวจวิเคราะห์ที่น้อยลง สามารถรายงานผลได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณวิเคราะห์ ลดต้นทุนในการผลิต อีกทั้งระยะเวลาและขั้นตอนในการตรวจ และเนื่องจากวัสดุอุปกรณ์ตรวจทำจากกระดาษจึงมีน้ำหนักเบาและบางง่ายต่อการขนส่งเคลื่อนย้าย สามารถใช้เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ตรวจข้างเตียงผู้ป่วย (point of care: POCT)

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

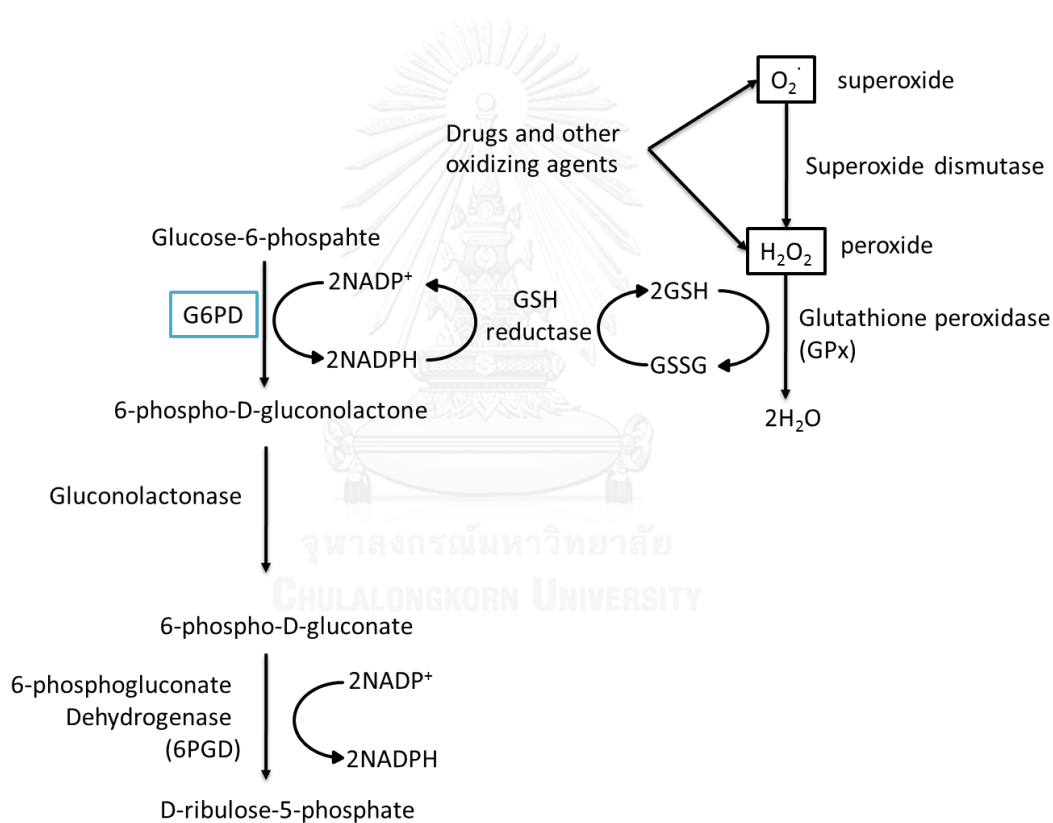
1. เอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส

เอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (glucose 6 phosphate dehydrogenase: G6PD) เป็นเอนไซม์เริ่มต้นปฏิกิริยาเคมีของวิถี pentose Phosphate หรือ hexose monophosphate ในการเปลี่ยน glucose-6-phosphate เป็น 6-phospho-gluconate โดยมีโคเอนไซม์คือ NADP ซึ่งภายหลังปฏิกิริยาจะถูกรีดิวซ์ได้เป็น NADPH (ดังรูปที่ 1) วิถี pentose Phosphate จะผลิต ribulose-5-phosphate (สร้างตั้งต้นในการสร้าง DNA, RNA) NADPH และ คาร์บอนไดออกไซด์ NADPH ที่ได้จะเป็นโคเอนไซม์ ให้กับ glutathione reductase (GR) ในการรีดิวซ์ glutathione (GSSG>GSH) และ thioredoxin reductase (TrxR) ในการรีดิวซ์ thioredoxin (TrxO>Trx) เพื่อใช้ในการต่อต้านสารอนุมูลอิสระ [38, 39] วิถี pentose Phosphate นี้มีอยู่ในทุกๆ เซลล์ของร่างกาย แต่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อเม็ดเลือดแดง เพราะเม็ดเลือดแดงไม่มีไมโทคอนเดรียที่เป็นแหล่งในการผลิต NADPH เหมือนเซลล์อื่นๆทั่วไป และต้องสัมผัสกับออกซิเจน (O_2) ตลอดเวลา จึงเสี่ยงต่อการเกิดอนุมูลอิสระประเภทสารประกอบออกซิเจน (oxygen radical) อีกทั้งสายเบต้า (β -chain) ของฮีโมโกลบินเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation)ได้ง่าย วิถี pentose phosphate จึงเป็นเพียงกระบวนการเดียวที่ผลิต NADPH ให้เม็ดเลือดแดงเพื่อป้องกันสภาวะความเครียด (oxidative stress) ที่จะส่งผลต่อการแตกของเม็ดเลือดแดง [40] ในสภาวะปกติเอนไซม์จีซิกพีดีทำงานเพียงร้อยละ 2 จากประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ทั้งหมด [41] แต่จะทำงานสูงขึ้นเมื่อมีระดับ NADP ที่สูงขึ้น

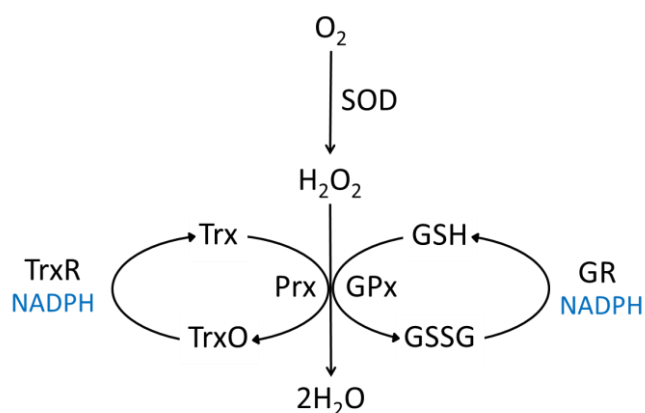
1.1 การป้องกันสภาวะความเครียดของเซลล์ (Oxidative stress defense)

การรับประทานอาหาร (ถั่วปากอ้า), การได้รับยาและสารเคมี, การติดเชื้อต่างๆ เมื่อสารเหล่านี้เข้าไปภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงและทำปฏิกิริยากับออกซิเจนทำให้มีปริมาณของ superoxide radical สูงซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) จากการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) และถูกกำจัดต่อไปเป็นน้ำจากการทำงานของ 3 เอนไซม์ คือ 1) catalase 2) peroxiredoxin (Prx) และ 3) glutathione peroxidase (GPx) (ดังรูปที่ 2) โดยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่หลักในการป้องกันสภาวะความเครียดของเซลล์คือ glutathione peroxidase ในวิถี pentose phosphate สามารถผลิต NADPH ได้จากเอนไซม์จีซิกพีดี และ 6PGD (ดังรูปที่1) คนปกติเอนไซม์จีซิกพีดีจะสามารถผลิต NADPH มาช่วยเปลี่ยน oxidize glutathione (GSSG) เป็น

reduced glutathione (GSH) ในการต่อต้านสารอนุมูลอิสระต่างๆจากที่กล่าวข้างต้นได้ ดังนั้นผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ จีซีจีพีดีจึงไม่สามารถผลิต NADPH ได้เพียงพอที่จะต่อต้านความเครียดจากการเพิ่มปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ จึงส่งผลให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงอย่างเฉียบพลัน (acute hemolysis anemia) ระดับ GSSG ในเม็ดเลือดแดงของคนปกติ คือ 0.0036 ± 0.0014 $\mu\text{mol/ml}$ แต่ในผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซีจีพีดีจะมีระดับ GSSG ในเม็ดเลือดแดงเท่ากับ 0.001028 ± 0.003 $\mu\text{mol/ml}$ [42] โดยระดับการทำงานของเอนไซม์จีซีจีพีดีจะเสื่อมตามอายุขัยของเซลล์เม็ดเลือดแดง กล่าวคือมีการค้นพบว่าเม็ดเลือดแดงระยะตัวอ่อน (reticulocytes) มีระดับการทำงานของเอนไซม์จีซีจีพีดีสูงกว่าเม็ดเลือดแดงตัวแก่ถึง 5 เท่า [43]



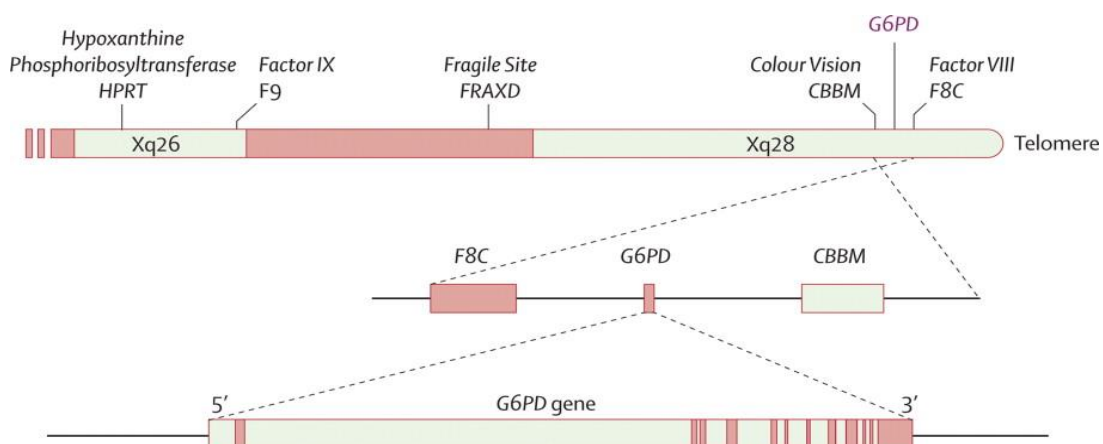
รูปที่ 1 วิถี pentose phosphate และทำงานของเอนไซม์จีซีจีพีดีในการผลิต NADPH ต่อต้านสารอนุมูลอิสระ [40]



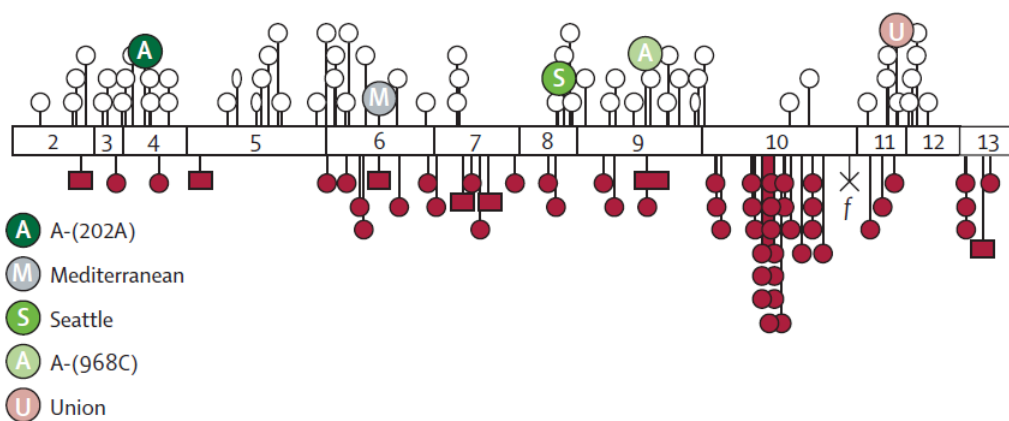
รูปที่ 2 การต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (ด้านซ้าย) การทำงานของเอนไซม์ peroxidase (Prx) ร่วมกับ thioredoxin reductase (TrxR) และ NADPH, (ด้านขวา) การทำงานของเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPx) ร่วมกับ glutathione reductase (GR) และ NADPH [22]

1.2 พันธุศาสตร์ของเอนไซม์จิกพิตี

ยีนที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์จิกพิตีคืออยู่บนโครโมโซม X ตำแหน่งที่ q28 ขนาด 23.18 kbp. และเริ่มมีการศึกษาเพิ่มขึ้นในปี ค.ศ. 1986 [44] 70% ของโปรโมเตอร์เป็นกวานีนและไซโตซีน (GC-rich) ประกอบด้วย 13 exons และ 12 introns ซึ่งสามารถถอดรหัสออกมาได้ขนาด 515 กรดอะมิโน โดย exon ที่ 1 ไม่ถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน exon ที่ 2 และ exon ที่ 13 ถูกถอดรหัสเพียง 120 และ 91 bp. ตามลำดับ ตำแหน่งของยีนจิกพิตีอยู่ใกล้กับยีน Factor 8 (ฮีโมฟีเลีย เอ) และยีนตาบอดสี (ดังรูปที่ 3) [45, 46] ยีนจิกพิตีมีกลายพันธุ์กว่า 140 ตำแหน่ง และมักพบตำแหน่งการกลายพันธุ์บริเวณ exon ที่ 10 และ 11 ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องของการรวมตัวเป็นโมเลกุลเชิงคู่ของเอนไซม์จิกพิตี [47] (ดังรูปที่ 4) โดยส่วนมากเป็นการกลายพันธุ์แบบแทนที่ของเบสทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนหลังจากแปลรหัสพันธุกรรม (translation) [48] ในกลุ่มของผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จิกพิตีรุนแรง (class I: chronic non-spherocytic haemolytic anaemia)



รูปที่ 3 ตำแหน่งของยีนจีซิกพีดีบนโครโมโซมตำแหน่ง Xq28 [40]



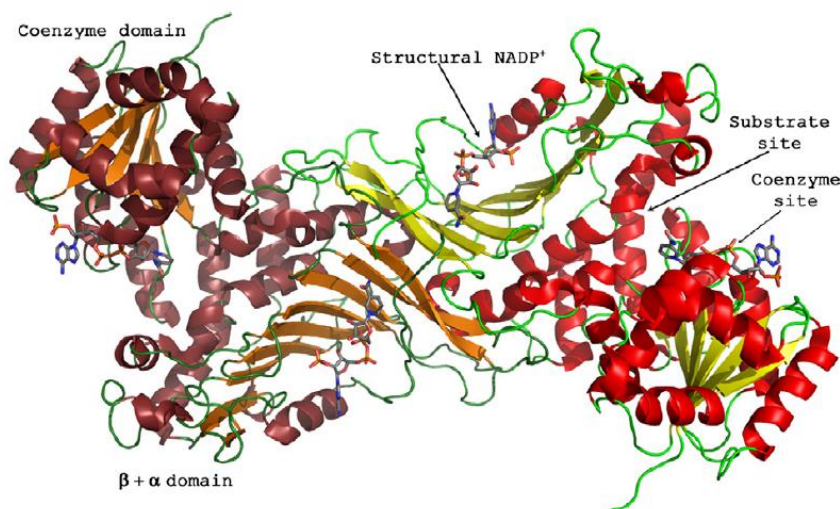
รูปที่ 4 ตำแหน่งการกลายพันธุ์บนยีนจีซิกพีดีที่พบได้บ่อย f = a splice size mutation [40]

ตารางที่ 1 จำนวน exon ขนาดของ exon และ intron บนยีนจีซิกพีดี จากฐาน ensemble [49]

	ขนาด (bp.)		ขนาด (bp.)
Exon 1	466	Intron 1-2	625
Exon 2	128	Intron 2-3	9,857
Exon 3	38	Intron 3-4	95
Exon 4	109	Intron 4-5	551
Exon 5	218	Intron 5-6	671
Exon 6	159	Intron 6-7	177
Exon 7	126	Intron 7-8	365
Exon 8	94	Intron 8-9	447
Exon 9	187	Intron 9-10	139
Exon 10	236	Intron 10-11	104
Exon 11	77	Intron 11-12	105
Exon 12	93	Intron 12-13	97
Exon 13	700		

1.3 โครงสร้างของเอนไซม์จีซิกพีดี

โมเลกุลเชิงเดี่ยวของเอนไซม์จีซิกพีดี (monomer) มีขนาดประมาณ 59 กิโลดัลตัน [50] ในปี ค.ศ. 1994 มีการศึกษาโครงสร้างเอนไซม์จีซิกพีดี *Leuconostoc mesenteroides* พบว่ามีความคล้ายคลึงอย่างมากกับของมนุษย์ โครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์จีซิกพีดีได้ตีพิมพ์ในปี ค.ศ. 1996 (ดังรูปที่ 5) [51] เอนไซม์จีซิกพีดีจะรวมตัวเป็นโมเลกุลเชิงคู่ (dimer) หรือ tetramer ในการทำงาน โมเลกุลเชิงเดี่ยวของเอนไซม์จีซิกพีดีประกอบด้วย 2 โดเมน คือ 1) co-enzyme domain หรือ N-terminal โดเมน: β - α - β Arg72 ทำหน้าที่จับกับไดนิวคลีโอไทด์ (dinucleotide binding site) และ 2) β - α domain ทำหน้าที่เชื่อมต่อแต่ละหน่วยย่อยของเอนไซม์จีซิกพีดี ด้วยลักษณะ α -helix ก่อเกิดเป็นตำแหน่งที่ใช้ในการจับซับสเตรต (substrate binding site) [52]



รูปที่ 5 โครงสร้าง 3 มิติโมเลกุลเชิงคู่ของเอนไซม์จีซิกพีดี [53]

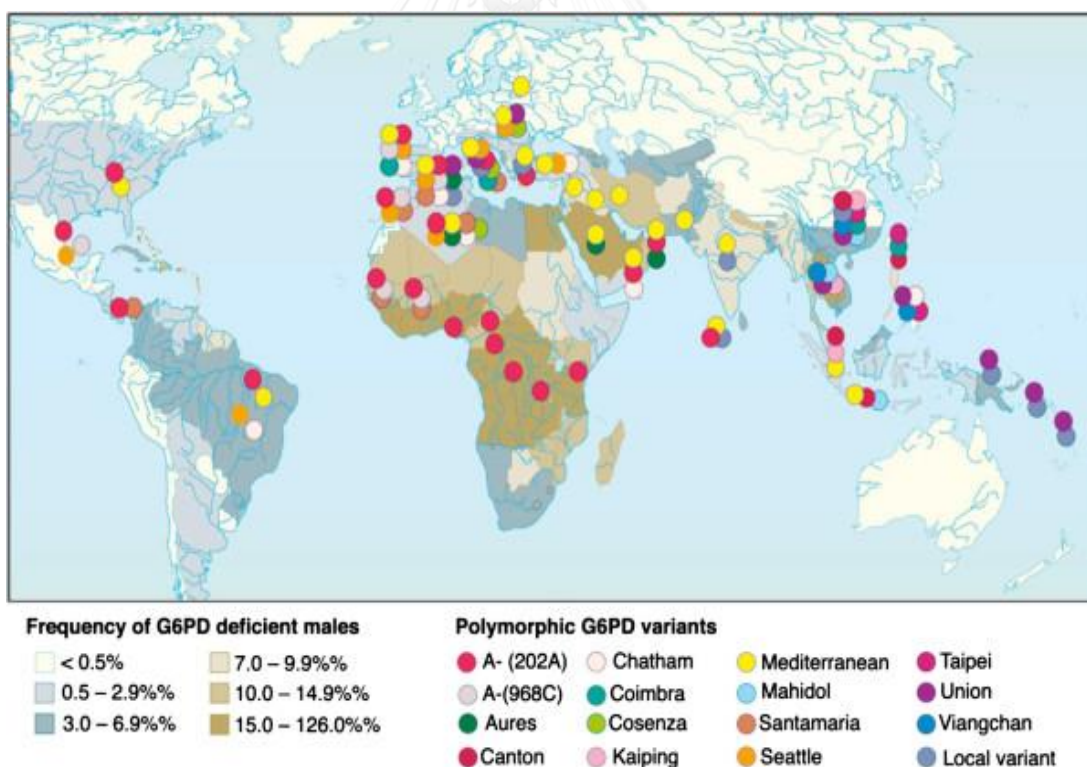
1.4 ภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี

ปี ค.ศ. 1956 มีการรายงานภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีเป็นครั้งแรก เนื่องจากมีผู้ป่วยเกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกเฉียบพลันจากการใช้ยาต้านเชื้อมาลาเรีย (primaquine) [14] ภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีเป็นความผิดปกติทางสร้างเอนไซม์ทั้งโครงสร้างและลักษณะที่ผิดรูปไม่เสถียรหรือมีปริมาณการสร้างเอนไซม์ลดลงทำให้มีระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีลดลง ส่งผลต่อปริมาณ NADPH ในเม็ดเลือดแดงไม่เพียงพอต่อการต้านสารอนุมูลอิสระ [3] เป็นที่รู้จักในนามโรคแพ้วปากอ้า (favism: vicia faba) ซึ่งถ่ายทอดทางพันธุกรรมบนโครโมโซม X จึงพบอุบัติการณ์ที่เกิดขึ้นในผู้ชายมากกว่าผู้หญิง กล่าวคือ เพศชายมีโครโมโซม X เพียง 1 โครโมโซม (XY) ซึ่งจะมีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีได้หากได้รับโครโมโซม X ที่มีความผิดปกติบนยีนจีซิกพีดีจากมารดา (hemizygous) แต่ในเพศหญิงซึ่งมีโครโมโซม X 1 คู่ (XX) สามารถจำแนกความผิดปกติทางจีโนไทป์ (genotype) ได้ 2 รูปแบบคือ 1) heterozygous: มีความผิดปกติของโครโมโซม X 1 โครโมโซม และ 2) homozygous: มีความผิดปกติของโครโมโซม X ทั้ง 2 โครโมโซม จากกระบวนการ X chromosome inactivation (การกดการทำงานของโครโมโซม X 1 โครโมโซมในเพศหญิงเพื่อให้เห็นการแสดงออกทางโครโมโซมเทียบเท่ากับเพศชาย) ทำให้เกิดความหลากหลายของระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีในเพศหญิง heterozygous กล่าวคือ มีการกดการทำงานของโครโมโซม X แบบสุ่มในเม็ดเลือดแดงของกลุ่ม heterozygous หากกดการทำงานของโครโมโซม X ที่ผิดปกติ เม็ดเลือดแดงจะแสดงระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีปกติ แต่หากกดการทำงานของโครโมโซม X ที่ปกติ จะทำให้เม็ดเลือดแดงนั้นมีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีเกิดขึ้นได้ ในกลุ่มเพศหญิง heterozygous จึงมี

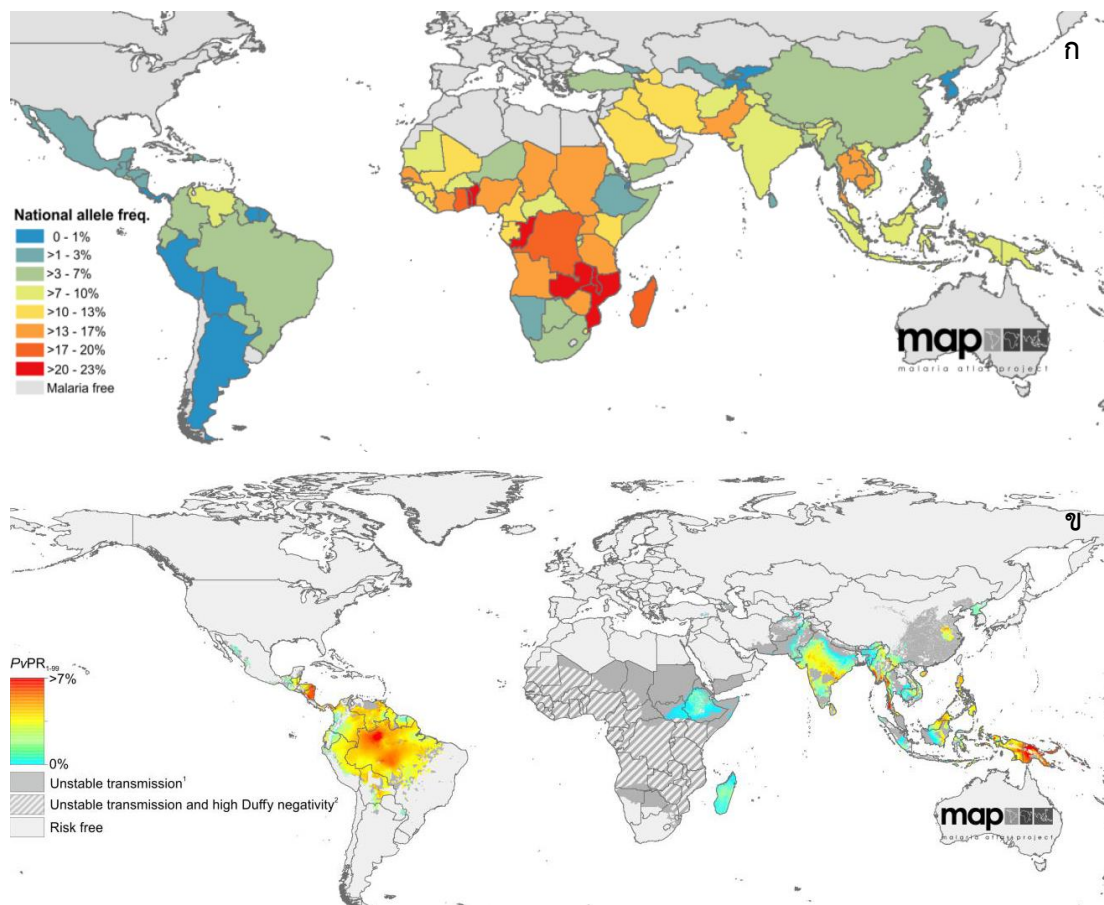
ประชากรของเม็ดเลือดแดงที่มีการแสดงของระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี อยู่ 2 ระดับปะปนกัน (mosaicism)

1.5 ระบาดวิทยา

ประชากรกว่า 400 ล้านคนทั่วโลกมีการกลายพันธุ์บนยีนจีซิกพีดี [4] พบได้บ่อยในแถบทวีปแอฟริกา (35%) ตะวันออกกลาง (6.0%) เอเชีย (4.7%) ยุโรป (3.9%) และบริเวณหมู่เกาะแปซิฟิก (2.9%) (ดังรูปที่ 6) จากการอพยพย้ายถิ่นฐานปัจจุบันจึงพบการกลายพันธุ์บนยีนจีซิกพีดี ในแถบทางตอนเหนือและตอนใต้ของอเมริกา (3.4%) [5] และทางตอนเหนือของทวีปยุโรปเพิ่มขึ้น [54] เป็นที่น่าสนใจว่าบริเวณที่มีการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดี มีการแพร่ระบาดของโรคมาลาเรียเป็นอย่างมาก [55] (ดังรูปที่ 7) จึงเกิดสมมุติฐานว่า การกลายพันธุ์บนยีนจีซิกพีดี จะช่วยป้องกันจากการติดเชื้อมาลาเรีย (*Plasmodium falciparum*) [56-59] ปัจจุบันได้มีผลงานวิจัยมากมายที่พยายามหาความสัมพันธ์ของทั้งสองโรค มีการศึกษาพบว่าเม็ดเลือดแดงที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีมีอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียช้ากว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ [60-63] แต่กลไกการป้องกันนั้นยังมีทราบแน่ชัด



รูปที่ 6 ความชุกและความหลากหลายของภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีที่พบทั่วโลก [64]



รูปที่ 7 ความชุกภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีในเพศชาย (ก) และโรคมาลาเรีย *P. Vivax* (ข) ทั่วโลก โดยลักษณะการแพร่ระบาดของโรคมาลาเรีย มีความใกล้เคียงกับพื้นที่ที่มีการกลายพันธุ์ของภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี [65, 66]

ในประเทศไทยจะพบประชากรที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี เพศชายประมาณ 11.1% และเพศหญิง 5.8% และพบในเด็กแรกเกิด (neonate with hyperbilirubinemia) เพศชาย 22.1% เพศหญิง 10.1% โดยจะพบความผันแปรของยีนจีซิกพีดี ชนิดเวียงจันทน์ (Viangchan 871 G>A: 54%) มากที่สุด Canton (1376 G>T: 10%), Mahidol (487 G>A: 8%), Kaiping (1388 G>A: 5%), Union (1360 C>T: 2.6%), และ Chinese-5 (1024 C>T: 2.6%) รองลงมาตามลำดับ [6]

1.6 การจัดแบ่งกลุ่มผู้มภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี

การจัดแบ่งกลุ่มผู้มภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี ตามหลักเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก World Health Organization (WHO) ได้จัดแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ตามระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีและอาการทางคลินิก ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การจัดแบ่งกลุ่มผู้มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีตามหลักเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก World Health Organization (WHO) [67, 68]

กลุ่ม	ระดับการทำงานของเอนไซม์	อาการ	ตัวอย่างความผันแปร
I	ภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีรุนแรง (<10% ของคนปกติ)	ภาวะ Congenital non-spherocytic haemolytic anaemia: CNSHA	Bangkoknoi
II	ภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีรุนแรง (<10% ของคนปกติ)	ภาวะเม็ดเลือดแดงแตกเฉียบพลัน (AHA)	Mediterranean, Kaiping, Viangchan, Canton
III	ภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีปานกลาง (10-60% ของคนปกติ)	ไม่มีอาการ	Mahidol
IV	ระดับการทำงานปกติ (60%-150% ของคนปกติ)	ไม่มีอาการ	-
V	ระดับการทำงานเพิ่มสูง (>150% ของคนปกติ)	ไม่มีอาการ	Hektoen

1.7 อาการทางคลินิกของภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีและแนวทางการรักษา

ภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีเป็นภาวะที่ไม่ส่งผลต่อคุณภาพชีวิต และมักไม่แสดงอาการ จึงไม่ได้มีการระมัดระวังการใช้ชีวิตประจำวัน จนกระทั่งได้รับสารกระตุ้นให้เกิดสภาวะ oxidative stress เช่น การได้รับยา การรับประทานอาหาร โดยเฉพาะถั่วปากอ้า (fava beans) และการติดเชื้อโรคต่างๆ เป็นต้น [69] ซึ่งจะส่งผลให้เกิดเม็ดเลือดแดงแตกอย่างเฉียบพลัน (acute hemolytic anemia: AHA) จะพบว่ามีภาวะโลหิตจาง (anemia) ปวดหลัง อ่อนเพลีย ปัสสาวะมีสีดำ (hemoglobinuria) ภาวะดีซ่าน (jaundice) มีการเพิ่มปริมาณของ unconjugated bilirubin lactate dehydrogenase และ reticulocytosis [70] ต้องได้รับการถ่ายเลือดทันที (blood transfusion) สำหรับกรณีผู้ป่วยมีภาวะไตล้มเหลวจำเป็นต้องได้รับการฟอกเลือดร่วมด้วย (hemodialysis) [71]

1) ภาวะโลหิตจางเนื่องจากเกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงจากการได้รับยา

(Drug-induced haemolytic anemia)

ผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี เมื่อได้รับยา primaquine จะเกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงเฉียบพลัน ทำให้เกิดภาวะโลหิตจางและภาวะดีซ่านภายหลังได้รับยาภายใน 24-72 ชั่วโมง ปัสสาวะสีดํา (haemoglobinuria) และพบ Heinz bodies [72] บนเสมียร์เลือด ด้วยการย้อมสี methyl violet (ดังรูปที่ 8)

ตารางที่ 3 ยาและสารเคมีที่ควรระมัดระวังและหลีกเลี่ยงในกลุ่มผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี [40]

ยาด้านเชื้อ มาลาเรีย	Primaquine	Chloroquine	Mepacrine*
	Pamaquine	Quinine*	
ยาด้านจุลินทรีย์ ชนิดอื่นๆ	Dapsone	Nalidixic acid	Sulfanilamide
	Furazolidone	Chloramphenicol	Sulfamethoxazole
	Mafenide cream	Sulfapyridine	Sulfacetamide
	Nitrofurantoin	Niridazole	Thiazolesulfone
	Ciprofloxacin	Quinacrine	Sulfadimidine
	Furazolidone	Aldesulfone	Sulfadiazine
	Sulfafurazole	Aminosalicyclic acid	
ยาแก้ปวดลดไข้	Acetanilide	Paracetamol*	Phenazopyridine
	Aspirin	Phenacetin*	
ยาด้านมะเร็ง	Flutamide	Rasburicase	Doxorubicin
ยาอื่นๆ	Vitamin K	Ascorbic acid	Glibenclamide
	Sulfasalazine	Mesalazine	Probenecid
สารเคมีอื่นๆ	Phenylhydrazine	Naphtalene	Lawson
	Trinitrotoluene	Urate oxidase	Toluidine blue
	Methylene blue	Isobutyl nitrite	สารสกัด Acalypha
หมายเหตุ*	ผลกระทบยังไม่แน่ชัด		

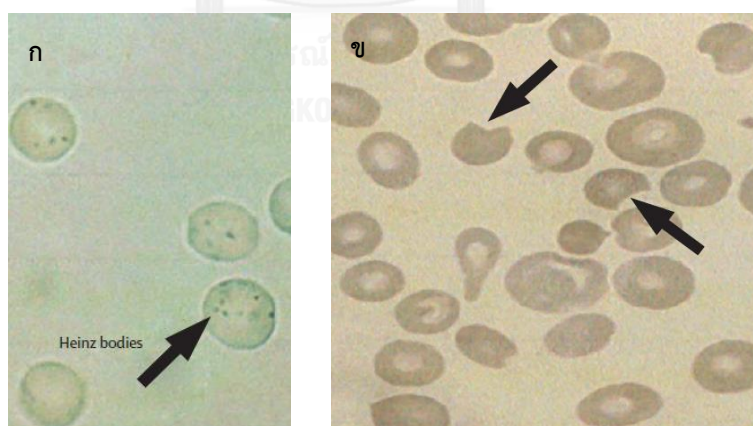
2) ภาวะโลหิตจางเนื่องจากเกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงจากการติดเชื้อโรค

(Infection-induced haemolytic anemia)

มีการรายงานว่าการติดเชื้อโรคเป็นสาเหตุต่างๆที่พบได้บ่อยว่าทำให้เม็ดเลือดแดงแตกจนเกิดภาวะโลหิตจางในผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี อาทิเช่น โรคไวรัสตับอักเสบ เอ (hepatitis virus A) ไวรัสตับอักเสบ บี (hepatitis virus B) ไวรัสตับอักเสบ อี (hepatitis virus E) ไข้ไทฟอยด์ (typhoid fever) cytomegalovirus (CMV) และ ภาวะปอดบวม (pneumonia) [73-76] เป็นต้น ทั้งนี้ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น อายุ การได้รับยา และการทำงานของตับ เป็นต้น อาจพบร่วมกับการอุดตันของท่อไต ตรวจพบฮีโมโกลบินคาสต์ (hemoglobin casts) และมีภาวะไตล้มเหลวเฉียบพลันตามมา (acute renal failure) ซึ่งพบน้อยในเด็ก [77]

3) อาการแพ้ถั่วปากอ้า (favism)

อาการแพ้ถั่วปากอ้า เป็นภาวะโลหิตจางที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดงหลังรับประทานถั่วปากอ้า ผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี ไม่ทั้งหมดที่จะมีอาการแพ้ถั่วปากอ้า แต่เชื่อกันว่าอาการแพ้ถั่วปากอ้ามีความเกี่ยวข้องเฉพาะกับการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 563 C>T (Mediterranean) [78, 79] สาร divicine, convicine และ isouramil เป็นสารพิษในถั่วปากอ้าที่กระตุ้นให้เกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกในผู้ป่วย [80] และสามารถส่งผ่านจากแม่สู่ลูกได้ในระยะให้นมบุตร [81] ผู้ที่มีอาการแพ้ถั่วปากอ้าจะมีการกำจัดเม็ดเลือดแดงอย่างรวดเร็ว ทำให้ลักษณะเม็ดเลือดแดงที่ปรากฏบนเสมียร์เลือดมีลักษณะผิดปกติ (anisopoikilocytosis) (ดังรูปที่ 8)



รูปที่ 8 ลักษณะเม็ดเลือดแดงที่ปรากฏบนเสมียร์เลือด (ก) heinz body (hemoglobin degradation) เมื่อย้อมด้วยสี supravital stain (ข) ลักษณะเม็ดเลือดแดงที่มีรูปร่างผิดปกติ (bite cells: schistocyte) [40]

4) ภาวะตัวเหลืองในเด็กแรกเกิด (neonatal jaundice)

ภาวะตัวเหลืองในเด็กแรกเกิดมักปรากฏใน 1-4 วัน หลังคลอด ซึ่งมีลักษณะอาการคล้ายกับ alloimmunisation ของหมู่เลือด Rh ภาวะตัวเหลืองนี้สามารถทำให้เกิดการทำลายเซลล์สมองได้ (kernicterus) แต่พบได้น้อย [82-84] ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆร่วมด้วย เช่น สภาวะแวดล้อม (การบุรกลูกเหม็นที่ใส่ไว้ในตู้เสื้อผ้าเด็ก) [85] การได้รับยาของมารดา [86] พันธุกรรม [87] เป็นต้น เด็กแรกเกิดที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีร่วมกับการกลายพันธุ์บนโปรโมเตอร์ของยีน uridine-diphosphate-glucuronyltransferase1 (UGT1A1: Gilbert's syndrome) จึงเสี่ยงต่อภาวะตัวเหลืองในเด็กแรกเกิดมากกว่าปกติ [88] เมื่อตรวจพบ unconjugated bilirubin สูงกว่า 150 $\mu\text{mol/L}$ ต้องได้รับการรักษา phototherapy เพื่อป้องกันการทำลายเซลล์สมอง หากสูงกว่า 300 $\mu\text{mol/L}$ จำเป็นต้องได้รับการถ่ายเลือด [43]

5) ภาวะโลหิตจางเรื้อรังแบบเม็ดเลือดแดงไม่กลม

ภาวะโลหิตจางเรื้อรังแบบเม็ดเลือดแดงไม่กลม หรือ ภาวะ congenital non-spherocytic haemolytic anemia: CNSHA เป็นอาการที่พบได้น้อยและมักพบในเพศชาย เกิดจากตำแหน่งการกลายพันธุ์บนยีนจีซิกพีดีบางตำแหน่งเท่านั้น ส่งผลให้ผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี เกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกเรื้อรัง การกลายพันธุ์ของผู้ที่มีภาวะ congenital non-spherocytic haemolytic anemia นี้ จะถูกจัดอยู่ในกลุ่ม class I ตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก [17] มักพบในผู้ที่มีประวัติภาวะตัวเหลืองในเด็กแรกเกิดรุนแรงมาก่อน ตรวจพบปริมาณ bilirubin, lactose dehydrogenase เพิ่มขึ้น มีสภาวะ splenomegaly, gallstone, reticulocytosis แนวทางการรักษาคือการเปลี่ยนถ่ายเลือด ร่วมกับการทานวิตามินบี 9 เสริม (folic acid) [43] ผู้ป่วยบางรายมีอาการดีขึ้นเมื่อตัดม้าม (splenectomy) [89]

1.8 อายุขัยเม็ดเลือดแดงในผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี

เม็ดเลือดแดงมีกระบวนการผลิตโปรตีนและเอนไซม์ต่างๆ ในระยะตัวอ่อนและหยุดกระบวนการผลิตโปรตีนหลังจากมีการกำจัดนิวเคลียสออกจากเซลล์ไม่ได้ทำการผลิตตลอดช่วงอายุขัยของเซลล์ จึงทำให้ปริมาณเอนไซม์จีซิกพีดีแปรผกผันกับอายุขัยเม็ดเลือดแดง กล่าวคือ ปริมาณเอนไซม์จีซิกพีดีลดลงเมื่ออายุขัยของเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้น ภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีส่งผลกระทบต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ และการป้องกันสภาวะเครียดของเซลล์ ทำให้เม็ดเลือดแดงง่ายต่อการแตกทำลาย โดยทั่วไปเม็ดเลือดแดงของคนปกติ มีครึ่งอายุขัยเฉลี่ยประมาณ 60 วัน จากการศึกษาครึ่งอายุขัยในกลุ่มผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีพบว่า ผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี (Mediterranean) มีครึ่งอายุขัยของเม็ดเลือดเฉลี่ยประมาณ 22.9 ± 0.7 วัน และเมื่อได้รับประทาน

วิตามินอีที่ทำหน้าที่เสมือนสารต้านอนุมูลอิสระพบว่า ครึ่งอายุขัยของเม็ดเลือดแดงในผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ 25.1 ± 0.6 วัน [90]

2. การตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี

วิธีมาตรฐาน (standard method) ในการตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีที่ได้รับการยอมรับจากองค์การอนามัยโลก คือ การตรวจวัดเชิงปริมาณวิเคราะห์ (quantitative method) โดยวัดปริมาณ NADPH ที่ผลิตขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี ด้วยเทคนิค spectrophotometric ต่อมาได้มีการพัฒนาการตรวจวัดเชิงกึ่งปริมาณวิเคราะห์ (semi quantitative method) อีกมากมาย อาทิเช่น dye-reduction test (brilliant cresyl blue: BCB), fluorescent spot test [91] เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจเหล่านี้เป็นเพียงการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี (screening test) เท่านั้น จึงมีความจำเป็นต้องตรวจเชิงปริมาณวิเคราะห์ในการยืนยันผลการตรวจสำหรับผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี [92, 93] จากที่กล่าวข้างต้นเป็นการตรวจวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี (phenotypic methods) จากกระบวนการ random X-chromosome inactivation ทำให้การตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยเทคนิคทาง phenotypic method ในกลุ่ม heterozygous เป็นไปได้ยาก จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคการตรวจทาง phenotypic method ให้สามารถจำแนกกลุ่ม heterozygous ได้ อาทิเช่น cytochemical staining และ cytofluorometric assay ปัจจุบันมีความก้าวหน้าเป็นอย่างมากทางด้านอณูชีววิทยาจากการศึกษาการสับพันธุกรรมในมนุษย์ จึงมีการนำเทคนิคการตรวจทางอณูชีววิทยา มาศึกษาความผันแปรบนยีนจีซิกพีดี โดยเทคนิคที่ได้รับความนิยมคือ PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) ในการดูตำแหน่งและชนิดความผันแปรบนยีนจีซิกพีดี ซึ่งจะสามารถจำแนกได้เป็น wild-type (คนปกติ) ผู้มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีชนิด hemizygous (เพศชาย) และ heterozygous, homozygous (เพศหญิง) ดังนั้นจึงสามารถจำแนกเทคนิคการตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีออกเป็น 2 ประเภทคือ

2.2.1 การตรวจวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี (phenotypic method)

- Fluorescent spot test
- Ascorbate-cyanide screening test
- Methemoglobin reduction test
- CareStart™ G6PD deficiency
- Brilliant cresyl blue test
- BinaxNow® G6PD
- Cytochemical staining
- Cytofluorometric assay
- Biochemical G6PD activity

2.2.2 การตรวจความผิดปกติทางพันธุกรรมบนยีนจีซิกพีดี (genotypic method)

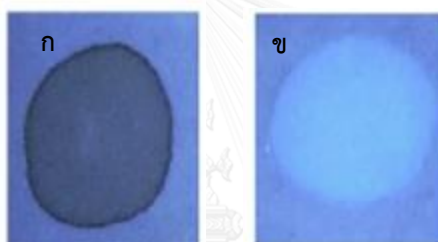
- Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism

2.1 การตรวจวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี

(Phenotypic method)

1) Fluorescent spot test

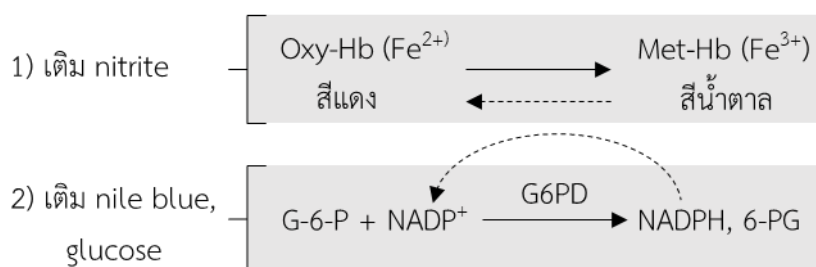
Fluorescent spot test (FST) เป็นวิธีการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี เมื่อเติม G6P และ NADP ให้มากเกินพอ ร่วมกับตัวอย่างเลือด บ่มแล้วหยดลงบนกระดาษกรอง คนปกติจะสามารถผลิต NADPH (ดังรูปที่ 8) ซึ่งมีคุณสมบัติเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ภายใต้แสงยูวี (ดังรูปที่ 9) ดังนั้นผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีจะไม่สามารถสังเกตเห็นจุดเรืองแสงบนกระดาษกรองภายใต้แสงยูวีได้ [91]



รูปที่ 9 ตัวอย่างผลการตรวจคัดกรองผู้มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี (ก) ผลผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี (ข) ผลคนปกติ [94]

2) Methemoglobin reduction test

Methemoglobin reduction test (MRT) เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี ซึ่งอาศัยหลักการเปลี่ยนสีของน้ำเลือดในการแปลผล ที่เกิดจากการเติมสารไนไตรต์ (nitrite) และ Nile blue + กลูโคส ตามลำดับ (ดังรูปที่ 10) เมื่อเติม nitrite จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเปลี่ยน oxyhemoglobin (สีแดง) เป็น methemoglobin (สีน้ำตาล) คนปกติที่สามารถผลิต NADPH ได้ เมื่อเติมตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst: Nile blue หรือ methylene blue) ร่วมกับกลูโคส methemoglobin (สีน้ำตาล) จะถูก NADPH รีดิวซ์กลับเป็น oxyhemoglobin (สีแดง) ฉะนั้นผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีสีของน้ำเลือดจึงไม่สามารถเปลี่ยนกลับมาเป็นสีแดงดังเดิมได้ [95]



รูปที่ 10 ปฏิกิริยาของการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยวิธี MRT [96]

3) Brilliant cresyl blue test

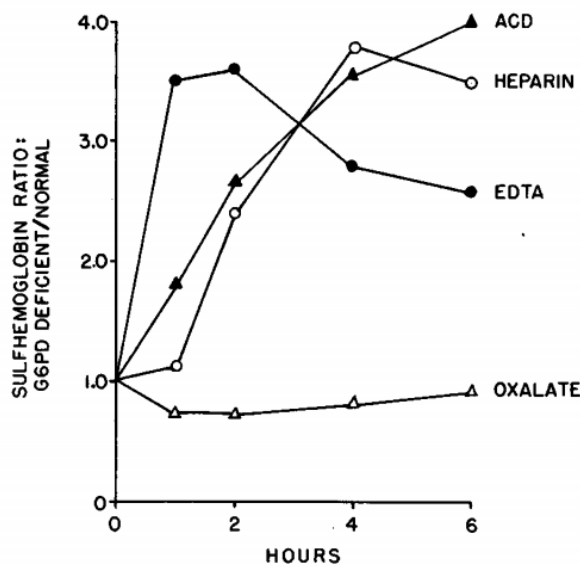
Brilliant cresyl blue (BCB) ทำหน้าที่เป็นตัวบ่งชี้ที่แสดงถึงการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี ในปฏิกิริยา เมื่อนำ hemolysate ที่มีเอนไซม์จีซิกพีดีบ่มร่วมกับ G6P NADP และ BCB สีของ BCB จะถูก NADPH ที่ผลิตได้จากการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี (ดังรูปที่ 1) รีดิวซ์ให้กลายเป็นสารไม่มีสี (decolorization) ดังนั้นคนปกติ จะใช้เวลาในการเปลี่ยนสี (decolorization time) ประมาณ 30-50 นาที แต่ในกลุ่มผู้มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีรุนแรง (hemizygous, homozygous) จะใช้เวลาในการเปลี่ยนสี 5 ชม.ขึ้นไป และในกลุ่มที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีปานกลางหรือพาหะ (heterozygous) จะใช้เวลาประมาณ 120-180 นาที นอกจาก BCB จะทำหน้าที่เป็นตัวบ่งชี้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแล้ว BCB ยังทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาอีกด้วย [97]

4) Ascorbate-cyanide screening test

Sodium ascorbate ที่ถูกเติมผสมกับเลือดทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับ oxyhemoglobin ได้ H_2O_2 และผลผลิตจากฮีโมโกลบินที่ถูกออกซิไดซ์ เช่น sulfhemoglobin, methemoglobin ซึ่งมีสีน้ำตาล อ่านผลการเปลี่ยนสีของน้ำเลือดจากสีแดงเป็นสีน้ำตาลซึ่งในผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี จะถูกเปลี่ยนสีอย่างรวดเร็วภายใน 1-2 ชั่วโมงจากตัวอย่างเลือดจากสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA แต่ในคนปกติที่สามารถผลิต NADPH จากกระบวนการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี จะสามารถสร้าง reduced glutathione (GSH) มาทำงานร่วมกับเอนไซม์ glutathione peroxidase ในการกำจัด H_2O_2 ให้เป็นน้ำ และป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของฮีโมโกลบิน ทำให้การเปลี่ยนสีของน้ำเลือดจากสีแดงเป็นสีน้ำตาลในคนปกติเกิดได้ล่าช้ากว่าผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี โดยในปฏิกิริยานี้จะเติม sodium cyanide รวมด้วยเพื่อยับยั้งการกำจัด H_2O_2 ของเอนไซม์ catalase

รูปที่ 11 แสดงผลกระทบบของชนิดสารกันเลือดแข็งต่อ ต่อการตรวจ ascorbate-cyanide screening test จากกราฟสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA ให้ผลการตรวจ ascorbate-cyanide screening test รวดเร็วที่สุด (1-2 ชั่วโมง) แต่สารกันเลือดแข็งชนิด oxalate ไม่สามารถนำมาใช้ใน

การตรวจวินิจฉัยจำแนกผู้มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีออกจากคนปกติด้วยวิธีนี้ได้ เนื่องจากให้ปริมาณผลผลิตของ sulfhemoglobin ไม่แตกต่างกัน จึงสังเกตเห็นความแตกต่างของสีได้ยาก [98]



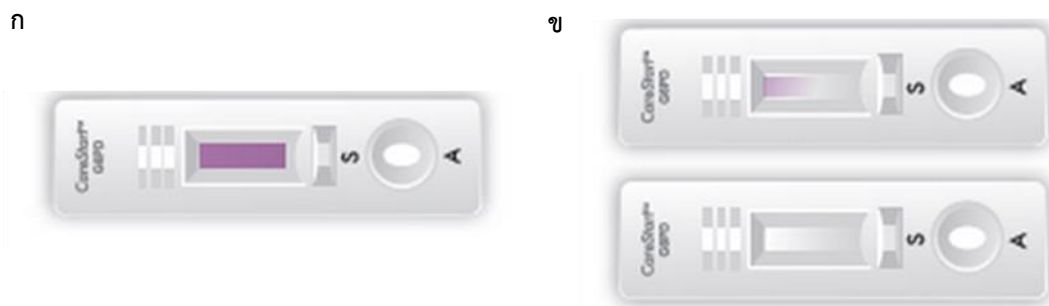
รูปที่ 11 ผลกระทบของชนิดสารกันเลือดแข็งต่อการตรวจ ascorbate-cyanide screening test [4]

5) ชุดตรวจคัดกรอง CareStart™ G6PD deficiency

ชุดตรวจคัดกรอง CareStart™ G6PD deficiency จากบริษัท AccessBio อาศัยหลักการความสามารถของ NADPH ที่ผลิตได้จากการทำของเอนไซม์จีซิกพีดี ในการรีดิวซ์ nitro blue tetrazolium เช่นเดียวกับหลักการของ cytochemical staining แต่ชุดตรวจคัดกรอง CareStart™ G6PD deficiency จะสังเกตเห็นสีที่ปรากฏขึ้นได้ด้วยตาเปล่าบนกระดาษ (chromatography assay) ผลที่อ่านได้ (ดังรูปที่ 12)

6) ชุดตรวจคัดกรอง BinaxNow® G6PD

บริษัท Alere™ ได้ผลิตชุดตรวจคัดกรอง BinaxNow® G6PD อาศัยหลักการความสามารถของ NADPH ที่ผลิตได้จากการทำของเอนไซม์จีซิกพีดีในการรีดิวซ์ nitro blue tetrazolium เช่นเดียวกับหลักการของ cytochemical staining ร่วมกับหลักการ chromatography assay ทำให้สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่าบนกระดาษ จากแถบสีของ formazan ที่เกิดขึ้น (ดังรูปที่ 13) โดยการตรวจด้วยชุดตรวจนี้จะต้องมีการควบคุมอุณหภูมิไม่ให้ต่ำกว่า 28 °C และสูงกว่า 25 °C เนื่องจากสามารถอ่านผลผลิตพลาดเป็นผลบวกปลอมได้



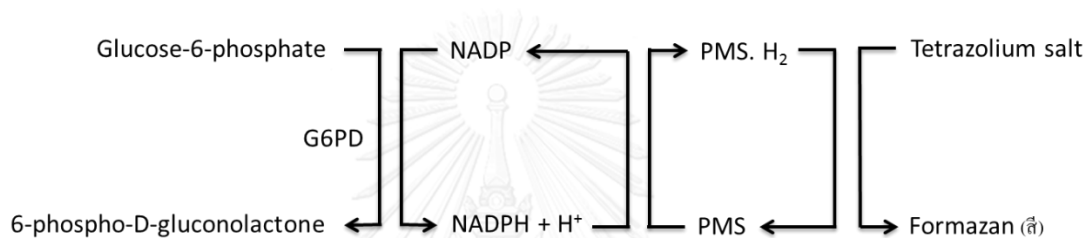
รูปที่ 12 ตัวอย่างผลของชุดตรวจคัดกรอง CareStart™ G6PD deficiency (ก) ผลของคนปกติ จะสังเกตเห็นแถบสีม่วงของ formazan ที่เกิดจากการถูก NADPH รีดิวซ์ (ข) ผลของผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีจะไม่ปรากฏแถบสีม่วง หรือปรากฏแถบสีขาว [99]



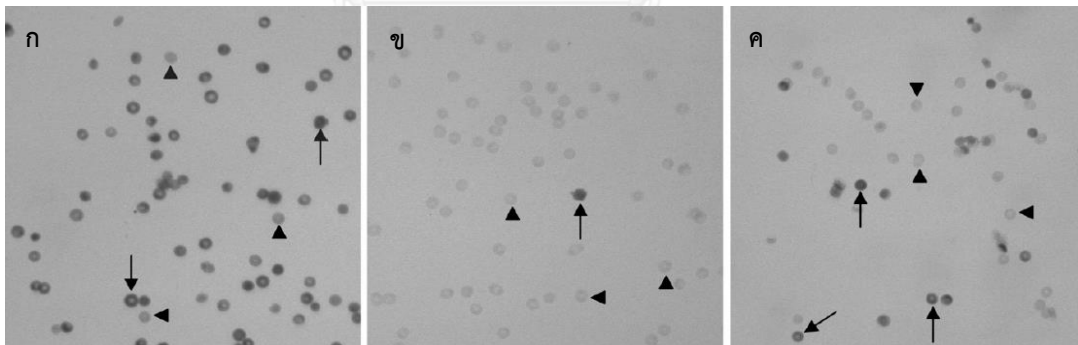
รูปที่ 13 (ก) ชุดตรวจคัดกรอง BinaxNow® G6PD และ (ข) การอ่านผลชุดตรวจคัดกรอง BinaxNow® G6PD คนปกติ (ด้านซ้าย) ผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี (ด้านขวา) [100]

7) Cytochemical staining

Cytochemical staining อาศัยหลักการย้อมสีเซลล์ด้วย tetranitro blue tetrazolium (TNBT) โดยเม็ดเลือดแดงที่สามารถผลิต NADPH จากวิถี pentose phosphate ที่มีคุณสมบัติเป็น reducing agent จะรีดิวซ์ 1-methoxyphenazine methosulphate (1-methoxyPMS) แล้วเปลี่ยน TNBT เป็น Formazan (ดังรูปที่ 14) เกิดสีภายในเซลล์ [101] (ดังรูปที่ 15) การย้อมด้วยวิธีนี้ใช้ตัวกลางเป็น polyvinyl alcohol (PVA) ที่ผสมด้วย NADP, G6P, MgCl₂, Na₃N, TNBT, 1-methoxyPMS และ phosphate buffer (pH 7.0) บ่มร่วมกับเม็ดเลือดแดงที่ 46 °C เป็นเวลา 90 นาที ในที่มีดพร้อมทั้งมีการเขย่าตลอดเวลา [102] วิธีการย้อมนี้สามารถจำแนกเม็ดเลือดแดงแต่ละเม็ดตามระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี



รูปที่ 14 ปฏิกิริยาการรีดิวซ์ tetrazolium salt จากการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี [103]

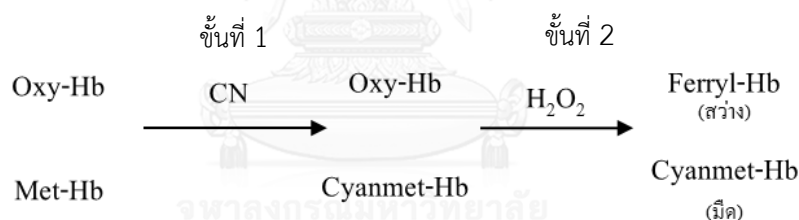


รูปที่ 15 เม็ดเลือดแดงที่ผ่านการย้อมสีด้วยวิธี cytochemical โดยเม็ดเลือดแดงที่มีระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีจะติดสีเข้มของ formazan (ลูกศรชี้) (ก) คนปกติ เม็ดเลือดแดงที่ย้อมไม่ติดสีคือเม็ดเลือดแดงตัวแก่ (ข) ผู้มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี (homogenous, hemizygous) เม็ดเลือดแดงที่ย้อมติดสีคือเม็ดเลือดแดงตัวอ่อน (ค) ผู้มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี (heterozygous) แสดงลักษณะร่วมระหว่างเม็ดเลือดแดงที่มีเอนไซม์จีซิกพีดีและเม็ดเลือดแดงที่พร่องเอนไซม์จีซิกพีดี [22]

Cytochemical staining สามารถใช้เทคนิคทาง flow cytometry ในการตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดแดงต่อความเข้มข้นของการเรืองแสงได้อีกด้วย เนื่องจากเม็ดเลือดแดงที่มีระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีจะย้อมติดผลึกสีของ formazan ซึ่งมีความเข้มข้นของแสงน้อยกว่าเม็ดเลือดแดงที่พร่องเอนไซม์จีซิกพีดี (autofluorescent) [104]

8) Cytofluorometric assay

จากการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยวิธี methemoglobin reduction test ต่อมามีการพัฒนาให้สามารถอ่านผลของ methemoglobin reduction test ได้ด้วยเทคนิค flow cytometry assay โดยการเติม cyanide (CN) และ H_2O_2 ตามลำดับ (ดังรูปที่ 16) ขั้นที่ 1 เมื่อเติม CN, CN จะทำปฏิกิริยาเฉพาะกับ methemoglobin ได้เป็น cyanmethemoglobin ฉะนั้น oxyhemoglobin จึงไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง โดย cyanmethemoglobin ที่ได้จะไม่เรืองแสง ขั้นที่ 2 เมื่อเติม H_2O_2 , H_2O_2 จะทำให้เกิดอนุพันธ์ของ protoporphyrin และ malonyldialdehyde (MDA; การตกตะกอนของฮีโมโกลบินที่ไม่เสถียรภาพ) ซึ่งผลผลิตที่ได้จากขั้นที่ 2 ในคนปกติ สามารถเรืองแสงและตรวจจับได้ด้วยเทคนิค flow cytometry assay จึงสามารถนำมาใช้เพิ่มประสิทธิภาพในการอ่านผลของเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยวิธี methemoglobin reduction test [96]



รูปที่ 16 หลักการของเทคนิค cytofluorometric assay [96]

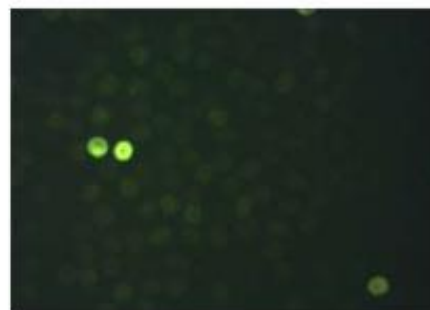
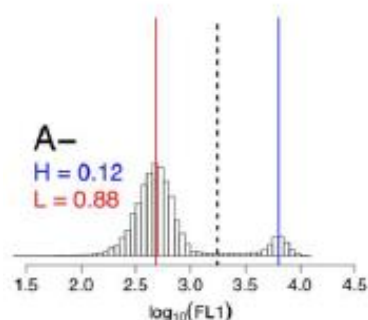
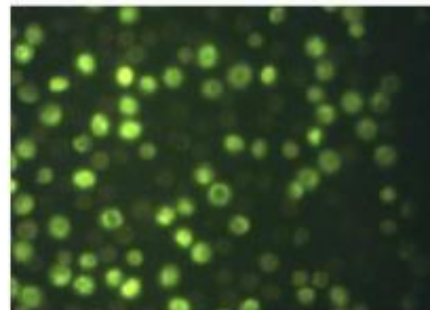
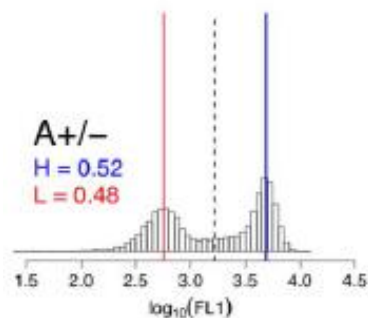
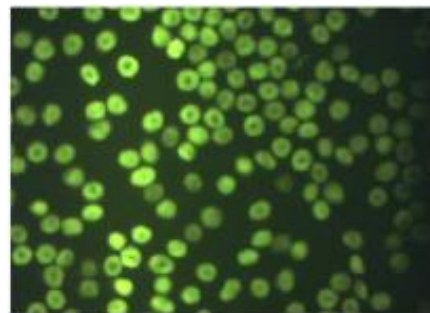
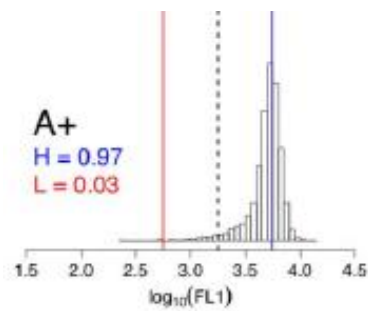
9) Biochemical G6PD activity

Biochemical G6PD activity เป็นวิธีการตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีมาตรฐานด้วยเทคนิค spectrophotometry assay โดยวัดปริมาณ NADPH ที่ผลิตได้จากการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร บั่นล้างเม็ดเลือดแดงเข้มข้น (pack red cell) และทำให้แตก เพื่อสกัดเอนไซม์จีซิกพีดีออกมาออกเซลล์ เติมซับสเตรด (G6P) และโคแฟกเตอร์เอนไซม์ (NADP) เกินพอ เพื่อตรวจวัดเฉพาะความสามารถของเอนไซม์จีซิกพีดีแต่ละคนโดยไม่ขึ้นอยู่กับปริมาณของสารอื่นๆในปฏิกิริยา รายงานปริมาณค่าดูดกลืนแสง 340 นาโนเมตร ที่วัดได้จาก spectrophotometry assay (mU/ml) เทียบกับค่าฮีโมโกลบิน (g/dl) หรือ จำนวนเม็ดเลือดแดง

(cell/ml) เพื่อรายงานผล ดังสมการที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ซึ่งได้รับความนิยมรายงานในหน่วย mU/gHb ดังสมการที่ 1 [105]

$$\text{G-6-PD activity (mU/gHb)} = \frac{\text{G6PD concentration (mU/ml)} \times 100}{\text{Hb (g/dl)}} \dots\dots\dots (1)$$

$$\text{G-6-PD activity (mU/10}^9 \text{ erythrocytes)} = \frac{\text{G6PD concentration (mU/ml)}}{\text{Rbc count (cell/ml)}} \dots\dots\dots (2)$$



รูปที่ 17 ผลการตรวจ cytofluorometric assay (ด้านซ้าย) กราฟแท่งจากเครื่อง flowcytometer (A+= wild type, A+/-= heterozygous, A-= deficient, H= ferryl-Hb, L= cyanmet-Hb) (ด้านขวา) ภาพเม็ดเลือดแดงจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ [96]

2.2 การตรวจความผิดปกติทางพันธุกรรมบนยีนจีซิกพีดี

(Genotypic method)

ปัญหาในการตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี คือ ผู้ที่มีภาวะเม็ดเลือดแดงแตกเฉียบพลัน รวมถึงทารกแรกคลอดที่มีอายุต่ำกว่า 30 วัน (neonate) หรือผู้ที่มีปริมาณเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนสูง (reticulocyte) ทำให้ผลการวินิจฉัยด้วยวิธีมาตรฐานเป็นผลลบปลอมได้ เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนมีระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีสูงกว่าเม็ดเลือดแดงตัวแก่ [106] และกลุ่ม heterozygous ที่มีการแสดงออกแบบ mosaicism ซึ่งมีระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีในช่วงระหว่างผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีและคนปกติจึงเป็นไปได้ยากในการที่จะตรวจวินิจฉัยได้ถูกต้อง จึงมักมีการตรวจยืนยันในระดับโมเลกุลของเอนไซม์จีซิกพีดีว่ามีจีโนไทป์และลักษณะการกลายพันธุ์แบบใด โดยพื้นฐานการตรวจคือการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณที่ต้องการตรวจด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) กรณีที่ต้องการทราบความผันแปร (variant) โดยจำเพาะชนิดสามารถใช้เทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) หรือเทคนิค multiplex PCR ในการศึกษา อ่านผลการตรวจด้วยเทคนิค gel electrophoresis แต่หากต้องการทราบภาพรวมของลำดับเบสทั้งหมดเทียบกับคนปกติ ก็สามารถทำได้โดยใช้เทคนิคการ sequencing ซึ่งปัจจุบันสามารถทำได้อย่างรวดเร็วและกำลังมีความนิยมแพร่หลายมากยิ่งขึ้น

1) PCR-RFLP

Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) เป็นการนำ 3 เทคนิคมาใช้ร่วมกันคือ polymerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP), gel electrophoresis

Polymerase chain reaction (PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณ DNA สายสั้นๆ ตรงบริเวณตำแหน่งที่ต้องการซึ่งเกิดจากการออกแบบ primer 1 คู่ Forward primer และ Reverse primer ให้ครอบคลุมช่วงที่ต้องการตรวจเช็คตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดี ความยาวของช่วงที่ศึกษามากไม่เกิน 900 bp. PCR อาศัยหลักการการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ที่นำเบส dNTP ชนิดต่างๆ (A, C, T, G) มาต่อท้าย primer ให้มีลักษณะคู่สมกับ DNA ต้นแบบ (DNA template) โดยจะมีจุดเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดในการต่อลำดับเบสตามตำแหน่งการจับของ primer กับ DNA ต้นแบบ ซึ่งสามารถแบ่งขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาได้ดังนี้ 1) denature: ขั้นตอนการคลายเกลียวและแยกสายคู่ DNA (double strand DNA) ให้เป็นสายเดี่ยว (single strand DNA) โดยการใช้อุณหภูมิที่สูง (95 °C) ในการทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างสาย DNA ระยะเวลา 10-30 วินาที 2) annealing: ขั้นตอนการจับอย่างจำเพาะระหว่าง primer และ DNA ต้นแบบ ลดอุณหภูมิของ

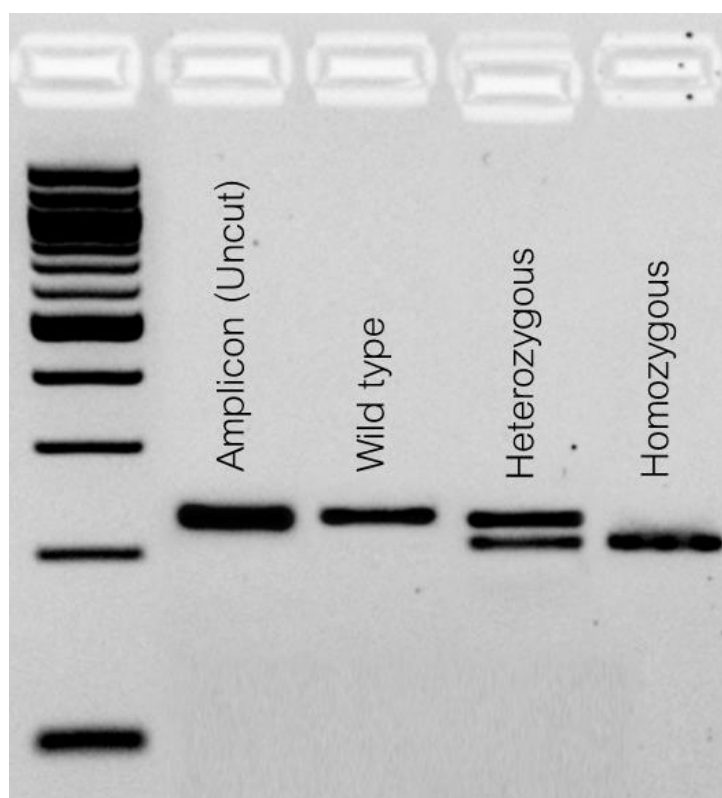
ปฏิกิริยาลงหลังจากขั้น denature ให้อยู่ในช่วง 45-68 °C ใช้ระยะเวลาประมาณ 10-30 วินาที 3) extension: ขั้นตอนการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ในการนำเบสคู่สมกับ DNA ต้นแบบ มาต่อถัดจากตำแหน่งที่ primer จับ (72 °C) ระยะเวลาที่ใช้ในขั้นตอนนี้ขึ้นอยู่กับความยาวของ amplicon (ผลผลิตจากกระบวนการ PCR หรือ ตำแหน่งของยีนที่เลือกและสนใจในการเพิ่มปริมาณ DNA) และความสามารถของเอนไซม์ DNA polymerase (ความเร็วในการต่อสาย DNA: 30 sec/kb) เมื่อเสร็จสิ้นจะวนกลับไปขั้น denature ใหม่อีกครั้งและเริ่มขั้นตอนถัดไปตามลำดับ (ดัดแปลง จากคู่มือการทำ PCR: KAPA2G™ Robust HotStart) จำนวนครั้งที่วนรอบขึ้นกับความต้องการของ ปริมาณ amplicon และปริมาณ DNA ต้นแบบ โดยแต่ละรอบจะมีปริมาณ DNA เพิ่มขึ้นทวีคูณ โดย จะทำการดูผลผลิตของปฏิกิริยาด้วยเทคนิค Gel electrophoresis 1.5-4 % เจล agarose

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) เป็นเทคนิคการศึกษาการกลายพันธุ์บนยีนจีซิกพีดีที่มีความนิยมเป็นอย่างสูง โดยการเพิ่มปริมาณ DNA สายสั้นๆ ตรงบริเวณตำแหน่ง ที่ต้องการตรวจเช็คการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีด้วยเทคนิค PCR และใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่มีความจำเพาะต่อเบสและตำแหน่งการกลายพันธุ์บ่มรวมกับ amplicon ของ PCR ซึ่งจะให้ลักษณะผลผลิตของ amplicon ที่ต่างกันในกลุ่ม wild type กับผู้ที่มีการกลายพันธุ์บนยีนจีซิกพีดี ดังการศึกษาของคณะวิจัย Laosombat

ตารางที่ 4 ความผันแปรของยีนจีซิกพีดีที่พบบ่อยที่สุดในประเทศไทยกับเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ (N = wild type, M= homozygous, hemizygous) [107]

G6PD Variant	G6PD Mutation	Restriction enzyme	Amplicon (bp.)
Mahidol	487 G>A	Hind III	N 104
			M 82+22
Kaiping	1388 G>A	Nde I	N 227
			M 206+21
Canton	1376 G>T	Afl II	N 214
			M 194+20
Union	1360 C>T	Hha I	N 142+45+27
			M 187+27
Viangchan	871 G>A	Xba I	N 126
			M 106+20

จากตารางที่ 4 ตัวอย่างเช่น ความผันแปรชนิด Canton ในเพศหญิง wild type, heterozygous และ homozygous เมื่อผ่านกระบวนการ RFLP โดยใช้เอนไซม์ Afl II ตัดอย่างจำเพาะจะปรากฏแถบ DNA บน 3% เจล agarose ด้วยเทคนิค gel electrophoresis 214 bp, 214+194 bp. และ 194 bp. ตามลำดับ (ดังรูปที่ 18) เนื่องจากความสามารถในการจำแนกแถบ DNA (resolution) ของเจล agarose ทำให้ไม่สามารถเห็นแถบ DNA 20 bp. ได้



รูปที่ 18 ผล gel electrophoresis ของความผันแปรชนิด Canton ในเพศหญิง wild type, heterozygous และ homozygous เมื่อผ่านกระบวนการ RFLP โดยใช้เอนไซม์ Afl II ตัดอย่างจำเพาะ เมื่อเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 100 bp.

ตารางที่ 5 เทคนิคการตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซีพีดี หลักการตรวจ และการรายงานผล [16, 68]

เทคนิคการตรวจ	หลักการตรวจ	ระยะเวลาในการตรวจ	รายงานผล	ราคา
Fluorescent spot test	Ultra Violet fluorescent	15-20 นาที	Qualitative	\$0.18
Methemoglobin reduction test	Met-Hb reduction	180 นาที [95]	Qualitative	-
Brilliant cresyl blue test	Dye reduction	300 นาที [97]	Qualitative	-
Ascorbate-cyanide screening test	Sulf-Hb reduction	240 นาที [98]	Qualitative	-
CareStart™ G6PD deficiency	Dye reduction (Rapid test)	10 นาที	Qualitative	\$1.50
BinaxNow® G6PD	Dye reduction (Rapid test)	7 นาที	Qualitative	\$16.00
Cytochemical Staining	Dye reduction & Flow cytometric	95 นาที	Qualitative	-
Cytofluorometric assay	Flow cytometric	-	Qualitative	-
Biochemical G6PD activity	Spectrophotometric	85 นาที	Quantitative	\$5
Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism	Genotypic	420 นาที	Qualitative	-

3. การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการบนกระดาษ (lab on paper)

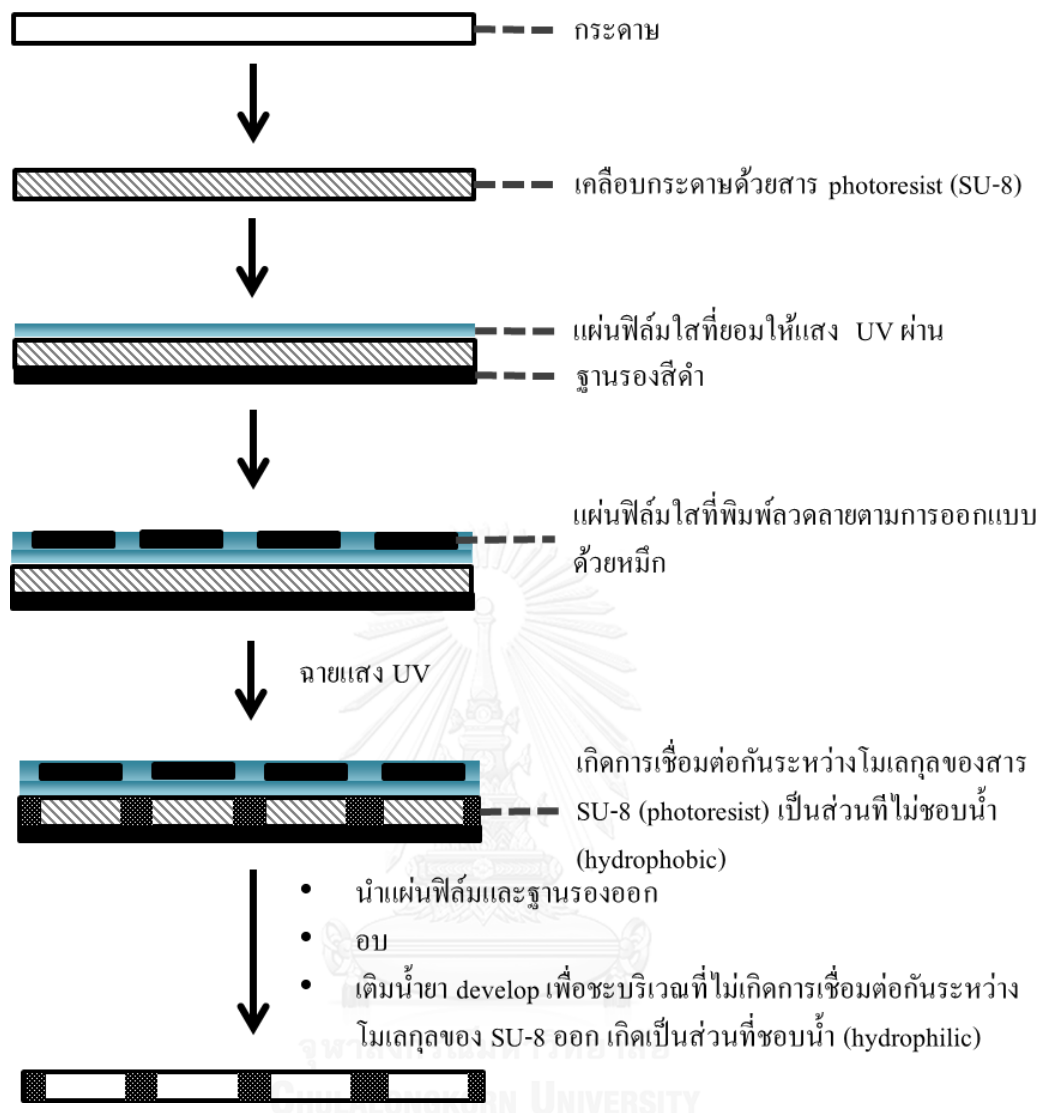
อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการบนกระดาษ (lab on paper) ได้รับการพัฒนาจากกลุ่มคณะวิจัย Whiteside ในปี ค.ศ. 2007 และเป็นที่ยอมรับอย่างมาก เพราะมีราคาถูก ขนาดเล็กพกพาได้ง่าย ใช้ปริมาณตัวอย่างหรือน้ำยาน้อย และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในตรวจวินิจฉัยได้หลายโรค [23] ซึ่งเป็นที่รู้จักกันในนามอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (microfluidic paper-based analytical devices: μ PAD) [24] โดยอาศัยหลักการการออกแบบกระดาษที่มีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) และใช้สารเคมีที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) สร้างเป็นลวดลายต่างๆ ตามวัตถุประสงค์ในการตรวจ ช่องทางขนาดเล็กที่เกิดขึ้นจากคุณสมบัติที่แตกต่างกันของกระดาษระหว่างชอบน้ำและไม่ชอบน้ำทำหน้าที่ในการควบคุมทิศทางการแพร่กระจายของสารละลายบนกระดาษ ด้วยเหตุนี้จึงไม่จำเป็นต้องอาศัยอุปกรณ์ในการควบคุมการไหล (ปั๊ม) ของน้ำยาหรือสารตัวอย่างภายในช่องขนาดเล็กของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ จึงมีความสะดวกในการพกพาหรือเคลื่อนย้าย ปัจจุบันวิธีการสร้างลวดลายต่างๆบนกระดาษได้รับการพัฒนาขึ้นมาหลากหลายวิธีดังต่อไปนี้ photolithography [25], polydimethylsiloxane (PDMS) plotting [26], inkjet printing [27], plasma treatment [28, 29], wax printing [30, 31], wax screen-printing [32] และ wax dipping [33] ซึ่งสามารถวิเคราะห์ผลการตรวจได้หลากหลายวิธี อาทิเช่น การสังเกตสีที่เกิดขึ้น และใช้กล้องถ่ายภาพเพื่อวิเคราะห์ผลเชิงปริมาณวิเคราะห์จากความเข้มของสีผ่านทางโปรแกรม Photoshop CS2, ImageJ [33, 34] การวัดระยะทางของสีที่ปรากฏ [35] การใช้เครื่อง electrochemical analyzer [36] เป็นต้น

3.1 การพัฒนาวิธีการสร้างลวดลายต่างๆบนกระดาษ

1) Photolithography

Photolithography [25] คือการใช้สารเคมีที่มีคุณสมบัติเป็น photoresist เช่น สาร SU-8 คือเมื่อสารละลาย SU-8 สัมผัสกับแสง UV จะเกิดการเชื่อมต่อกันระหว่างโมเลกุล (polymerization) ซึ่งเมื่อนำไปใช้ในการผลิตอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ สาร SU-8 ที่เกิด polymerization จะทำให้เกิดลวดลายบนกระดาษ และเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ขั้นตอนการสร้างจัดแสดงดังรูปที่ 19

แผ่นฟิล์มใสลวดลายต่างๆที่สร้างจากการพิมพ์ด้วยเครื่องพิมพ์ หรือ วาดด้วยปากกาหมึกสีดำ ทำหน้าที่เป็นตัวปิดกั้นแสง UV (photomask) ไม่ให้สัมผัสกับสาร SU-8 เพื่อป้องกันการเกิด polymerization ของสาร SU-8 บริเวณนี้เมื่อถูกน้ำยา develop ชะออกจากกระดาษจึงเป็นส่วนที่ชอบน้ำ สำหรับการฉายแสง UV หากไม่มีหลอด UV สามารถใช้การตากด้วยแสงแดดทดแทนได้



รูปที่ 19 ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ ด้วยเทคนิค Photolithography [25]

2) Polydimethylsiloxane (PDMS) plotting

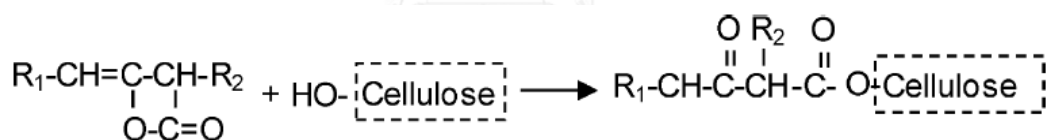
Polydimethylsiloxane (PDMS) plotting [26] เป็นการสร้างสวดลายบนกระดาษ โดยการ ใช้สาร PDMS บรรจุแทนที่หมึกลงในปากกา แล้ววาดสวดลายต่างๆลงบนกระดาษตามต้องการ สารละลาย PDMS ที่วาดจะซึมลงกระดาษขึ้นรูปเป็นผนังกันน้ำ (hydrophobic) เกิดเป็นท่อขนาดเล็กซึ่งสามารถวาดได้เล็กที่สุดคือมีขนาดเท่ากับ 1 มิลลิเมตร

3) Ink jet printing

กระดาษที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำจากการจุ่มลงในสารละลายไม่ชอบน้ำ (1.0 % poly styrene ใน toluene) จะถูกพิมพ์ด้วยสาร (toluene) ที่มีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายสารไม่ชอบน้ำ ลงบนกระดาษซ้ำๆ จนสามารถกำจัด poly styrene ออกจากกระดาษได้ เกิดเป็นลวดลายทอที่มีคุณสมบัติชอบน้ำบนกระดาษ และด้วยเทคนิค Ink jet printing นี้สามารถใช้พิมพ์น้ำยาลงบนกระดาษได้หลังการสร้างลวดลาย โดยการแทนที่หมึกพิมพ์ด้วยน้ำยาต่างๆ [27]

4) Plasma treatment

กระดาษถูกเคลือบด้วยสารละลาย alkenyl ketene dimer (AKD) ใน heptane ที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ โดยหมู่คีโตน (C=O) ในวงแหวนแลกโตนของ AKD จะทำปฏิกิริยา esterification กับหมู่ไฮดรอกซิลของกระดาษ (ดังรูปที่ 20) ออบกระดาษด้วยความร้อน 100 °C เป็นเวลา 5 นาที ตัดโลหะเป็นหน้ากากตามลวดลายที่ต้องการสร้างอุปกรณ์ตรวจจาวทางบนกระดาษ นำเข้าเครื่อง plasma reactor บริเวณภายใต้ของหน้ากากจะคงคุณสมบัติไม่ชอบน้ำของสาร AKD ดั้งเดิม หากแต่บริเวณที่สัมผัสกับ plasma จะถูกออกซิเดชันเปลี่ยนคุณสมบัติไม่ชอบน้ำของกระดาษ กลับมาเป็นชอบน้ำเกิดเป็นลวดลายบนกระดาษ [28, 29]



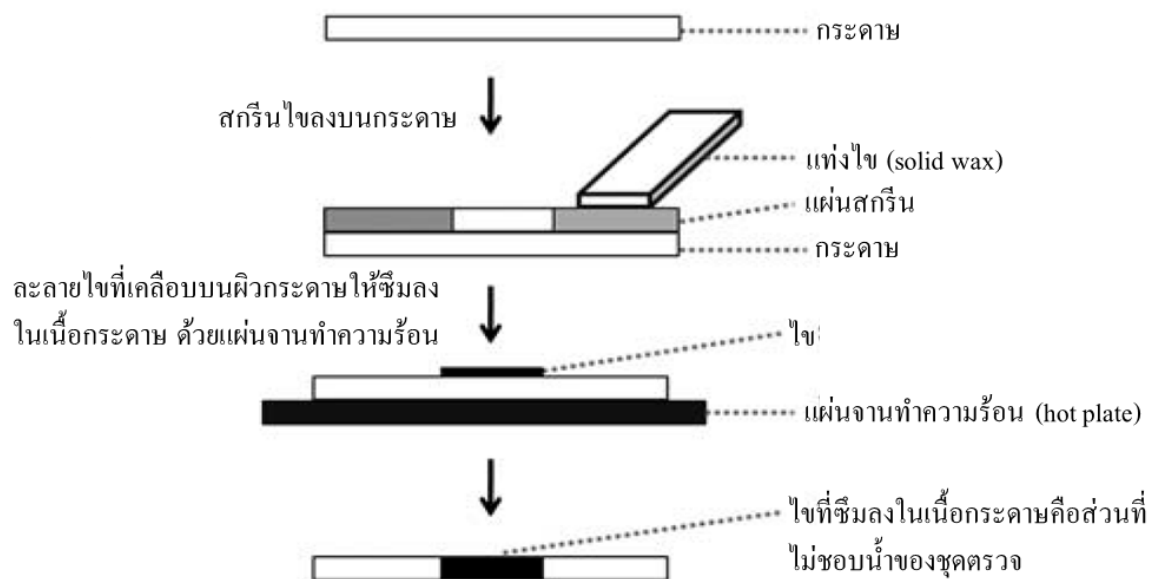
รูปที่ 20 การเกิดปฏิกิริยา esterification ของกระดาษกับสาร AKD[29]

5) Wax printing

อาศัยการออกแบบลวดลายต่างๆ ของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ และพิมพ์ลงบนกระดาษด้วยเครื่องพิมพ์ชนิดพิเศษที่หมึกถูกแทนที่ด้วยไข (wax) ละลายไขที่ถูกพิมพ์อยู่บนพื้นผิวของกระดาษให้ซึมลงในเนื้อกระดาษอย่างสมบูรณ์ด้วยการนำไปวางบนแผ่นจานทำความร้อน (hot plate) ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำและทำให้เกิดท่อรูปทรงต่างๆ ตามการออกแบบของอุปกรณ์ตรวจบนกระดาษ [30, 31]

6) Wax screen printing

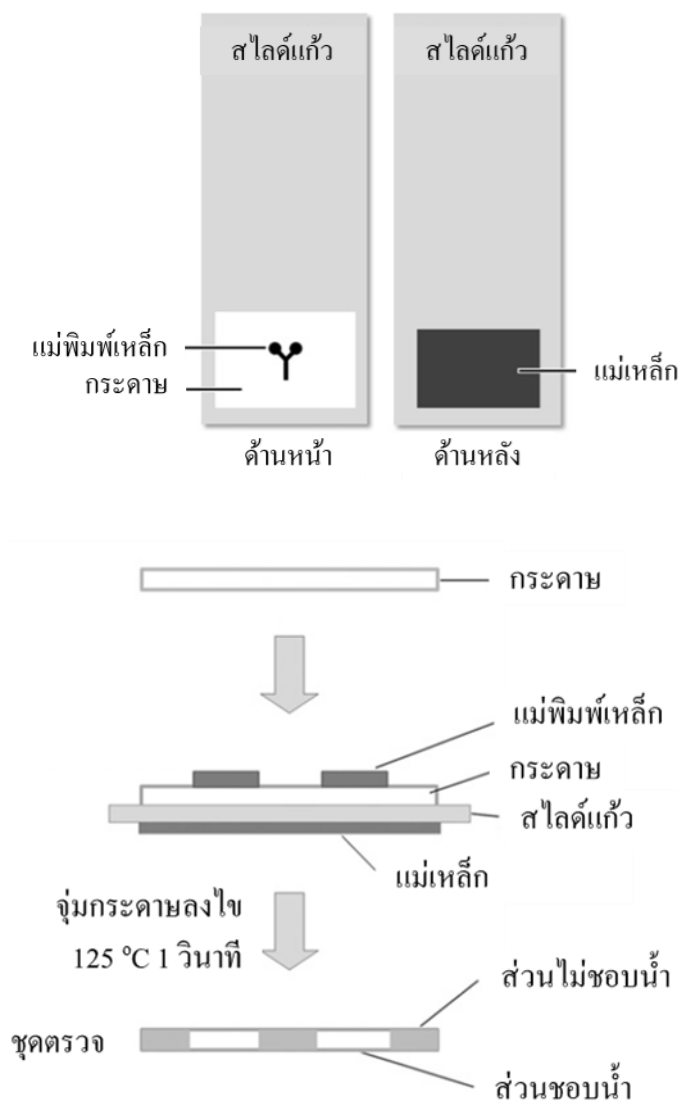
ออกแบบลวดลายอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CorelDraw แล้วพิมพ์ออกมาเพื่อใช้เป็นแม่แบบในการสร้างลวดลายบนแผ่นสกรีน [32] ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ ด้วยเทคนิค wax screen printing ดังรูปที่ 21



รูปที่ 21 ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษด้วยเทคนิค wax screen printing [32]

7) Wax dipping

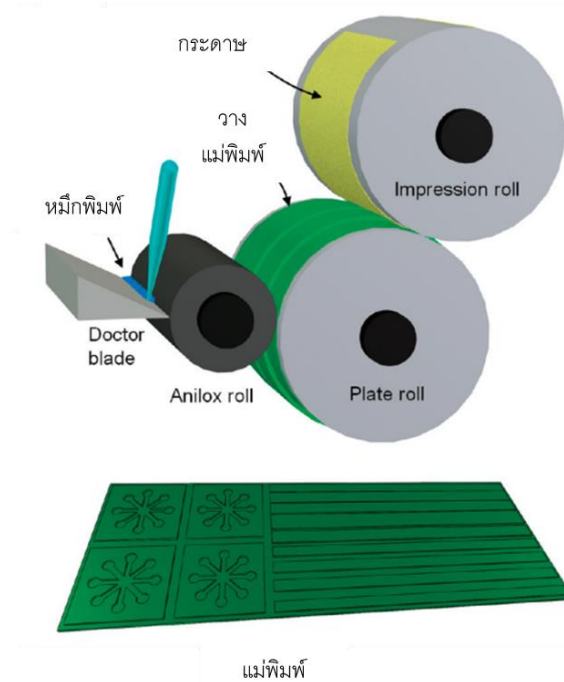
Wax dipping [33] เป็นเทคนิคการสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษจากการจุ่มกระดาษลงในไข ซึ่งแนวแผ่นเหล็กไว้ด้านหลังเพื่อป้องกันไม่ให้ไขสัมผัสกับกระดาษโดยยึดกับแผ่นแม่เหล็กก่อนจุ่ม บริเวณที่มีแผ่นเหล็กป้องกันอยู่จึงมีคุณสมบัติเป็นพื้นที่ชอบน้ำ ส่วนบริเวณที่สัมผัสกับไขโดยตรงจะมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ ลวดลายของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ขึ้นอยู่กับรูปทรงการออกแบบของแผ่นเหล็กที่นำมาใช้เป็นแม่พิมพ์ในการผลิต ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ ด้วยเทคนิค wax dipping ดังรูปที่ 22



รูปที่ 22 ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ ด้วยเทคนิค wax dipping [33]

8) Flexographic printing

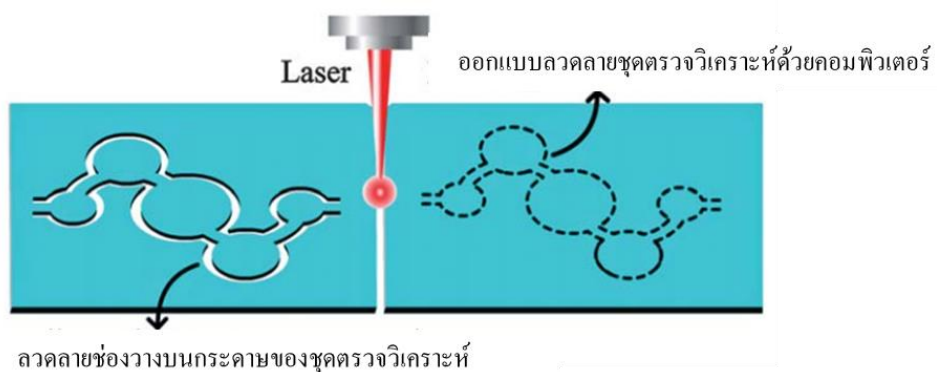
การพิมพ์ด้วยระบบ flexographic เป็นเทคนิคการพิมพ์แบบใช้ลูกกลิ้ง ในการกลิ้งแบบพิมพ์ (plate roll) ลงบนกระดาษ ซึ่งกระดาษจะมาในลักษณะสายพานอย่างต่อเนื่องทำให้ได้ปริมาณอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษจำนวนมาก โดยความเร็วในการผลิตจะขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของเครื่องพิมพ์ ดังรูปที่ 23 anilox roll ทำหน้าที่เป็นลูกกลิ้งในการถ่ายโอนหมึกพิมพ์ (polystyrene ที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ) ให้กับแม่พิมพ์ที่จัดวางอยู่บน plate roll ก่อนที่หมึกจะถูกพิมพ์ลงบนกระดาษที่ตำแหน่ง impression roll โดยมี doctor blade เป็นตัวเกลี่ย polystyrene ส่วนเกินออกจาก anilox roll [108]



รูปที่ 23 หลักการสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ ด้วยเทคนิค Flexographic printing [108]

9) Laser cutting

กระดาษถูกเลเซอร์คาร์บอนไดออกไซด์ตัดตามลวดลายที่ออกแบบด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ [109] ช่องว่างที่ถูกตัดออกเปรียบเสมือนผนังกั้นน้ำในการควบคุมทิศทางการไหลบนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ ดังรูปที่ 24



รูปที่ 24 หลักการสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ ด้วยเทคนิค Laser cutting [109]

10) Laser treatment

กระดาษถูกเคลือบด้วยสารละลายที่มีความไวต่อแสง กล่าวคือ เมื่อสารสัมผัสกับแสงยูวีจะเกิดการเชื่อมต่อกันระหว่างโมเลกุล (polymerization) จากคุณสมบัติข้างต้น หากนำเลเซอร์ชนิดยูวีมาฉายลงบนกระดาษ โดยใช้ระบบคอมพิวเตอร์ในการควบคุมทิศทางการฉายแสงตามลวดลายที่ต้องการ บริเวณที่ถูกฉายแสงยูวีจะเกิดการเชื่อมต่อกันระหว่างโมเลกุลเกิดเป็นผนังกันน้ำ จากนั้นทำการชะสารละลายที่มีความไวต่อแสงบริเวณที่ไม่สัมผัสกับเลเซอร์ยูวีออกเกิดเป็นส่วนที่ขอบน้ำของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ [110]

3.2 การพัฒนาการออกแบบอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ

การแยกเลือดบนกระดาษ (blood separation)

เทคนิคการแยกเลือดบนกระดาษได้รับการพัฒนาขึ้นเพื่อลดขั้นตอนและระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ เนื่องจากการตรวจวิเคราะห์สารชีวเคมีจากร่างกายนิยมตรวจโดยใช้สิ่งส่งตรวจเป็นน้ำพลาสมา ซึ่งสิ่งส่งตรวจที่เจาะได้จะเป็นเลือดครบส่วน จึงจำเป็นต้องอาศัยเครื่องปั่นเหวี่ยงในการปั่นแยกชั้นพลาสมาออกจากเม็ดเลือด และนำเลือดเฉพาะส่วนพลาสมามาตรวจวิเคราะห์ การพัฒนาให้อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษให้สามารถแยกเม็ดเลือดได้ภายในตัวจึงเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ ณ จุดดูแลผู้ป่วย (point of care) ที่ไม่สะดวกในการเคลื่อนย้ายเครื่องปั่นเหวี่ยงติดตามไปด้วยจึงมีความสะดวกในการพกพา ลดขั้นตอนในการตรวจวิเคราะห์ อีกทั้งลดค่าใช้จ่ายอีกด้วย เริ่มแรกการแยกเลือดบนกระดาษอาศัยหลักการตรึง anti-A และ anti-B ไว้ ซึ่งเมื่อหยดเลือดครบส่วนลงบนกระดาษผิวของเม็ดเลือดที่มี antigen ตรงกับ antibody ที่ตรึงไว้จะเกิดการเกาะกลุ่ม (agglutination) มีขนาดใหญ่กว่าขนาดรูพรุนของกระดาษไม่สามารถแพร่ต่อไปยังส่วนต่างๆของกระดาษได้อีก จากเลือดครบส่วนจึงมีเพียงแค่น้ำพลาสมาที่สามารถซึมและไหลผ่านรูพรุนของกระดาษไปได้ [111] ซึ่งการตรึงด้วย anti-A และ anti-B จะสามารถแยกเลือดได้เฉพาะตัวอย่างเลือดครบส่วนจากหมู่ A, B และ AB เท่านั้น หากต้องการแยกเลือดครบส่วนจากเลือดหมู่ O ด้วยจะต้องทำการตรึง anti-H การแยกเลือดบนกระดาษด้วยวิธีนี้จึงมีค่าใช้จ่ายที่สูงในการตรึง antibody ต่อมาจึงมีการพัฒนาการแยกเลือดบนกระดาษโดยอาศัยหลักการคล้ายๆกันคือ การเลือกใช้กระดาษต่างกันสองชนิด โดยที่กระดาษหนึ่ง (LF1) มีขนาดรูพรุนเล็กกว่าขนาดของเม็ดเลือด ทำหน้าที่เป็นตัวกรองกักเก็บเม็ดเลือดไม่ให้ไหลไปตามน้ำพลาสมา ร่วมกับกระดาษกรอง Whatman no. 1 [112]

3.3 เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปฏิกิริยาบนกระดาษ

เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปฏิกิริยาบนกระดาษมีอยู่ด้วยกันหลากหลายวิธี อาทิเช่น การสังเกตสีที่เกิดขึ้น (colorimetric assay) และใช้เครื่องถ่ายภาพเพื่อนำภาพมาวิเคราะห์ผลเชิงปริมาณวิเคราะห์จากความเข้มของสีผ่านทางโปรแกรม Adobe Photoshop, ImageJ [1, 33, 34, 113] การวัดระยะทางของสีที่ปรากฏ [35] การวัดปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมี (electrochemical) [36] การวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) และการวัดค่าความเข้มการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ [114] การวัดค่าความเข้มของแสงจากปฏิกิริยาเคมี (chemiluminescence) การวัดปริมาณแสงส่องผ่าน (transmittance) เป็นต้น ซึ่งการเลือกใช้เทคนิคในการตรวจวิเคราะห์นั้นขึ้นอยู่กับผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นของปฏิกิริยาบนกระดาษว่าสามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธีใด และด้วยเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปฏิกิริยาบนกระดาษเหล่านี้จึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงการออกแบบอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษอีกด้วย

1) การวิเคราะห์ผลเชิงปริมาณวิเคราะห์ของความเข้มสีจากภาพถ่าย

การตรวจวิเคราะห์ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการใช้ตัวบ่งชี้ในการเปลี่ยนสี (colorimetric assay) เป็นเทคนิคการตรวจวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก ซึ่งสามารถสังเกตเห็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ด้วยตาเปล่า โดยไม่ต้องอาศัยอุปกรณ์เสริมใดๆ แต่การอ่านผลด้วยตาเปล่านั้นสามารถรายงานผลได้เพียงเชิงคุณภาพวิเคราะห์ หากต้องการรายงานผลเชิงปริมาณวิเคราะห์จำเป็นต้องอาศัยการบันทึกภาพถ่ายและใช้โปรแกรมในการช่วยวิเคราะห์ความเข้มสีเชิงปริมาณวิเคราะห์

1.1 ภาพถ่าย

ระบบคอมพิวเตอร์เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการประมวลผลข้อมูลจากภาพถ่ายในเชิงปริมาณวิเคราะห์ และจัดเก็บภาพถ่าย พื้นที่ที่ใช้ในการจัดเก็บภาพถ่ายขึ้นอยู่กับขนาดความละเอียดของภาพ pixel และ bit กล่าวคือ

Pixel คือ หน่วยย่อยในการนำเสนอจุดสีของภาพ

Bit คือ หน่วยของจำนวนสีที่ภาพแสดง 2^n ; n = จำนวน bit เช่น 8-bit (2^8) ประมาณ 256 สี, 24-bit (2^{24}) ประมาณ 16 ล้านสี

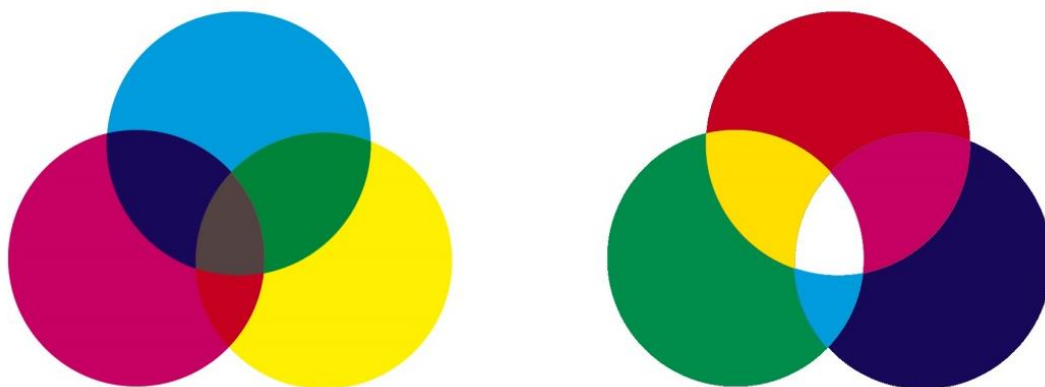
ตัวอย่างเช่น ภาพถ่าย 3000×2000 pixels (24-bit) จะมีทั้งหมด 6,000,000 pixels (3000×2000 pixels) และในแต่ละ pixel นำเสนอ 24 bit = 144,000,000 bits (6,000,000 pixels \times 24 bits/pixel) ขนาดพื้นที่ที่ใช้ในการจัดเก็บภาพถ่ายคือ 17 MB (8 bits/byte =

18,000,000 bytes) [115] ดังนั้นภาพถ่ายสีจึงใช้ขนาดพื้นที่ในการจัดเก็บมากกว่าภาพขาวดำซึ่งมีเฉดสีที่น้อยกว่า (gray scale)

1.2 ระบบสี

1) ระบบสี RGB

ระบบสี RGB เป็นระบบของแสงสี ในปี ค.ศ. 1666, Sir Isaac Newton ค้นพบสเปกตรัมของแสงสีขาว (สีรุ้ง) กล่าวคือ แสงสีเป็นคลื่นความยาวชนิดหนึ่งซึ่งแต่ละช่วงของแสงสีมีความยาวคลื่นไม่เท่ากันจึงมีมุมการหักเหไม่เท่ากัน ทำให้เมื่อเดินแสงสีขาวทางผ่านตัวกลางที่มีความหนาแน่นต่างกัน (อากาศไปปริซึม) แสงสีขาวจะแยกออกเป็นสีรุ้ง และนักฟิสิกส์ Jame Clerk Maxwell พบว่าแสงสีขาวประกอบด้วยแสงสีแดง (R) แสงสีเขียว (G) และแสงสีน้ำเงิน (B) เรียกว่า สีปฐมภูมิ (primary color) หรือ การผสมสีเชิงบวก (additive color) ซึ่งการนำสีปฐมภูมิมารวมกัน (ดังรูปที่ 25) จะทำให้เกิด สีทุติยภูมิ (secondary color) ได้แก่ สีเหลือง (yellow) สีแดงม่วง (magenta) และสีฟ้า (cyan) โดยแต่ละสีมีความเข้มสีตั้งแต่ 0-255



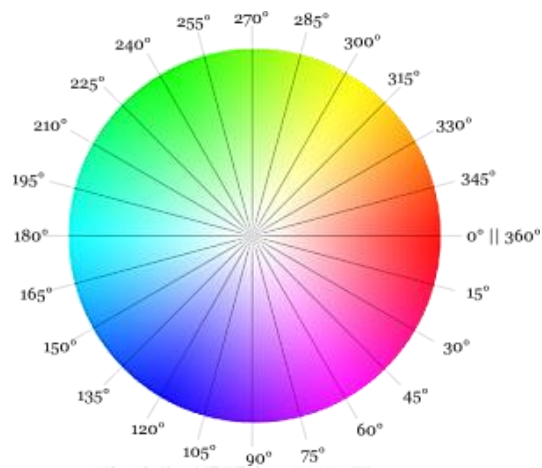
รูปที่ 25 ระบบสี CMYK (ด้านซ้าย) และ ระบบสี RGB (ด้านขวา)

2) ระบบสี CMYK

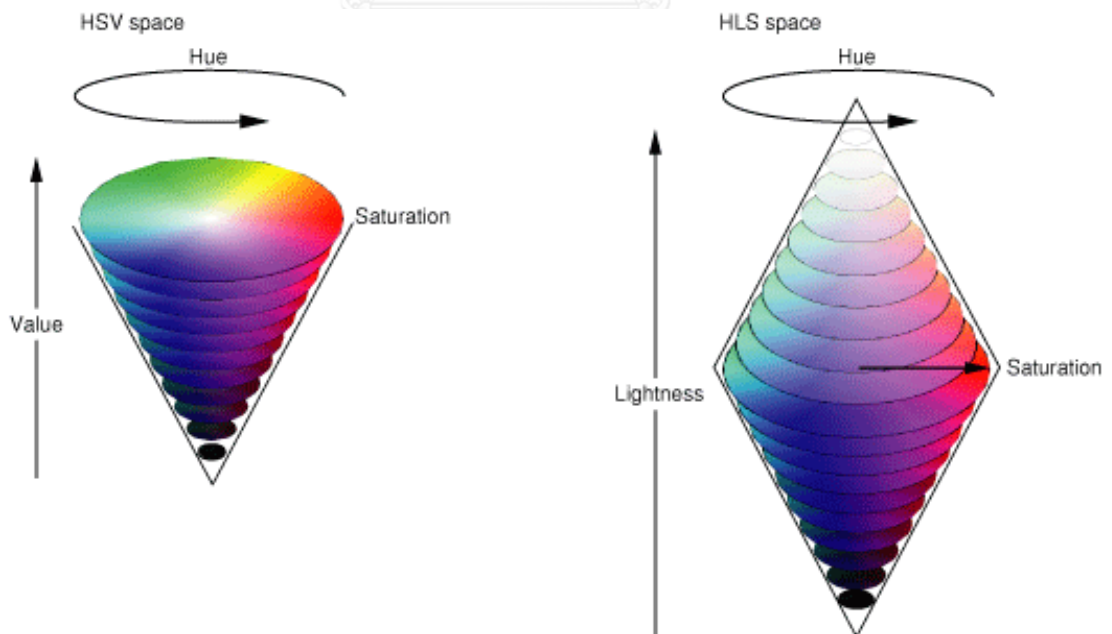
ระบบสี CMYK เป็นระบบของวัตถุสี หรือ สีผสมเชิงลบ (subtractive color) ประกอบด้วยสีฟ้า (cyan) สีแดงม่วง (magenta) สีเหลือง (yellow) และสีดำ (key or black) โดยแต่ละสีมีความเข้มสีตั้งแต่ 0-255 เมื่อนำแต่ละสีมารวมกันในอัตราส่วนที่เท่ากันจะได้สีดำ (ดังรูปที่ 25) สามารถพบเห็นระบบสีนี้ได้ทั่วไป อาทิเช่น หมึกพิมพ์ของเครื่องพิมพ์

3) ระบบสี HSV หรือ HLS หรือ HSB

ระบบสี HSV: Hue (H) เป็นแฉดสีรุ้งตั้งแต่ 0-360° ตามวงล้อของสี (ดังรูปที่ 26), Saturation (S) แสดงถึง ความบริสุทธิ์ของสี ระยะห่างจากกลางวงล้อสีขาวถึงขอบวงล้อสีในระยะ ความสว่างที่เท่ากัน และ Value (V) หรือ Brightness (B) หรือ Luminance (L) คือค่าความสว่าง ของสี



รูปที่ 26 วงล้อสี (Hue: 0-360°) [116]



รูปที่ 27 ความแตกต่างของพื้นที่ระบบสี HSV และ HLS [117]

ถึงแม้ว่านิยามของระบบสี HSV และ HLS จะเหมือนกัน แต่ระบบสีของ HSV และ HLS มีพื้นที่ช่วงของค่าความสว่างค่า V และ L ที่แตกต่างกัน (ดังรูปที่ 27) เช่น สีแดงของระบบสี HSV: 0,100,100 แต่สีแดงของระบบสี HLS: 0, 50, 100 [117]

4) ระบบสี CIE Lab

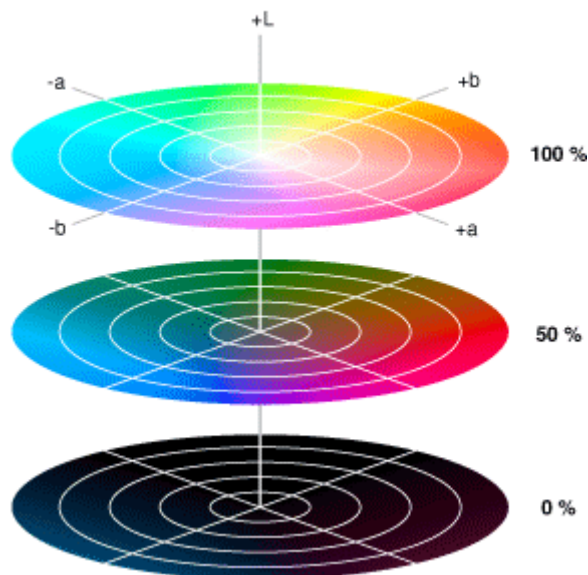
ระบบสี CIE Lab เป็นระบบสีเทียบเคียงกับการรับรู้สีของมนุษย์ ซึ่งไม่อิงกับอุปกรณ์ใดๆ เมื่อเปรียบเทียบกับ ระบบสีของ CMYK ที่เป็นระบบสีอิงกับอุปกรณ์ กล่าวคือ เมื่อกำหนดค่าสีของ CMYK เท่ากันในแต่ละครั้งในการพิมพ์แต่ใช้เครื่องพิมพ์ต่างกัน สีที่มองเห็นหลังจากพิมพ์ก็จะมี ความคลาดเคลื่อน ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของเครื่องพิมพ์ในการพิมพ์สีได้ถูกต้องมากน้อยเพียงใด ในปี ค.ศ. 1976 สถาบัน Commission Internationale de l'Eclairage (CIE) ได้พัฒนาระบบสี CIE Lab :ซึ่งมีคำจำกัดความดังนี้

Lightness (L) คือ ความสว่างของสี

a คือ แนวเส้นสีเขียว-สีแดง (ลบ-บวก)

b คือ แนวเส้นสีน้ำเงิน-สีเหลือง (ลบ-บวก) [118]

L*a*b* color space

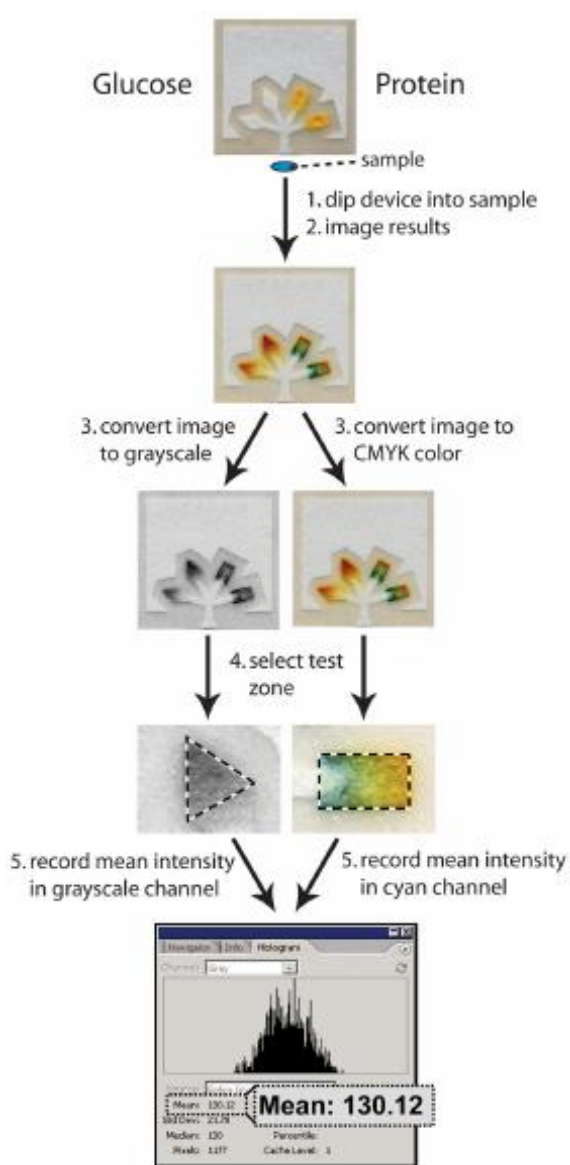


รูปที่ 28 พื้นที่ระบบสี CIE Lab [117]

1.3 โปรแกรมและการนำมาประยุกต์ใช้ตรวจวัดสารบนกระดาษ

1) โปรแกรม Photoshop

Photoshop เป็นโปรแกรมตกแต่งภาพสำหรับประชาชนทั่วไปที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย ในหมู่ช่างถ่ายภาพ สามารถนำมาใช้ในการวัดค่าความเข้มของสีเพื่อรายงานผลการตรวจทาง การแพทย์หรืออุตสาหกรรม ซึ่งขั้นตอนการตรวจวัดต้องอาศัยการบันทึกภาพถ่ายจาก กล้องดิจิตอล กล้องบันทึกวิดีโอ (video camera, webcam) โทรศัพท์มือถือ และสแกนเนอร์ และเลือกกระบบสีที่ ต้องการวัด ตัวอย่างการตรวจวัดระดับน้ำตาล และโปรตีนในปัสสาวะ (ดังรูปที่ 29)



จากรูปที่ 29 การตรวจวัดระดับน้ำตาลในปัสสาวะ หากมีน้ำตาลในปัสสาวะปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีที่เกิดขึ้น คือ จะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีส้มแดง จึงนิยมเปลี่ยนระบบสีภาพถ่ายจาก RGB เป็น gray scale เพื่อที่จะได้ช่วงในการวัดที่กว้างยิ่งขึ้น และไม่ต้องคำนึงถึงความเข้มสีอื่น ๆ ที่จะมารบกวนการตรวจวัด จึงได้ผลที่มีความแม่นยำมากขึ้นอีกด้วย ต่างจากการวัดปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของโปรตีน ซึ่งหากมีโปรตีนในปัสสาวะปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีที่เกิดขึ้น คือ จะเปลี่ยนสีปฏิกิริยาจากสีเหลืองเป็นสีเขียวฟ้า จึงนิยมวัดในระบบสี CMYK แล้วเลือกวัดเฉพาะช่องความเข้มสีของสีฟ้าที่เกิดขึ้น (cyan) เท่านั้น [1]

รูปที่ 29 ขั้นตอนการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Photoshop [1]

2) โปรแกรม ImageJ

สำนักวิจัยของสถาบัน National Institute of Mental Health (NIMH) เป็นผู้พัฒนาโปรแกรม ImageJ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ภาพถ่าย รองรับสกุลไฟล์ TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS และ raw เป็นต้น รูปแบบ 8-bit, 16-bit, 32-bit ImageJ เป็น freeware ที่สามารถดาวน์โหลดได้ฟรี [118] โปรแกรม ImageJ รองรับระบบสี RGB, HSB, Lab แต่ไม่สามารถวิเคราะห์ระบบสี CMYK หรือเลือกช่องสีจำเพาะที่ต้องการวิเคราะห์ได้

ค่าความเข้มสีที่วัดได้จากทั้งสองโปรแกรมเป็นค่าความสว่างของสี 0-255 (มืด-สว่าง) จากปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีจากไม่มีสีเป็นมีสี ดังนั้นค่าที่ได้จากการวัดจะแปรผกผันกับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น กล่าวคือ สีปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเข้มขึ้น (สีมืดขึ้น) ค่าที่วัดได้จะน้อยลง จึงมีกระบวนการเปลี่ยนรูปข้อมูลก่อนรายงานผล (data transformation) ตัวอย่าง การแปลงข้อมูลระบบสี Lab หากรายงานค่า $L = (\text{ค่าที่วัดได้จากโปรแกรม} \times 100) / 255$ ค่า a หรือ b จะนำค่าที่วัดได้จากโปรแกรมกลับด้วย 128 เช่น ถ้าวัดได้ 128 รายงานค่า 0 ถ้าวัดได้ 138 รายงานค่า 10 [119] เป็นต้น หรือการรายงานผลด้วยการวัดส่วนที่ไม่เกิดปฏิกิริยา (มีค่าสูง) หักลบกับส่วนที่เกิดปฏิกิริยาที่วัดได้ค่าต่ำ

เทคนิคการสร้างลวดลายบนกระดาษ และเทคนิคการวัดสีเหล่านี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตอุปกรณ์ตรวจติดตาม หรือตรวจหาสารต่างๆบนกระดาษได้อีกมากมาย อาทิ เช่น การตรวจสอบสารเคมีในน้ำ (O_2 , NH_3 , K, Mg, HCl), การตรวจสอบสารชีวเคมีจากร่างกาย เลือดหรือปัสสาวะ (glucose, protein, iron, nitrites, ketone, pH, hemoglobin, uric acid, lactate, HCG) และสารอื่นๆ (Ni, Ti (IV), Al, ethanol) เป็นต้น [120, 121] ซึ่งการผลิตอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ เป็นเครื่องมือตรวจวิเคราะห์ผลที่มีขนาดเล็ก สะดวกต่อการเคลื่อนย้าย และสามารถใช้เป็นอุปกรณ์ที่ตรวจข้างเตียงผู้ป่วย (point of care: POCT) จึงควรมีการนำเทคนิคการผลิตอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษเหล่านี้มาประยุกต์ใช้ในการตรวจชุดวินิจฉัยโรคอื่นๆ ทางด้านการแพทย์ และภาคอุตสาหกรรมในอนาคต

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่าง (Population and sampling)

การศึกษานี้จะแบ่งกลุ่มตัวอย่างสำหรับการทดลองออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 กลุ่มตัวอย่างสำหรับทดสอบการผลิตและประเมินประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ และ ส่วนที่ 2 กลุ่มตัวอย่างสำหรับการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษสำหรับการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีกับวิธีการตรวจอื่นๆ

1.1 กลุ่มตัวอย่างสำหรับทดสอบการผลิตและประเมินประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ (ส่วนที่ 1)

คัดเลือกกลุ่มตัวอย่างแบบเฉพาะเจาะจง (purposive selection) จากการสอบถามระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีของกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งได้รับการตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีแล้วในชั้นเรียน หัวข้อปฏิบัติการภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยเทคนิค spectrophotometry assay (biochemical G6PD activity) คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัย (Inclusion criteria)

1. ผู้ที่มีระดับความเข้มข้นของเลือดปกติ (36-50 %Hct)
2. ผู้ที่ทราบระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี: ระดับการทำงานปกติ (N) พร่องเอนไซม์รุนแรง (D)
3. ผู้ที่ไม่มีสภาวะการเสียเลือด อาทิเช่น การมีประจำเดือน การบริจาควโลหิต ภายในระยะเวลา 1 เดือน เป็นต้น

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครออกจากโครงการวิจัย (Exclusion criteria)

1. เจาะเก็บเลือดตัวอย่างไว้นานเกิน 3 วัน
2. เลือดตัวอย่างที่เก็บได้มีภาวะ hemolysis

วิธีการได้มาของเลือดตัวอย่าง

เจาะเก็บเลือดกลุ่มตัวอย่างอาสาสมัครประชากรไทยที่มีสุขภาพแข็งแรง อายุระหว่าง 17-35 ปี ที่มีสุขภาพแข็งแรง และทราบระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี ที่คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระหว่างเดือน พฤษภาคม ถึง กรกฎาคม พ.ศ. 2559 ซึ่งได้รับการพิจารณาและแสดงความยินยอมเข้าร่วมการวิจัย ภายหลังจากทราบถึงจุดประสงค์หลักของโครงการวิจัย

รายละเอียดโศดการเจาะเก็บตัวอย่างเลือด ดังนี้

หลอด EDTA ปริมาตร 3 มิลลิลิตร (N: 1 ราย, D: 1 ราย)

- ใช้สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐานในการแปลผลของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ
- ใช้สำหรับการทดสอบสารรบกวนบนอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ
- ใช้สำหรับการทดสอบการรบกวนจากปริมาณเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างเลือดครบส่วนบนอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ
- ใช้สำหรับการทดสอบการรบกวนจากปริมาณเม็ดเลือดขาวในตัวอย่างเลือดครบส่วนบนอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ
- ใช้สำหรับการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาบนกระดาษ
- ใช้สำหรับการทดสอบหาอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างเลือดกับน้ำยาที่ใช้ในการตรวจที่เหมาะสม

หลอด CPDA ปริมาณ 6 มิลลิลิตร (N: 1 ราย)

- ใช้สำหรับการทดสอบความแม่นยำของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ
- ใช้สำหรับการทดสอบขีดจำกัด (limited of detection) ในการตรวจของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ
- ใช้สำหรับการทดสอบหาระยะเวลาในการตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ (N: 1 ราย, D: 1 ราย)

ข้อมูลของกลุ่มตัวอย่างจะถูกเก็บเป็นความลับ ภายหลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการวิจัย ตัวอย่างเลือดทั้งหมดจะถูกทำลายโดยไม่นำกลับไปใช้ในงานวิจัยอื่น

1.2 กลุ่มตัวอย่างสำหรับทดสอบเทียบประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ สำหรับการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีกับวิธีการตรวจอื่นๆ (ส่วนที่ 2)

กลุ่มตัวอย่างในการทดสอบอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ตามระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี ดังนี้ 1) ผู้ที่มีระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีปกติ 2) ผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีปานกลาง และ 3) ผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีรุนแรง ตามหลักเกณฑ์ของ World Health Organization (WHO) โดยแต่ละกลุ่มตัวอย่างควรมีประชากรประมาณ 30 คนขึ้นไป จากการศึกษาความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีในประเทศไทย [6] พบว่ามีความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีรุนแรงร้อยละ 9.38 ในประชากรไทย ดังนั้นหากต้องการกลุ่มประชากรผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีรุนแรงอย่างน้อย 30 คน จึงควรทำการเก็บกลุ่มตัวอย่างประมาณ 333 ขึ้นไป

จากการคำนวณขนาดของกลุ่มตัวอย่างกรณีที่ไม่ทราบจำนวนประชากร

$$n = \frac{Z^2 PQ}{e^2}$$

n เป็นจำนวนตัวอย่าง

Z เป็นคะแนนมาตรฐานตามระดับความเชื่อมั่น (Z=1.965)

P เป็นสัดส่วนของลักษณะที่สนใจในประชากร (P=0.09)

Q เป็นสัดส่วนของลักษณะที่ไม่สนใจในประชากรเท่ากับ 1- P (Q=0.91)

e เป็นความคลาดเคลื่อนของการประมาณค่า (e=3 %)

จึงได้ขนาดกลุ่มประชากร 351 ราย เมื่อคำนึงถึงอัตราการคัดเลือกออกระหว่างการทำวิจัยของกลุ่มตัวอย่างจึงจำเป็นต้องเก็บตัวอย่างเพิ่ม 10 % จากจำนวนประชากรที่คำนวณได้ ขนาดกลุ่มตัวอย่างของงานวิจัยนี้จึงเท่ากับ 386 ราย

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัย (Inclusion criteria)

1. เป็นเลือดที่มีคุณภาพตามเกณฑ์การคัดกรองผู้บริจาคโลหิตที่สามารถนำไปให้ ผู้รับบริจาคได้
2. เป็นตัวอย่างที่เหลือจากการตรวจในงานประจำวัน โดยในหลอดเก็บเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด 3.2 % sodium citrate จะต้องมียุติปริมาณเลือดเหลือมากกว่า 2 มล. หลอดเก็บเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA จะต้องมียุติปริมาณเลือด

เหลือมากกว่า 1 มล. และในหลอดเก็บเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด CPDA1 จะต้องมียปริมาณเลือดเหลือมากกว่า 5 มล.

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครออกจากโครงการวิจัย (Exclusion criteria)

1. หากทำการตรวจแล้วมีตัวอย่างเหลือไม่เพียงพอที่จะสามารถตรวจวิเคราะห์ให้ครบได้ทุกรายการ
2. เลือดตัวอย่างที่เก็บได้มีภาวะ hemolysis หรือ lipiemic ตั้งแต่ 2+ ขึ้นไป

วิธีการได้มาของเลือดตัวอย่าง

ผู้วิจัยดำเนินการขออนุญาตให้เก็บเลือดตัวอย่างที่เหลือจากการตรวจ ของศูนย์บริการโลหิต ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลศิริราช ผู้วิจัยจะทำการสุ่มตัวอย่างเลือดที่มีคุณภาพผ่านตามเกณฑ์การคัดกรองผู้บริจาคโลหิต โดยจะใช้เลือดที่เหลือใช้จากการตรวจคัดกรองโรคติดต่อของการบริจาคโลหิต ปริมาณรวม 7 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

- ตัวอย่างเลือด ปริมาณ 2 มล. ที่นำมาจากเลือดในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็ง 3.2 % sodium citrate
- ตัวอย่างเลือด ปริมาณ 1 มล. ที่นำมาจากเลือดในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็ง EDTA
- ตัวอย่างเลือด ปริมาณ 5 มล. ที่นำมาจากเลือดในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็ง CPDA

ผู้วิจัยจะทำการสุ่มตัวอย่างอย่างง่าย (random sampling) วันละ 10 ราย ประกอบด้วยเลือดจากผู้บริจาคเพศชาย จำนวน 5 ราย และเพศหญิงจำนวน 5 ราย กำหนดวันที่เก็บตัวอย่างสัปดาห์ละ 3 วัน เป็นเวลานาน 16 สัปดาห์ หรือจนกว่าจะเก็บตัวอย่างได้ครบ 386 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างเลือดจากหลอด EDTA ใช้สำหรับตรวจความค่าความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (N-Health Lab) ตัวอย่างเลือดจากหลอด 3.2 % sodium citrate ใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์จีโนไทป์เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ส่วนเลือดจากหลอด CPDA ใช้สำหรับตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี ทดสอบกับอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษและตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีภายใน 3 วัน และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ข้อมูลของกลุ่มตัวอย่างจะถูกเก็บเป็นความลับ ภายหลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการวิจัย ตัวอย่างเลือดทั้งหมดจะถูกทำลายโดยไม่นำกลับไปใช้ในงานวิจัยอื่น

2. เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

2.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

การผลิตอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ โดยเทคนิค wax printing	
- Hotplate (IKA® C-MAG HS7)	- เครื่องพิมพ์อิงค์เจ็ท
- คอมพิวเตอร์	(DCP-165C, Brother)
- เครื่องพิมพ์ wax	
(ColorQube 8570, Xerox)	
การทดสอบสารบบนอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ	
- Spectrophotometer	- Spectrophotometer
(U2900, HITACHI)	(UV/VIS OPTIZEN POP, MECASYS)
การตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี ด้วยวิธี Fluorescent spot test	
- UV lamp Reader	
การตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี (G6PD biochemical activity)	
- เครื่องวัดอัตโนมัติ	- เครื่องเขย่าสาร
(Rx Daytona Analyser without ise)	(Vortex- GENIE 2 G560E)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง	- เครื่องปั่นเหวี่ยง
(UNIVERSAL 320R, Hettich zentrifugen)	(Heraeus Labofuge 400R, Thermo)
การตรวจวัดภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ	
- Scanner (DCP-165C, Brother)	- pH meter (3510, JENWAY)
การสกัดดีเอ็นเอ	
- เครื่องปั่นเหวี่ยง	- เครื่องปั่นเหวี่ยง
(MIKRO 180, Hettich zentrifugen)	(WiseSpin CF-10, WISD)
	- Water bath (VWR 1202, Shellab)
การวิเคราะห์จีโนไทป์ของกลุ่มตัวอย่าง	
- เครื่อง PCR Thermo cycler	- Biosan DNA/RNA UV-cleaner box
(Mastercycler® nexus X2, Eppendorf)	- Gel doc (GelDoc™ XR+, BIORAD)
- Microcentrifuge (GMC-260, LabTech)	- เครื่องไมโครเวฟ (SHARP)
อื่นๆ	
- เครื่องชั่งสาร	- ตู้เย็น -20 และ 4 °C
(xs204 METTLER, TOLEDO)	

2.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

การผลิตอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ	
- เทปกาวใส, กาวแท่ง (Uhu Stick)	- กระดาษกรอง Whatman No.4 ขนาด 110Ø (GE Healthcare UK)
- นาฬิกาจับเวลา, คีมคีบ (forceps)	- แผ่นเหล็กขนาด 10 × 10 ซม.
- กระดาษ A4, กรรไกร, แผ่นใส	
การตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี ด้วยวิธี Fluorescent spot test	
- กระดาษกรองจากชุดตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีเชิงคุณภาพวิเคราะห์ Fluorescent spot test (SQMMR500, R&D Diagnosis Greece)	
- RACK 1.5 ml ขนาด 8×12	- Microtube ขนาด 1.5 ml
การตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี (G6PD biochemical activity)	
- Conical tube ขนาด 15 ml (Axygen)	- Adjustable repeater pipette (STEPPER™ 411, SOCOREX swiss)
- RACK ขนาด 12×5	- ขวด Duran ขนาด 500 ml (BOECO, Germany)
- ปิเปตขนาด 2, 10, 20, 200, 1000 µl	
- Pipette tips (10, 200, 1000)	
อุปกรณ์เจาะเลือด	
- เข็ม (needle 21, MEKO)	- หลอดเลือดชนิดสารกันเลือดแข็ง EDTA
- หมอน	- หลอดเลือดชนิดสารกันเลือดแข็ง CPDA
- สายรัดแขน (tourniquet)	- หลอดเลือดชนิดสารกันเลือดแข็ง
- สำลี และพลาสติกอร์ยา	- Sodium citrate 3.2 % 1.8 ml (VACUETTE®)
- ถังใส่วัสดุมีคมติดเชื้อ (V-Tech)	
การสกัดดีเอ็นเอและการวิเคราะห์จีโนมไทป์ของกลุ่มตัวอย่าง	
- Thermometer	- Foam Rack
- ชุด DNA Gel Electrophoresis (Wide Mini-Sub Cell GT Cell, BioRad)	- PCR strip tube 0.2 ml (flat cap, ExtraGene)
อุปกรณ์เตรียมสาร	
- Beaker และ กระบอกตวง	- ซ้อนตักสาร
การทำความสะอาดและอื่นๆ	
- ถังขยะ ปากกา และทิชชู (23754, Scott)	- foggy spray, เทปกาวสำหรับ autoclave

2.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

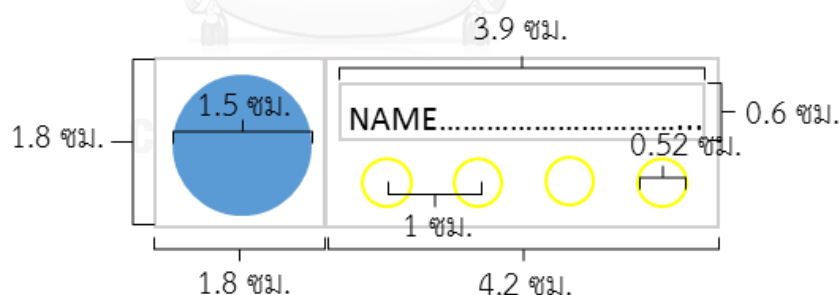
การผลิตอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีพื้นฐานกระดาษ	
- G6P (G7879, Sigma)	- EDTA (BDH7315-1, BDH Chemical)
- NADP (N8035, Sigma)	- Trizma [®] base (T1503, Sigma)
- 1-MethoxyPMS (M8640, Sigma)	- HCl (37 %, MERCK)
- TNBT (T4000, Sigma)	- wax (ColorQube 8570, Xerox)
การตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี ด้วยวิธี Fluorescent spot test	
- ชุดตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีเชิงคุณภาพวิเคราะห์ Fluorescent spot test (SQMMR500, R&D Diagnosis Greece)	
การตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี (G6PD biochemical activity)	
- NaCl (465, Ajax Finechem Product)	- น้ำยาตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ (PD 410, Randox)
- Digitonin (D5628, Sigma)	
การทดสอบสารรบกวน	
- TG Standard (HUMAN)	- 20 % intra lipid
- บิลิรูบิน (14370, FLUKA)	(น้ำมันถั่วเหลือง ไข่แดงไก่ Glycerin)
- น้ำยาตรวจวัดบิลิรูบิน (HUMAN)	- น้ำยาตรวจวัดไตรกลีเซอไรด์ (HUMAN)
- NaHCO ₃ (Honeywell Riedel de Haën™)	- K ₃ Fe(CN) ₆ (ACS Grade, VWR)
- KCN (Honeywell Riedel de Haën™)	- NaOH (MERCK)
การสกัดดีเอ็นเอ	
- ชุดสกัดดีเอ็นเอ (FABGK 001, Favorgen)	- Absolute Ethanol (100983, MERCK)
- DiaplexC™ G6PD genotyping kit (Asian type, SolGent)	- Nusieve & Agarose gel (PC0702, Vivant)
- TBE buffer (10x pH8.3, Vivant)	- น้ำยาย้อมดีเอ็นเอ Ethidium bromide (10 mg/ dl 1610433, Biorad)
- DNA ladder (100 bp., IDT)	
- 6x DNA Loading dye (Thermo Scientific™)	
การทำความสะอาด	
- Sodium Hypochlorite (CLOREX-HC, IMEX)	- 70% Alcohol
อื่นๆ	
- สีส้มอาหาร	- น้ำกลั่น PCR grade

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การผลิตอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ โดยเทคนิค wax printing

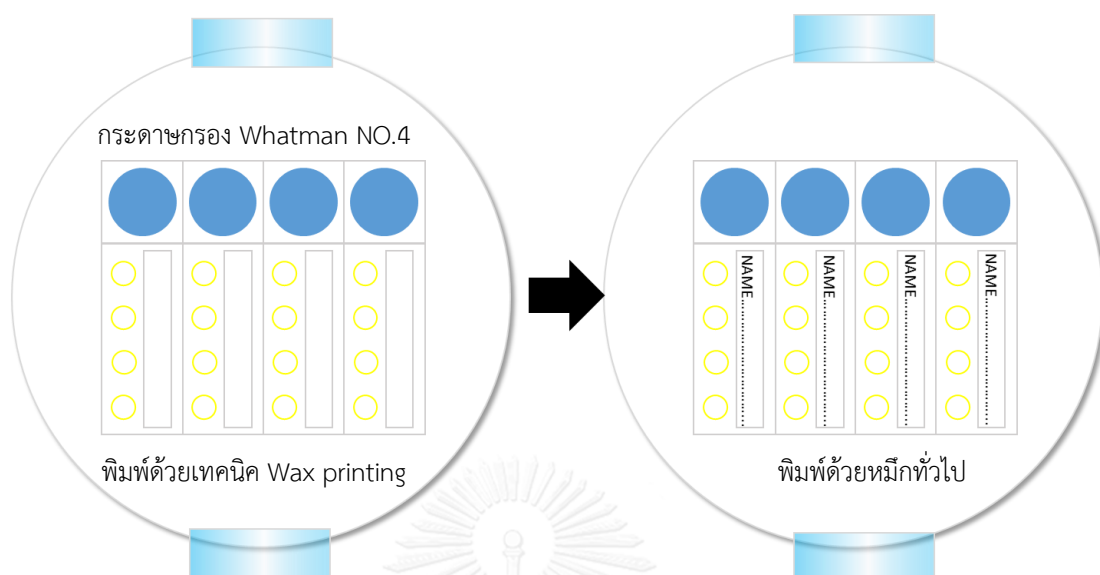
เทคนิคการพิมพ์ wax printing ถูกนำมาใช้เพื่อสร้างอาณาเขตส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำบนกระดาษเพื่อสร้างเป็นอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ

- 1) ออกแบบจากโปรแกรม Microsoft Powerpoint 2010 ดังรูปที่ 30
- 2) พิมพ์แบบอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษลงบนกระดาษ A4 ด้วยหมึกทั่วไปเพื่อระบุตำแหน่งที่จะติดตั้งกระดาษกรอง Whatman NO.4
- 3) แปะกระดาษกรอง Whatman NO.4 ลงบนกระดาษ A4 ณ ตำแหน่งที่พิมพ์ด้วยเทปใส
- 4) พิมพ์หมึก wax ลงบนกระดาษกรองด้วยเครื่องพิมพ์ (ColorQube 8570, Xerox)
- 5) อุ่นแผ่นเหล็ก ด้วย hot plate ที่อุณหภูมิ 150 °C เป็นเวลานาน 5 นาที
- 6) นำอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษที่พิมพ์แล้ววางลงบน Hot plate ที่ 150 °C โดยมีแผ่นเหล็กกดทับด้านบนนาน 2 นาที เพื่อให้หมึก wax ซึมจากผิวกระดาษลงสู่เนื้อกระดาษและเกิดผนังกันน้ำเป็นอาณาเขตส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำอย่างสมบูรณ์
- 7) นำอุปกรณ์ตรวจเข้าเครื่องพิมพ์คำว่า “NAME.....” ด้วยหมึกทั่วไป
- 8) ติดอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษกับเทปกาวป้องกันการรั้วซึม และยึดติดกับแผ่นใสเพื่อความคงทน



รูปที่ 30 ขนาดของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ: PAD

รายละเอียดเพิ่มเติมของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ คำว่า “NAME.....” จะถูกพิมพ์ด้วยอักษร Calibri ขนาด 10.5 ลักษณะสีเส้นดังรูปที่ 30 โดยมีความหนาของเส้น 1 pt.



รูปที่ 31 แสดงขั้นตอนการพิมพ์อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ

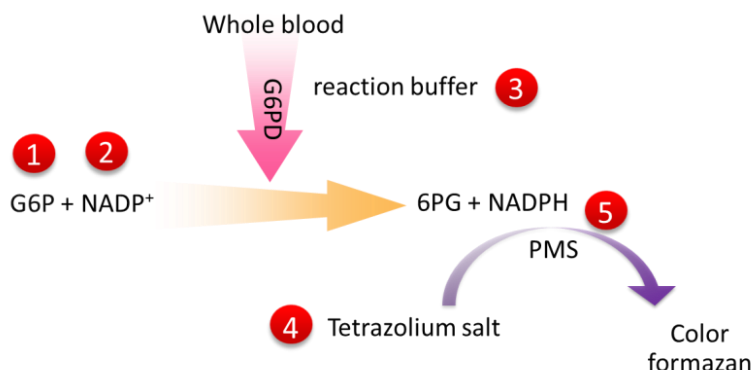
โดยกระดาษกรอง Whatman NO.4 1 แผ่น สามารถจุแบบอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษได้ 6 อัน ซึ่งภายหลังเสร็จสิ้นกระบวนการผลิตจะนำมาตัดแบ่งออกจากกัน

3.1.1 การทดสอบปริมาตรน้ำยาที่เหมาะสมในการตรึงลงบนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ

ทดสอบหาปริมาตรน้ำยาที่เหมาะสมในการตรึงลงบนหลอดปฏิบัติการขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.52 ซม. โดยหยดสีผสมอาหารสีเขียวปริมาตร 1, 2, 3 และ 4 μl ซึ่งปริมาตรที่เหมาะสมคือ ปริมาตรที่น้อยที่สุดที่สีผสมอาหารเต็มและไม่ทันออกนอกวง

ผลการทดลองเบื้องต้น พบว่าปริมาตรน้ำยาที่เหมาะสมในการตรึงลงบนหลอดปฏิบัติการขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.52 ซม. คือ 1 μl ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการทดลองเพิ่มเติมที่ปริมาตร 0.5 μl พบสีเขียวของสีผสมอาหารเต็มวงพอดี แต่ผู้วิจัยยังคงตัดสินใจเลือกใช้ปริมาตรในการตรึงน้ำยาที่ 1 μl เพราะมีปริมาตรที่ไม่ล้นออกนอกวง

3.2 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี



รูปที่ 32 สมการปฏิกิริยาการเกิดสีของ formazan บนอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี

ทำการทดสอบสมมุติฐานปฏิกิริยาข้างต้นในหลอดทดลอง และทำการทดสอบปริมาณความเหมาะสมของน้ำยาบนกระดาษในลำดับต่อไป

หมายเลข 1 G6P ทดสอบที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 mM

หมายเลข 2 NADP⁺ ทดสอบที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 mM

หมายเลข 3 Tris-base buffer ทดสอบที่ความเข้มข้น 100, 200, 300 mM pH 7.6-7.8 + HCl + 5 mM EDTA + 0.02 % digitonin

หมายเลข 4 Tetra-nitroblue tetrazolium salt (TNBT) ทดสอบที่ความเข้มข้น 1, 2, 4, 6 mM

หมายเลข 5 1-methoxyPhenazine methosulphate (1-methoxyPMS) ทดสอบที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 mM

3.2.1 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของน้ำยาในหลอดทดลอง

ทำการตรวจวัดปริมาณของเอนไซม์จีซิกพีดีตัวควบคุม (control normal: PD 2618, Randox, IMED Thailand) ให้ค่าอยู่ในช่วง 1359 ± 271 U/L ด้วยเทคนิค spectrophotometric assay กล่าวคือ การวัดอัตราการผลิต NADPH จากกระบวนการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 340 nm เมื่อแทนที่ชุดน้ำยา (PD410, Randox, IMED Thailand) ด้วยน้ำยาที่ผลิตขึ้นเอง (น้ำยาหมายเลข 1-3 ดังรูปที่ 32) เพื่อหาความเข้มข้นและสภาวะกรดเบส (pH) ที่เหมาะสมที่สุดของปฏิกิริยาในหลอดทดลอง

1. การทดสอบเติม 5 mM EDTA ใน tris-HCl buffer

EDTA มีส่วนช่วยในการรักษาสภาพของน้ำยา และป้องกันการรบกวนปฏิกิริยาที่จะตรวจจากโลหะหนัก ซึ่งปริมาณความเข้มข้น 5 mM เป็นปริมาณความเข้มข้นที่พบได้บ่อยในน้ำยาตรวจวิเคราะห์ตามท้องตลาด

ทำการวัดตัวควบคุม (control normal: PD 2618, Randox, IMED Thailand) ด้วยเทคนิค spectrophotometric assay เปรียบเทียบผลที่ได้ของ tris-HCl buffer ที่มีการเติม 5 mM EDTA และที่ไม่มีการเติม เพื่อศึกษาผลกระทบของ 5 mM EDTA ที่เติมลงใน tris-HCl buffer ต่อปฏิกิริยาในการวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี

2. การทดสอบวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีในหลอดทดลอง

ทดสอบตัวควบคุม SQM-CONN-050 และ SQM-COND-050 (R&D Diagnosis Greece, Thai Can Biotech Co.,Ltd) แทนตัวอย่างเลือดคนปกติ และผู้มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี ตามลำดับ

- 1) นำตัวควบคุมทั้งสองระดับจำนวน 5 μ l ผสมกับน้ำยาจำนวน 80 μ l ในหลอดทดลอง (4 mM G6P 10 μ l, 2.5 mM NADP⁺ 10 μ l, 4 mM 1-methoxyPMS 20 μ l, 200 mM tris-HCl buffer 40 μ l)
- 2) บ่มทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 3) เติม 4 mM TNBT 20 μ l สังเกตสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น คนปกติจะปรากฏสีม่วงดำของ formazan ผู้มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีจะปรากฏสีแดงของเลือดและ 1-methoxyPMS

3.2.2 การทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของน้ำยาบนกระดาษ

เพื่อทำการทดสอบหาจำนวนหยดและความเข้มข้นของสารในการตรึงลงบนกระดาษที่ทำให้สามารถสังเกตเห็นสีของปฏิกิริยา (colorimetric assays) ได้ชัดเจนที่สุดและมีประสิทธิภาพในการแยกผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีรุนแรงกับผู้ที่มีระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีปกติมากที่สุด ซึ่งอาศัยหลักการถ่ายภาพและวิเคราะห์ความเข้มสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนภาพถ่ายอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS6 โดยการสร้างพื้นที่วงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 175x175 พิกเซลครอบคลุมพื้นที่ในการอ่านผล

- 1) สร้างพื้นที่วงกลมในการอ่านผลของปฏิกิริยาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.52 ซม. บนกระดาษด้วยเทคนิค wax printing
- 2) ทำการทดสอบหาจำนวนหยดที่เหมาะสมของ G6P, NADP⁺, TNBT โดยทำการตริ้งน้ำยาต่างๆ รายละเอียดการทดสอบตั้งขั้นตอนที่ 3.2.2 (1), (2) และ (3)
- 3) ผสมเลือดปริมาตร 5 μ l, 10 mM 1-methoxyPMS ปริมาตร 20 μ l และ 200 mM tris-HCl buffer 80 μ l ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล. หยดปฏิกิริยาจากหลอดทดลอง 1 μ l ลงบนพื้นที่วงกลมแต่ละวง ถ่ายภาพความเข้มสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสแกนเนอร์ (DCP-165C, Brother) นาที่ที่ 30 วิเคราะห์ผลความเข้มสีที่เกิดขึ้นทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้งเพื่อยืนยันผล

1. การทดสอบหาจำนวนหยดที่เหมาะสมของ G6P ในการตริ้ง

พื้นที่วงกลมจำนวน 5 วง ถูกตริ้งด้วย 2.5 mM NADP⁺ 1 μ l และ 2 mM TNBT 1 μ l อย่างละ 1 หยดทุกวง และตริ้ง 4 mM G6P จำนวน 0, 1, 2, 3 และ 4 หยดในแต่ละวงตามลำดับ ผลการทดลองเบื้องต้นพบว่า 4 mM G6P ต้องใช้จำนวนถึง 3 หยด จึงจะเกิดสีที่ชัดเจนสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่าบนกระดาษ คณะวิจัยจึงศึกษาเพิ่มเติมโดยการเพิ่มความเข้มข้นจนถึงระดับ 12 mM G6P

2. การทดสอบหาจำนวนหยดที่เหมาะสมของ NADP⁺ ในการตริ้ง

พื้นที่วงกลมจำนวน 4 วง ทุกวงจะถูกตริ้งด้วย G6P 1 μ l ตามผลการทดลองที่ 3.2.2 (1) และ 2 mM TNBT 1 μ l อย่างละ 1 หยด และตริ้ง 2.5 mM NADP⁺ จำนวน 0, 1, 2 และ 3 หยดในแต่ละวงตามลำดับ

3. การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TNBT ในการตริ้ง

พื้นที่วงกลมจำนวน 5 วง ทุกวงจะถูกตริ้งด้วย G6P 1 μ l ตามผลการทดลองที่ 3.2.2 (1) และตริ้ง 2.5 mM NADP⁺ 1 μ l จำนวนหยดตามผลการทดลองที่ 3.2.2 (2) และตริ้ง TNBT 1 μ l 1 หยด ที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 4, 6 mM ในแต่ละวงตามลำดับ

4. การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1-methoxyPMS

พื้นที่วงกลมจำนวน 7 วง ถูกตรึงน้ำยาตามผลการทดลองที่ 3.2.2 (1), (2) และ (3) ตามลำดับ เนื่องจากการตรึง 1-methoxyPMS และ TNBT ณ ตำแหน่งเดียวกัน จะทำให้เกิดผลลบลอม ทำให้มิได้ทำการตรึง 1-methoxyPMS ลงบนกระดาษ หากแต่นำไปทดสอบหาความเข้มข้น โดยนำไปผสมไว้ร่วมกับ tris-HCl buffer ที่ใช้เป็นน้ำยาในการตรวจแทน

1-methoxyPMS จำนวน 20 μl ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 mM) ผสมกับ 200 mM tris-HCl buffer pH 7.7-7.6 + 5 mM EDTA + 0.02 % digitonin จำนวน 80 μl และเลือดครบส่วน 5 μl ในหลอดทดลอง 1.5 มล. หยดปฏิกิริยาจากหลอดทดลอง 1 μl ลงบนพื้นที่วงกลมแต่ละวงที่ได้ทำการตรึงน้ำยาไว้แล้ว ถ่ายภาพความเข้มสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสแกนเนอร์ นาที่ที่ 30 บันทึกผลความเข้มสีที่เกิดขึ้น ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้งเพื่อยืนยันผล

การทดลองนี้จะใช้ตัวอย่างเลือดผู้ที่มีระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีตีปกติ และตัวอย่างเลือดผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีรุนแรงในการทดสอบ

3.2.3 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมอื่นๆ ในการตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีด้วยอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลฐานกระดาษ

1. การทดสอบหาอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างเลือดกับน้ำยาที่ใช้ตรวจ

เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวอย่างเลือดครบส่วนกับน้ำยาที่ใช้ตรวจ ในขั้นตอนการสกัดเอนไซม์จีซิกพีตีออกจากเม็ดเลือดแดงก่อนหยดลงบนอุปกรณ์ตรวจ โดยกำหนดปริมาตรคงที่ของเลือดครบส่วนไว้ที่ 5 μl ผสมกับน้ำยาตรวจตั้งแต่ 50 ถึง 150 μl หรืออัตราส่วน 1:10 ถึง 1:30

- 1) สร้างพื้นที่วงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.52 ซม. จำนวน 7 วง ด้วยเทคนิค wax printing
- 2) ตรึงน้ำยาตามผลการทดลองที่ 3.2.2 โดยหลุมแรกจะไม่ทำการตรึง G6P
- 3) ทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวอย่างเลือดครบส่วนกับน้ำยาที่ใช้ตรวจ
- 4) หยดปฏิกิริยาจากหลอดทดลอง 1 μl ลงบนพื้นที่วงกลมแต่ละวง
- 5) ถ่ายภาพอุปกรณ์ตรวจนาที่ที่ 30 วิเคราะห์ความเข้มสีที่เกิดขึ้นของภาพถ่ายอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS6 โดยการสร้างพื้นที่วงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 175×175 พิกเซล ครอบคลุมพื้นที่ในการอ่านผลทั้ง 4 หลุมปฏิกิริยา โดยหลุมแรกจะใช้เป็นตัวหักล้างสีพื้น

หลังของเลือดและ 1-methoxyPMS (blank) กับหลุมปฏิกริยาอีก 3 หลุมในการรายงานผล

การทดลองนี้จะใช้ตัวอย่างเลือดผู้ที่มีระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีตีปกติ และตัวอย่างเลือดผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีรุนแรงในการทดสอบ ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้งเพื่อยืนยันผล

2. การทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรวจวินิจฉัย

การทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการอ่านผลอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีฐานกระดาษ คือ ช่วงระยะเวลาที่ความเข้มสีของปฏิกริยาที่เกิดขึ้นบนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษคงที่ และสามารถจำแนกผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีรุนแรงกับผู้ที่มีระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีตีปกติได้เด่นชัด

- 1) สร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษเทคนิค wax printing
- 2) ตรึงน้ำยาตามผลการทดลองที่ 3.2.2 โดยหลุมแรกจะไม่ทำการตรึง G6P
- 3) ผสมตัวอย่างเลือดผู้ที่มีระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีตีปกติกับน้ำยาที่ใช้ตรวจ ตามผลการทดลองที่ 3.2.3 (1)
- 4) ถ่ายภาพด้วยเครื่องสแกนเนอร์นาที่ที่ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30
- 5) วิเคราะห์ความเข้มสีที่เกิดขึ้นด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS6 โดยการสร้างพื้นที่วงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 175×175 พิกเซล ครอบคลุมพื้นที่ในการอ่านผลทั้ง 4 หลุมปฏิกริยา โดยหลุมแรกจะใช้เป็นตัวหักล้างสีพื้นหลังของเลือดและ 1-methoxyPMS (blank) กับหลุมปฏิกริยาอีก 3 หลุมในการรายงานผล
- 6) ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อยืนยันผล และทำการทดสอบข้างต้นซ้ำกับตัวอย่างเลือดผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีรุนแรง

3. การทดสอบหาระบบสีที่เหมาะสมในการรายงานผล

ทดสอบหาช่องสีและระบบสีที่เหมาะสมที่สุดในการรายงานผลเชิงปริมาณวิเคราะห์ ด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS6 โดยหาช่องสีและระบบสีที่ให้ค่าช่วงของผลลัพธ์ที่กว้างที่สุดและสอดคล้องกับปฏิกริยาความเข้มสีที่เกิดขึ้น

- 1) สร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษเทคนิค wax printing
- 2) ตรึงน้ำยาตามผลการทดลองที่ 3.2.2 โดยหลุมแรกจะไม่ทำการตรึง G6P

- 3) ผสมตัวอย่างเลือดผู้ที่มีระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีปกติกับน้ำยาที่ใช้ตรวจ ตามผลการทดลองที่ 3.2.3 (1)
- 4) ถ่ายภาพด้วยเครื่องสแกนเนอร์ ตามผลการทดลองที่ 3.2.3 (2)
- 5) วิเคราะห์ความเข้มสีที่เกิดขึ้นของภาพถ่ายอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษทั้งระบบสี RGB และ CMYK ด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS6 โดยการสร้างพื้นที่วงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 175x175 พิกเซลครอบคลุมพื้นที่ในการอ่านผลทั้ง 4 หลุมปฏิกิริยา

3.3 การศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ

3.3.1 การทดสอบความแม่นยำของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ

ผลิตอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ ในคราวเดียวกัน จำนวน 40 ชุด นำเลือดคนปกติและผู้มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีมาทดสอบกับอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ ตัวอย่างละ 20 ครั้ง วัดความเข้มสีที่เกิดขึ้นด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS6 ประเมินความแม่นยำจากค่า %CV

สูตร

$$\%CV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

%CV ที่ได้ไม่ควรเกิน 15 % ทั้ง 2 ตัวอย่างเลือด

3.3.2 การสร้างกราฟมาตรฐานในการแปลผลของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ

ทำการวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีเทียบกับความเข้มสีที่ตรวจได้จากอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี และสร้างกราฟมาตรฐาน ($y = mx+c$) ที่ใช้สำหรับการแปลผลตรวจจากอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ โดยเตรียมตัวอย่างเลือดที่มีระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีต่างๆ แตกต่างกัน 5 ระดับ (ดังตารางที่ 6) มาทำการตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี ควบคู่กับการตรวจวัดด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง บันทึกผล และสร้างกราฟ

ตารางที่ 6 การเตรียมตัวอย่างมาตรฐานสำหรับอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ

	S1	S2	S3	S4	S5
	(0x)	(0.25x)	(0.5x)	(0.75x)	(1x)
เม็ดเลือดแดงอัดแน่นของ คนปกติ	0 ml	0.25 ml	0.5 ml	0.75 ml	1 ml
เม็ดเลือดแดงอัดแน่นของ ผู้มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี	1 ml	0.75 ml	0.5 ml	0.25 ml	0 ml
0.9 % NSS	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

**3.3.3 การทดสอบหาขีดจำกัด หรือ limit of detection (LOD) ในการตรวจของ
อุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ**

- 1) สร้างพื้นที่วงกลมจำนวน 10 วงด้วยเทคนิค wax printing
- 2) ทำการตริ้งน้ำยาตามผลการทดลองที่ 3.2.2 โดยไม่ต้องตริ้ง G6P
- 3) นำตัวอย่างเลือดมาตรวจในพื้นที่วงกลมทั้ง 10 พร้อมทั้งวัดความเข้มสี ตามผลการทดลองที่ 3.2.3
- 4) คำนวณหาค่า limit of detection จากสูตร [122]

สูตร

$$\text{Limit of detection} = \frac{3.3\sigma}{S}$$

σ แทนค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ Blank

S แทนค่า sensitivity ของอุปกรณ์ตรวจ (ความชันของกราฟมาตรฐาน)

3.3.4 การทดสอบการรบกวนจากปริมาณเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างเลือดครบส่วน

เพื่อศึกษาผลกระทบของปริมาณเม็ดเลือดแดงตั้งต้นในตัวอย่างเลือดครบส่วนต่อผลการตรวจด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ อันเนื่องมาจากเอนไซม์จีซิกพีดีอยู่ในเม็ดเลือดแดง ปริมาณฮีมาโตคิต 20-70 % ของตัวอย่างเลือดครบส่วน จึงถูกนำมาทดสอบกับอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ

- 1) สร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษเทคนิค wax printing จำนวน 7 ชุด
- 2) นำตัวอย่างเลือดผู้ที่ไม่มีการพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีจำนวน 1 คนมาปรับค่าฮีมาโตคิต เป็น 20 ถึง 70 %

- 3) นำตัวอย่างเลือดที่ทำการปรับค่าความเข้มข้นของเม็ดเลือดแล้วมาตรวจด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ และวิเคราะห์ความเข้มข้นที่เกิดขึ้นด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS6
- 4) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อยืนยันผล
- 5) ทำการทดลองซ้ำอีกครั้งกับตัวอย่างเลือดผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี
- 6) เปรียบเทียบความแตกต่างของระดับสีในแต่ละระดับความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดง ที่ 95 % confidence interval (one-way ANOVA test) โดยกำหนดค่า p -value ที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ

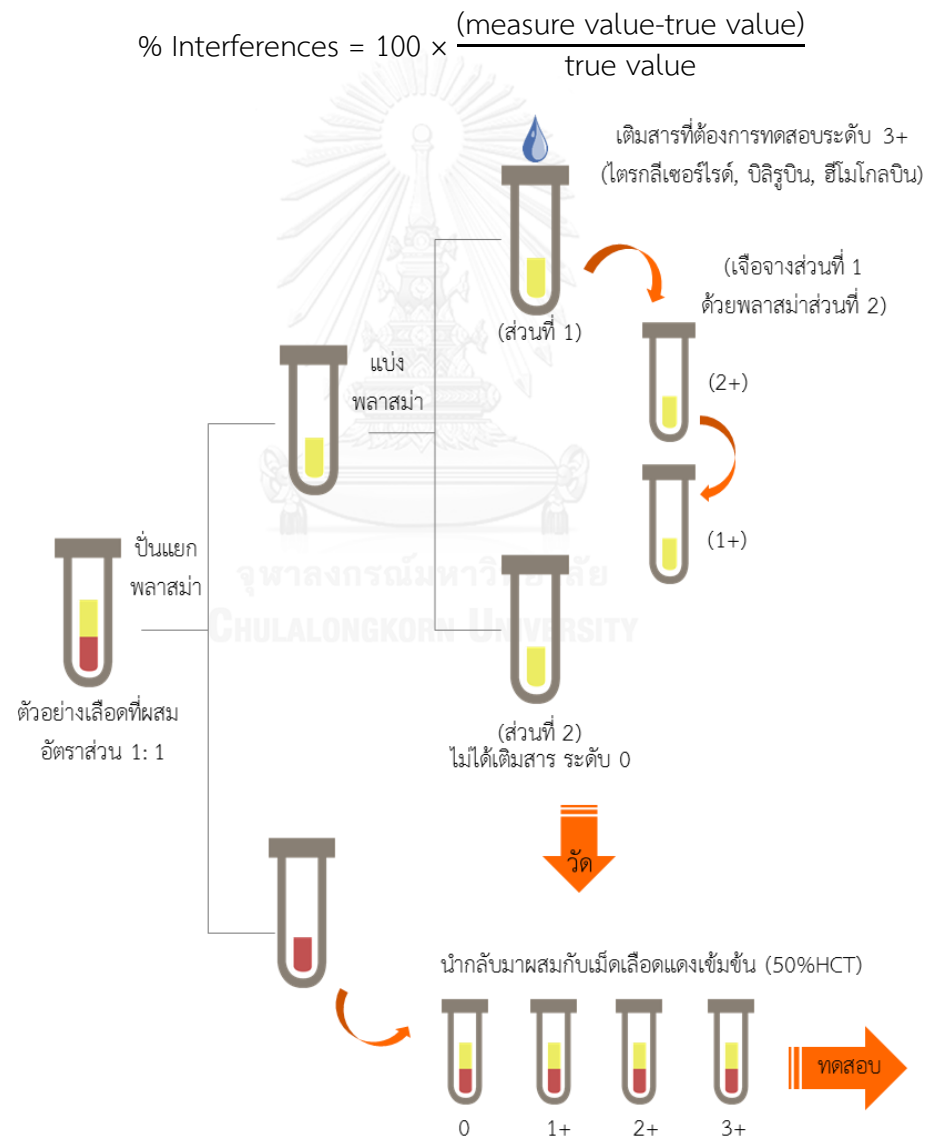
3.3.5 การทดสอบการรบกวนจากปริมาณเม็ดเลือดขาวในตัวอย่างเลือดครบส่วน

เพื่อศึกษาผลกระทบของเม็ดเลือดขาวในตัวอย่างเลือดครบส่วนต่อผลการตรวจด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ อันเนื่องมาจากเอนไซม์จีซิกพีดีมีอยู่ในเม็ดเลือดขาวด้วย โดยนำตัวอย่างเลือดที่มีปริมาณเม็ดเลือดขาวแตกต่างกัน 4 ระดับ ทดสอบกับอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ

- 1) สร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษเทคนิค wax printing จำนวน 4 ชุด
- 2) นำตัวอย่างเลือดผู้ที่ไม่มีการพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีจำนวน 1 คนมาปั่นตก
- 3) จัดเก็บชั้น buffy coat ประมาณ 300 μ l เติมพลาสมาอีก 300 μ l
- 4) วัดฮีมาโตคิต และนับปริมาณเม็ดเลือดขาว
- 5) ปรับฮีมาโตคิตของตัวอย่างเลือดเดียวกันที่เก็บมาเฉพาะเม็ดเลือดแดงให้เท่ากับหลอดที่จัดเก็บเม็ดเลือดขาว ปริมาตร 600 μ l
- 6) นำตัวอย่างความเข้มข้นของเม็ดเลือดขาวทั้ง 2 ระดับ มาทำการเจือจางซึ่งกันและกันจนได้ตัวอย่างเลือดที่มีความเข้มข้นของเม็ดเลือดขาวแตกต่างกัน 4 ระดับ
- 7) นำตัวอย่างเลือดที่ทำการปรับจำนวนของเม็ดเลือดแล้วมาตรวจด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ และวิเคราะห์ความเข้มข้นที่เกิดขึ้นด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS6
- 8) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อยืนยันผล
- 9) เปรียบเทียบความแตกต่างของระดับสีในแต่ละระดับความเข้มข้นของเม็ดเลือดขาว ที่ 95 % confidence interval (one-way ANOVA test) โดยกำหนดค่า p -value ที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ

3.3.6 การทดสอบสารรบกวนบนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ

นำตัวอย่างเลือดผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีผสมกับผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีในอัตราส่วน 1:1 มาทดสอบกับอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีฐานกระดาษ เพื่อศึกษาผลกระทบของสารต่างๆในน้ำเลือดที่อาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีตีด้วยอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ โดยวัดความเข้มสีที่เกิดขึ้นด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS6 เปรียบเทียบความต่างของผลความเข้มสีที่ได้ของแต่ละระดับความเข้มข้นกับชุดตัวอย่างควบคุม (negative control: true value) ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง (% Interferences >15: มีการรบกวน) [123], [124], [125]

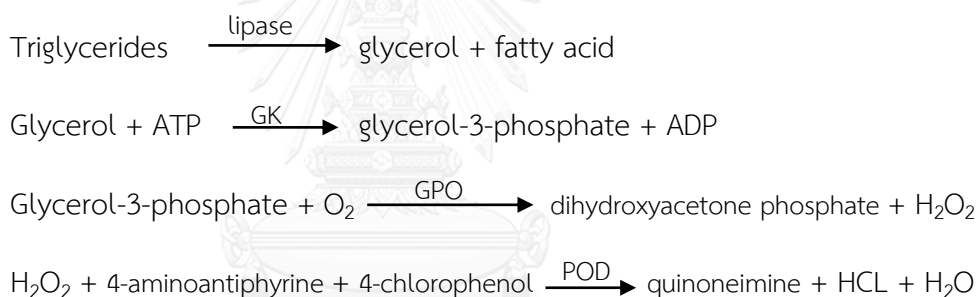


รูปที่ 33 แผนผังการเตรียมตัวอย่างเลือดสำหรับการทดสอบสารรบกวนที่ความเข้มข้น 4 ระดับ

1. การทดสอบการรบกวนจากไขมัน (lipemic)

- นำตัวอย่างเลือดที่ผสมแล้วมาแยกน้ำพลาสมาออกจากเม็ดเลือดแดงเข้มข้น (ปั่น 3,000 rpm. 5 นาที อุณหภูมิห้อง)
- นำพลาสมาที่ได้มาปรับค่าความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ โดยแยกพลาสมาออกเป็น 2 ส่วน:
 - ส่วนที่ 1 ปรับความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมาเป็น 2,000 mg/dl โดยการเติม 20 % Intralipid
 - ส่วนที่ 2 ใช้สำหรับเจือจางพลาสมาให้ได้ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ 2 ระดับ คือ 1,000 และ 400 mg/dl
- ทำการวัดค่าไตรกลีเซอไรด์ด้วยชุดน้ำยา TRIGLYCERIDES liquicolor^{mono} (HUMAN: Germany) เพื่อยืนยันระดับความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ที่เตรียม

หลักการวัดไตรกลีเซอไรด์



ตารางที่ 7 วิธีการตรวจวัดไตรกลีเซอไรด์

สาร	หลอด Blank (μl)	หลอดตัวอย่าง (μl)
RGT (Reagent triglycerides)	1,000	1,000
Sample	----	10

วัดความเข้มสีของสาร quinoneimine ที่ Hg 546 nm ดังสมการปฏิกิริยาข้างต้น

สูตร $\text{ไตรกลีเซอไรด์ (mg/dl)} = \Delta A_{546} \text{ ตัวอย่าง} \times 1,351$
 1,351 คือ factor ได้จากการวัดไตรกลีเซอไรด์มาตรฐาน 200 mg/dl

- ผสมตัวอย่างเม็ดเลือดแดงเข้มข้นกับพลาสมาที่มีไตรกลีเซอไรด์เข้มข้น 0, 400, 1,000, 2,000 mg/dl [50: 50 μl (50 %Hct)]

- 5) นำตัวอย่างเลือดที่มีความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ทั้ง 4 ระดับไปตรวจด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาศ และวิเคราะห์ผล

2. การทดสอบการรบกวนจากฮีโมโกลบิน (hemolysis)

- นำตัวอย่างเลือดที่ผสมแล้วมาแยกน้ำพลาสมาออกจากเม็ดเลือดแดงเข้มข้น (ปั่น 3,000 rpm. 5 นาที อุณหภูมิห้อง)
- นำพลาสมาที่ได้มาปรับค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน โดยแยกพลาสมาออกเป็น 2 ส่วน:
 ส่วนที่ 1 ปรับความเข้มข้นของฮีโมโกลบินในพลาสมาเป็น 6 g/dl โดยการเติม Hemolysate ที่เตรียมไว้
 ส่วนที่ 2 ใช้สำหรับเจือจางพลาสมาให้ได้ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน 3 ระดับ คือ 3, 1.5 และ 0.75 g/dl
- ทำการวัดค่าฮีโมโกลบินด้วยน้ำยา DRABKIN' solution

หลักการวัดค่าฮีโมโกลบิน



ตารางที่ 8 วิธีการตรวจวัดค่าฮีโมโกลบิน

สาร	หลอด blank (μl)	หลอดตัวอย่าง (μl)
DRABKIN's solution	5,000	5,000
Sample	----	20

วัดปริมาณ cyanmethemoglobin ที่แปรผันตรงกับปริมาณฮีโมโกลบิน ที่ 540 nm.

$$\text{ฮีโมโกลบิน (g/dl)} = \Delta A_{540} \text{ ตัวอย่าง} \times 35$$

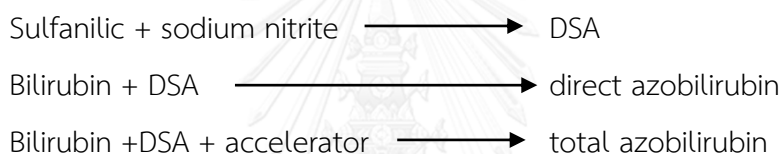
35 คือ factor ได้จากการวัดสารมาตรฐาน

- ผสมตัวอย่างเม็ดเลือดแดงเข้มข้นกับพลาสมาที่มีฮีโมโกลบินเข้มข้น 0.75, 1.5, 3, 6 g/dl [50: 50 μl (50 %Hct)]
- นำตัวอย่างเลือดที่มีความเข้มข้นของฮีโมโกลบินทั้ง 4 ระดับไปตรวจด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาศ และวิเคราะห์ผล

3. การทดสอบการรบกวนจากบิลิรูบิน (icteric)

- 1) นำตัวอย่างเลือดที่ผสมแล้วมาแยกน้ำพลาสมาออกจากเม็ดเลือดแดงเข้มข้น (ปั่น 3,000 rpm. 5 นาที อุณหภูมิห้อง)
- 2) นำพลาสมาที่ได้มาปรับค่าความเข้มข้นของบิลิรูบิน โดยแยกพลาสมาออกเป็น 2 ส่วน:
 - ส่วนที่ 1 ปรับความเข้มข้นของบิลิรูบินในพลาสมาเป็น 500 μM โดยการเติม unconjugated bilirubin ที่เตรียมไว้
 - ส่วนที่ 2 สำหรับเจือจางพลาสมาให้ได้ความเข้มข้นของบิลิรูบิน 3 ระดับ คือ 0, 100 และ 250 μM
- 3) ทำการวัดค่าบิลิรูบินด้วยชุดน้ำยา BILIRUBIN D+T liquidcolor (HUMAN: Germany)

หลักการ



การคำนวณหาปริมาณ unconjugated bilirubin

$$\text{Unconjugated bilirubin} = \text{total bilirubin} - \text{conjugated bilirubin}$$

ตารางที่ 9 วิธีการตรวจวัด Total bilirubin

สาร	Sample blank (μl)	หลอดตัวอย่าง (μl)
TBR	1,000	1,000
TNR	----	40
ผสม 5 นาที		
Sample	100	100
ผสม 10 นาที ถึง 30 นาที		

วัดปริมาณ total azobilirubin ที่ 546 nm.

ตารางที่ 10 วิธีการตรวจวัด conjugated Bilirubin

สาร	Sample blank (μl)	หลอดตัวอย่าง (μl)
DBR	1,000	1,000
DNR	----	40
ผสม 2 นาที		
Sample	100	100
ผสม 5 นาที		

วัดปริมาณ direct azobilirubin ที่ 546 nm.

สูตร Total bilirubin หรือ conjugated bilirubin (μM) = ΔA_{546} ตัวอย่าง \times 222.3

222.3 คือ factor ได้จาก 13×17.1

13 คือ factor ของน้ำยาที่ตรวจวัด

17.1 คือ factor การเปลี่ยนหน่วยจาก mg/dl เป็น $\mu\text{mol/l}$ หรือ μM

- 4) ผสมตัวอย่างเม็ดเลือดแดงเข้มข้นกับพลาสมาที่มีบิลิรูบินเข้มข้น 0, 100, 250 และ 500 μM [50: 50 μl (50 %Hct)]
- 5) นำตัวอย่างเลือดที่มีความเข้มข้นของบิลิรูบินทั้ง 4 ระดับไปตรวจด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ และวิเคราะห์ผล

3.4 การทดสอบตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธีที่ใช้อยู่ปัจจุบันและวิธีมาตรฐาน

3.4.1 การตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีวิธี fluorescent spot test

Fluorescent spot test (FST) เป็นการตรวจคัดกรองผู้มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีเชิงคุณภาพ โดยอาศัยความสามารถในการเรืองแสงของ NADPH จากการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี ภายใต้อสงยูวี (365 nm) โดยมีขั้นตอนการตรวจคัดกรองดังนี้

- 1) เลือดจำนวน 5 μl จากหลอด EDTA บ่มรวมกับน้ำยาจากชุดตรวจ 100 μl (SQMMR500, R&D Diagnosis Greece) ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
- 2) หยดปฏิกิริยาลงบนกระดาษกรอง 10 μl รอแห้ง
- 3) อ่านผลภายใต้อสงยูวี

ผลการตรวจด้วยวิธีนี้สามารถอ่านผลได้ดังนี้ ผู้ที่มีระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีปกติจะสามารถสังเกตเห็นการเรืองแสงได้ (ผลบวก) ส่วนผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีจะไม่เห็นการเรืองแสง (ผลลบ)



รูปที่ 34 ลำดับขั้นตอนการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี ด้วยวิธี FST [126]

3.4.2 การตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ

อุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีเป็นอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษที่ถูกพัฒนาขึ้นโดยคณะผู้วิจัยให้สามารถรายงานระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีได้ โดยอาศัยหลักการ cytochemical staining (ดังรูปที่ 32)

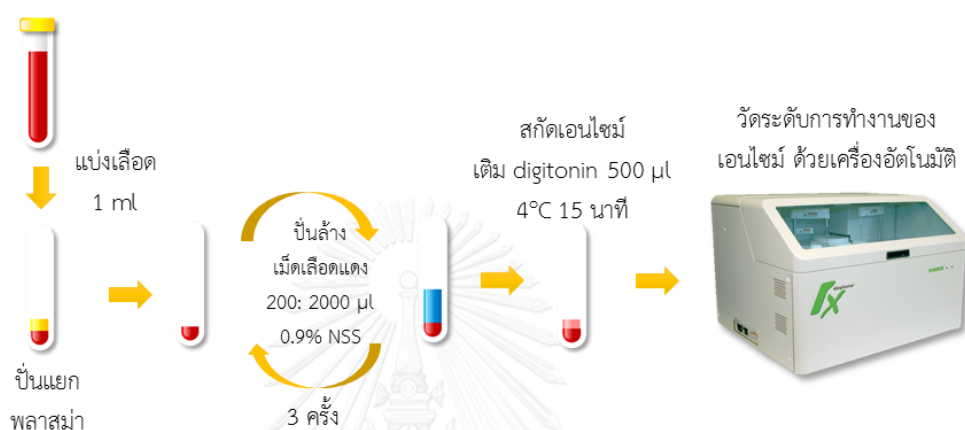
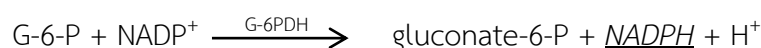


รูปที่ 35 ขั้นตอนการตรวจด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ

- 1) ระบุชื่อตัวอย่างเลือดบนอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ
- 2) ผสมเลือดครบส่วน 5 μl กับน้ำยาตรวจ 50 μl บริเวณตำแหน่งวงกลมสีฟ้า (ดูดขึ้นดูดลงประมาณ 15 ครั้ง)
- 3) หยดตัวอย่างที่ผสมน้ำยาแล้วปริมาตร 1 μl ลงบนหลุมปฏิกิริยาทั้ง 4 หลุม
- 4) จับเวลา 25 นาที
- 5) ถ่ายภาพด้วยโปรแกรม Control Center 3 (CC3) ซึ่งเป็นโปรแกรมควบคุมการทำงานของสแกนเนอร์ (DCP-165C, Brother)
- 6) ภาพที่ได้ขนาด 9.4x14.2 ซม., 24-bit, 1,200 dpi, ระบบสี RGB
- 7) เปลี่ยนระบบสีของภาพเป็น CMYK และเลือกวัดช่องสี cyan
- 8) ใช้ elliptical marquee tool ขนาด 175x175 พิกเซล คลุมพื้นที่ปฏิกิริยา
- 9) บันทึกผลความเข้มสีแต่ละหลุมทั้งสี่หลุมลงโปรแกรม G6PD CalColor.exe
- 10) กดปุ่ม calculate เพื่อคำนวณระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี

3.4.3 การตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี

Spectrophotometric assay เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี (biochemical G6PD activity) กล่าวคือ การวัดอัตราการผลิต NADPH จากกระบวนการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 340 nm



รูปที่ 36 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี

- 1) แบ่งเลือดครบส่วนจากหลอดเลือดชนิด CPDA ปริมาตร 1,000 µl มาปั่นตกที่ 3,000 rpm. 4 °C ประมาณ 10 นาที
- 2) ดูดเม็ดเลือดแดงเข้มข้นจำนวน 200 µl มาใส่หลอดใหม่ ที่มี 0.9 % NSS ปริมาตร 2,000 µl แล้วปั่นล้างที่ 2,500 rpm. 4 °C ประมาณ 10 นาที
- 3) ดูดน้ำล้างใสทิ้งประมาณ 1,800 µl จากหลอดที่ปั่นตก
- 4) เติมน้ำ 0.9 % NSS ปริมาตร 2,000 µl แล้วปั่นล้างที่ 2,500 rpm. 4 °C ประมาณ 10 นาที
- 5) ทำซ้ำข้อ 3-4 อีกครั้ง (รวมปั่นล้างทั้งหมด 3 ครั้ง)
- 6) ดูดน้ำล้างใสครั้งสุดท้ายทิ้งให้ได้มากที่สุด
- 7) สกัดเอนไซม์จากเม็ดเลือดแดงด้วยการเติมน้ำ 0.02 % digitonin 500 µl ปั่นที่ 4 °C ประมาณ 15 นาที
- 8) นำ hemolysate ที่ได้ไปปั่นตกที่ 3,000 rpm. 4 °C ประมาณ 10 นาที
- 9) ดูดบริเวณผิวหน้าของ hemolysate ปริมาตร 300 µl ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อเข้าเครื่องตรวจวัด

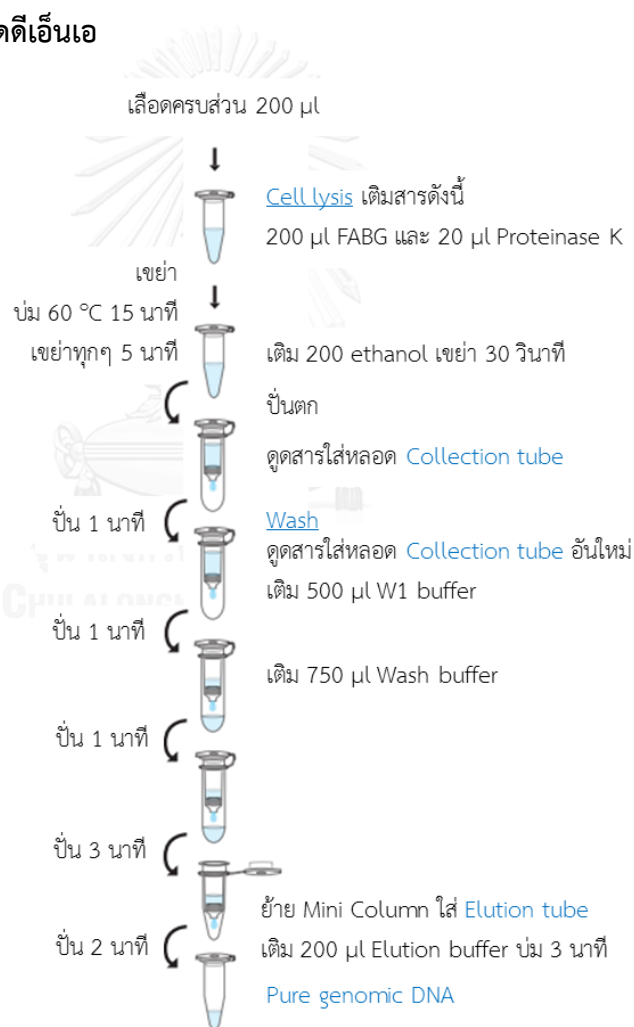
10) ตรวจวัด biochemical G6PD activity ด้วยเครื่องตรวจวัดอัตโนมัติ (Randox Daytona, IMED Thailand) รายงานผลเป็นระดับการทำงานของเอนไซม์จีซีจีพีต่อค่าฮีโมโกลบิน (IU/gHb)

$$\text{G6PD (IU/gHb)} = \frac{\text{mU. erthrocytes per ml}}{\text{Hb (g/dl)} \times 10}$$

3.4.4 การตรวจวิเคราะห์จีโนมไทป์ของกลุ่มตัวอย่าง

การตรวจวิเคราะห์จีโนมไทป์ของกลุ่มตัวอย่าง เพื่อจำแนกชนิดการกลายพันธุ์ยีนจีซีจีพี ดีบนโครโมโซม X ของกลุ่มตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ 1. สกัดดีเอ็นเอ และ 2. วิเคราะห์จีโนมไทป์

1. การสกัดดีเอ็นเอ



รูปที่ 37 ลำดับขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ [127]

เลือดจำนวน 200 μl จากหลอด 3.2 % sodium citrate ถูกนำมาสกัด DNA ขั้นตอนการสกัด DNA เป็นไปตามเอกสารคู่มือการสกัด DNA (ดังรูปที่ 37) ที่แนบมากับ

ชุดสกัด Blood Genomic DNA Extraction Mini Kit (FABGK 001, Favorgen) ทุกการปั่นใช้ความเร็ว 14,000 rpm

2. วิเคราะห์จีโนไทป์

วิเคราะห์จีโนไทป์ของกลุ่มตัวอย่าง ด้วยชุดตรวจ DiaplexC™ G6PD Genotyping Kit (Asian type) ภายหลังจากสกัดดีเอ็นเอ โดยอาศัยเทคนิค multiplex allele specific PCR ในการออกแบบ primer ให้มีลักษณะจำเพาะต่อตำแหน่งการกลายพันธุ์ (single nucleotide polymorphism: SNP) ทั้ง 8 ชนิด ดังตารางที่ 11


ตารางที่ 11 การวิเคราะห์ DiaplexC™ G6PD Genotyping Kit (Asian type)

Band	Size (bp)	G6PD mutation		WHO Classification
1	1,234	Internal control		-----
2	803	Union	1360 C>T	Class II
3	681	Canton	1376 G>T	Class II
4	557	Kaiping	1388 G>A	Class II
5	501	Viangchan	871 G>A	Class III
6	337	Mahidol	487 G>A	Class II
7	262	Mediterranean	563 C>T	Class II
8	234	Coimbra	592 C>T	Class II
9	154	Vanua Lava	383 T>C	Class III

- 1) เช็ดทำความสะอาดตู้และปิเปตด้วย น้ำกลั่น, 70 % alcohol, และ chlorox พร้อมทั้งเปิด UV 15 นาที
- 2) เตรียม mastermix สำหรับการทำ multiplex allele specific PCR บน ice block ดังตารางที่ 12 โดยปริมาตรที่เตรียมจะต้องเตรียมเพิ่มเติมจากจำนวนตัวอย่างที่จะตรวจอีก 3 reactions คือ 1. negative control, 2. positive control และ 3. ปริมาตร reaction ที่เผื่อในการปิเปต
- 3) ผสมให้เข้ากันและปั่นตก ก่อนแยกใส่หลอด PCR reaction 0.2 ml สำหรับวิเคราะห์จีโนไทป์แต่ละตัวอย่าง
- 4) ย้ายตำแหน่งไปยังบริเวณที่ไม่มีอากาศไหลเวียนเพื่อหยุดตัวอย่างดีเอ็นเอ
- 5) ปั่นตก นำหลอด PCR reaction เข้าเครื่อง PCR Thermo cycler

- 6) กำหนดค่าต่างๆของเครื่อง PCR Thermo cycler ดังตารางที่ 13
- 7) ภายหลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการ PCR จะนำไปอ่านผล ด้วยเทคนิค gel electrophoresis

ตารางที่ 12 การเตรียม mastermix ต่อ 1 reaction



สาร	ปริมาณ (µl)
2x Multiplex PCR Smart mix	6.25
Primer mixture	1
Nuclease free water	4.75
Total	12
DNA template: PCR water 1: 2 µl	1

ตารางที่ 13 การตั้งค่าเครื่อง PCR Thermo cycler

ขั้นตอน	อุณหภูมิ °C	เวลา	จำนวนรอบ
Initial PCR activation	95	15 นาที	1
Denaturation	95	30 วินาที	30
Annealing	60	30 วินาที	
Extension	72	40 วินาที	
Final extension	72	5 นาที	1
Store	25	∞	

- 8) ใช้ 4 % nusieve: agarose Gel (3:1) ที่ผสมด้วย ethidium bromide 5 µl ในการวิเคราะห์ผลหลังทำ PCR ภายใต้อุณหภูมิ 0.5x TBE ความต่างศักย์ 125 V . 65 นาที
- 9) ตัวอย่างดีเอ็นเอจะถูกโหลดลงเจลที่ 5 µl, DNA ladder 3 µl และ standard marker 3 µl
- 10) อ่านผล gel electrophoresis ด้วยเครื่องวิเคราะห์เจล (Gel DocTM XR+, Bio-rad)

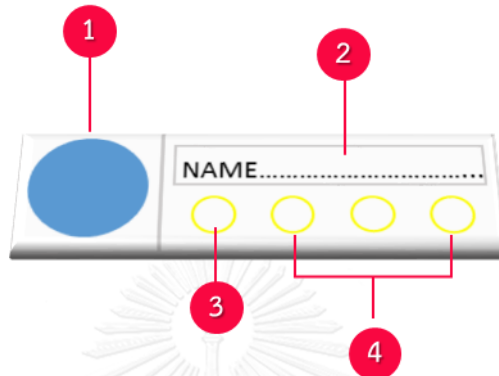
3.4.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

โปรแกรมที่ใช้ในการคำนวณความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ โปรแกรม IBM SPSS Statistics 22 ที่ 95 % confidence interval โปรแกรมที่ใช้สร้างกราฟและคำนวณหาความสัมพันธ์ คือ โปรแกรม SigmaPlot 12.0 โปรแกรมที่ใช้ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของผลการตรวจทั้ง 2 วิธี คือ โปรแกรม MedCalc

- เปรียบเทียบความแตกต่างผลการตรวจระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีระหว่างบัฟเฟอร์ที่ผสม EDTA และไม่ผสมโดยใช้สถิติ Mann-Whitney U test
- ศึกษาผลกระทบของปริมาณเม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างเลือดครบส่วนต่อผลการตรวจด้วยอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ โดยใช้สถิติ one-way ANOVA test
- เปรียบเทียบความแตกต่างของผลการตรวจต่างๆในผู้ที่มีระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีแต่ละกลุ่มโดยใช้สถิติ one-way ANOVA test
- วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีกับระดับความเข้มข้นของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี โดยใช้สถิติ Pearson correlation coefficient
- ศึกษาความสัมพันธ์ของผลตรวจจากทั้ง 2 วิธี Passing-Bablok regression [128]
- ประเมินและเปรียบเทียบความต่างของผลการตรวจเชิงปริมาณวิเคราะห์ของทั้ง 2 วิธี โดยใช้สถิติ Bland Altman analysis ที่ 95 % confidence interval [129]
- ประเมินประสิทธิภาพของผลการตรวจเชิงคุณภาพวิเคราะห์ของทั้ง 2 วิธี โดยร้อยละ 30 และ 40 ของระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีปกติเป็นเกณฑ์ในการจำแนกผู้มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีและใช้สูตรคำนวณหา sensitivity, specificity, positive predictive value และ negative predictive value

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ลักษณะรูปแบบอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ



รูปที่ 38 อุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ: G6PD PAD

อุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ 1 ชุด ประกอบด้วย ตำแหน่งที่ใช้ผสมเลือดเพื่อสกัดเอนไซม์จีซิกพีดีก่อนหยดลงหลุมปฏิกิริยา (1) ตำแหน่งที่ใช้ในการระบุตัวตนของตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ (2) ตำแหน่งหลุมที่ไม่เกิดปฏิกิริยา (blank: 3) ใช้ในการหักลบค่าพื้นหลังของเลือด สาร 1-methoxyPMS และสีที่เกิดขึ้นเองจากการรีดิวซ์ของปฏิกิริยาอื่น ๆ ที่มีได้เกิดจากเอนไซม์จีซิกพีดีเพื่อความถูกต้องในการรายงานเชิงปริมาณวิเคราะห์ และตำแหน่งหลุมปฏิกิริยาที่ใช้อ่านผล (4)

ขนาดเส้น 1 pt. เป็นขนาดที่เหมาะสมในการสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ เนื่องจากมีปริมาณของ wax มากเพียงพอในการขัดขวางการแพร่ของสารน้ำในเนื้อกระดาษ

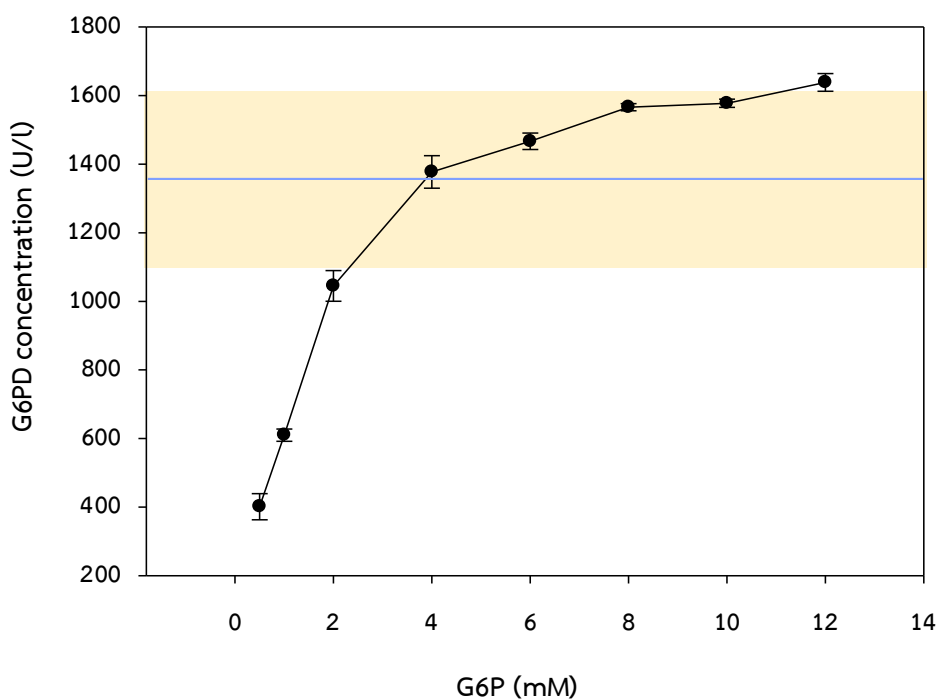
ขอบเส้นสีของหลุมปฏิกิริยา สามารถพิมพ์ได้หลายสีตามระบบเครื่องพิมพ์ CMYK แต่ในการสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษนี้เลือกใช้ชนิดสี Y หรือ yellow เนื่องจากเป็นขอบเส้นสีที่ไม่รบกวนการตรวจวัด เมื่อต้องการวัดปฏิกิริยา formazan ด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS6 ที่ช่องสี cyan เมื่อเทียบกับขอบเส้นสีดำที่เกิดจากการรวมแม่สีเข้าด้วยกัน หากทำการเลือกตำแหน่งได้ไม่เที่ยงตรง สีดำของขอบอาจรบกวนการวัดสีภายในหลุมปฏิกิริยาได้

ผลการทดสอบปริมาตรน้ำยาที่จะใช้ในการตรึงลงบนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.52 เซนติเมตร พบว่าสามารถรองรับน้ำได้ที่ 1 ไมโครลิตรพอดี และเป็น ปริมาตรที่เหมาะสมที่สุดในการปีเปิด

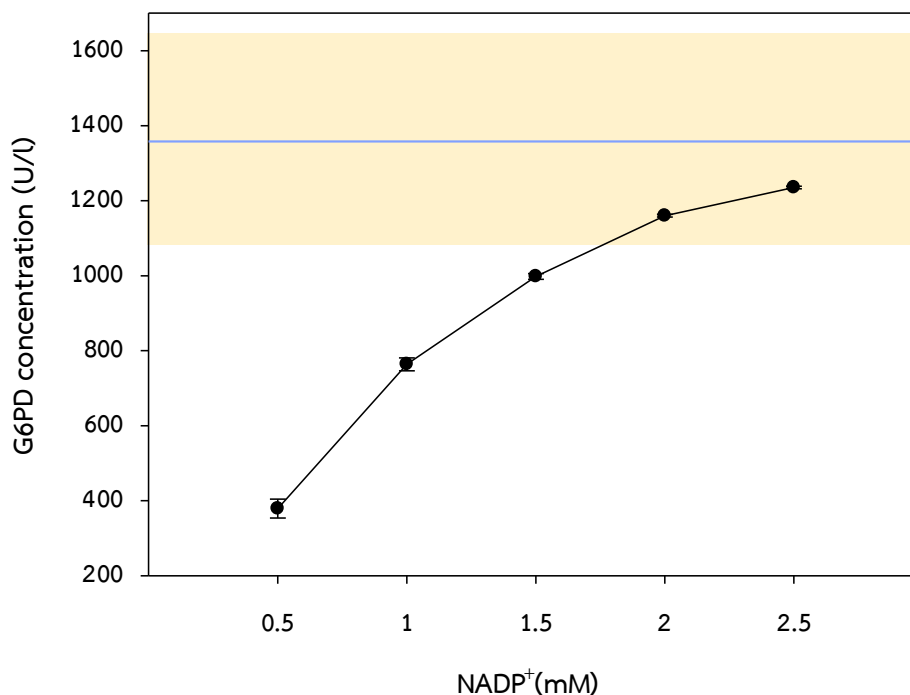
2. ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี ด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ

2.1 ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของน้ำยาในหลอดทดลอง

เมื่อชุดน้ำยาตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี PD410, Randox ถูกแทนที่ ด้วยน้ำยาที่ผลิตขึ้นเอง (G6P, NADP⁺, buffer) และทำการวัดค่าของเอนไซม์จีซิกพีดีตัวควบคุม (1359±271 U/L) เพื่อทดสอบหาความเข้มข้นและสภาวะกรดเบส (pH) ที่เหมาะสมที่สุดของ น้ำยาที่ผลิตขึ้นเองและจะนำไปใช้ในการตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีบนอุปกรณ์ ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษต่อไป โดยปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด ของ G6P และ NADP คือ ปริมาณความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้ค่าของเอนไซม์จีซิกพีดีตัว ควบคุมเข้าใกล้ค่ากลางของเอนไซม์จีซิกพีดีตัวควบคุม (1359 U/L) ดังรูปที่ 39 และรูปที่ 40



รูปที่ 39 ผลการตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีตัวควบคุมที่ระดับความเข้มข้น 0.5-12 mM G6P โดยช่วงของค่าตัวควบคุมแสดงอยู่ในแถบสีเหลือง (1,088-1,630 U/L) และ เส้นตัดแกน y สีฟ้าคือค่ากลาง (1359 U/L)

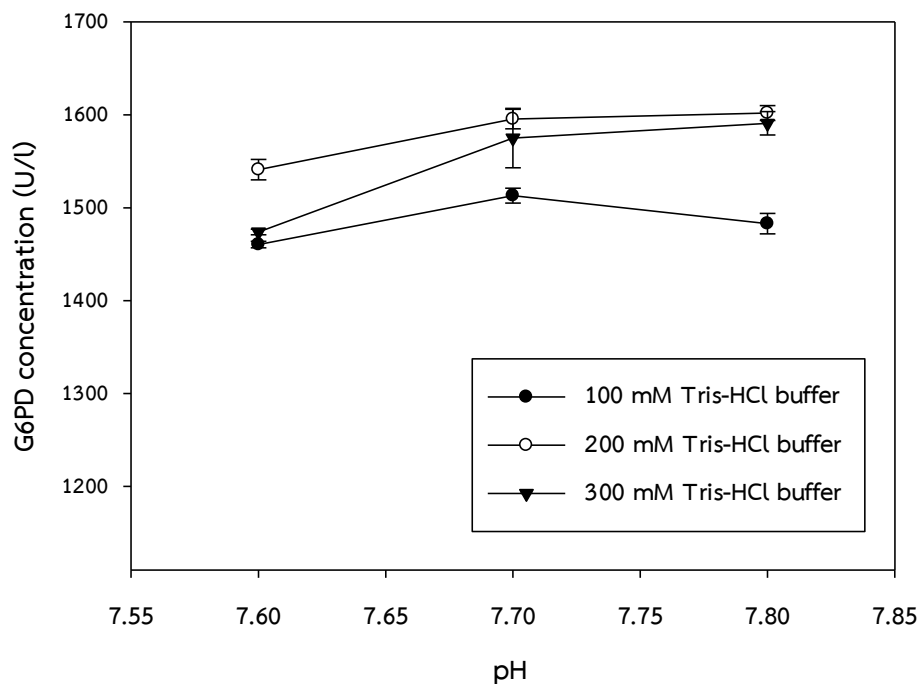


รูปที่ 40 ผลการตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีตัวควบคุมที่ระดับความเข้มข้น 0.5-2.5 mM NADP⁺ โดยช่วงของค่าตัวควบคุมแสดงอยู่ในแถบสีเหลือง (1,088-1,630 U/L) และเส้นตัดแกน y สีฟ้าคือค่ากลาง (1359 U/L)

จากผลการทดลองวัดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีตัวควบคุมในหลอดทดลอง ด้วยน้ำยาที่ผลิตขึ้นเอง จากเทคนิค spectrophotometry assay พบว่าปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของ G6P และ NADP⁺ คือ 4 mM และ 2.5 mM ตามลำดับ

ผลการทดสอบหาความเข้มข้นและสภาวะกรดเบส (pH) ที่เหมาะสมที่สุดของบัฟเฟอร์ (buffer) ในหลอดทดลอง พบว่า pH 7.7-7.8 เป็นสภาวะกรดเบส (pH) ที่เหมาะสม กล่าวคือ สามารถตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีได้มากกว่าที่ pH 7.6 และที่ระดับความเข้มข้น 200-300 mM ของ tris-HCl buffer ให้ค่าของระดับการทำงานของเอนไซม์ที่สูงและไม่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับ 100 mM ของ tris-HCl buffer ที่มีระดับการทำงานของเอนไซม์ต่ำทุกจุด ดังรูปที่ 41

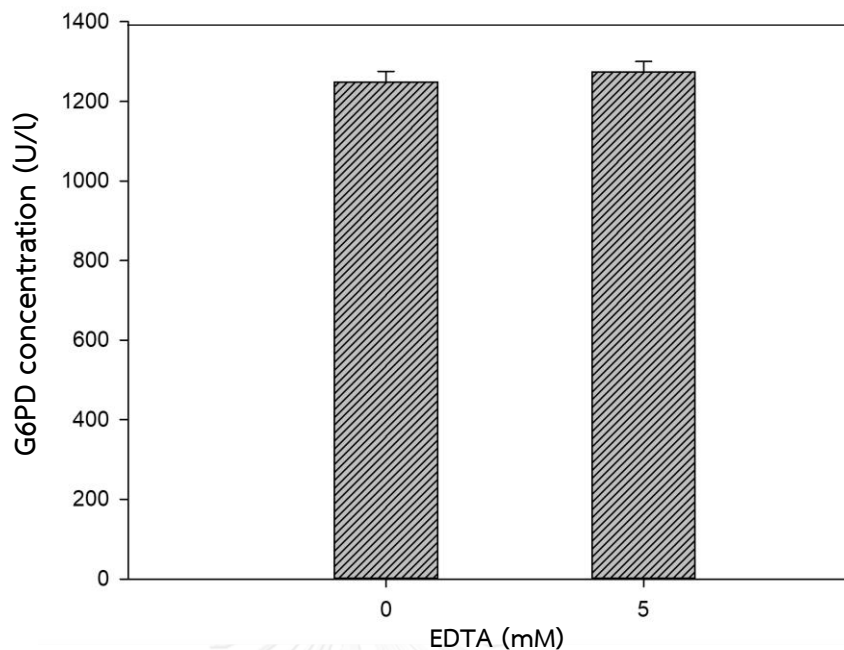
ดังนั้นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่เอนไซม์จีซิกพีดีทำงานได้มากที่สุด คือ 200 mM tris-HCl buffer และควรมีค่า pH 7.7-7.8



รูปที่ 41 ผลการตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีตัวควบคุมที่ระดับความเข้มข้น 100, 200 และ 300 mM tris-HCl buffer และมีช่วงของ pH ตั้งแต่ 7.6-7.8 โดย 100 mM tris- HCl buffer (●), 200 mM tris- HCl buffer (○) และ 300 mM tris- HCl buffer (▼)

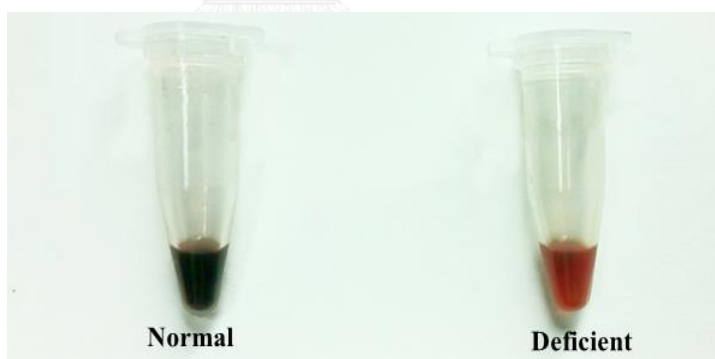
2.1.1 ผลการทดลองเติม 5 mM EDTA ลงใน tris-HCl buffer

5 mM EDTA ทำหน้าที่ช่วยรักษาสภาพของเอนไซม์ [114] ซึ่ง 5 mM เป็นระดับความเข้มข้นที่ได้จากการสืบค้นส่วนผสมของน้ำยาตรวจระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีที่มีตามท้องตลาดและใช้กันอยู่ในปัจจุบัน เพื่อศึกษาผลกระทบของ 5 mM EDTA เมื่อเติมลงใน tris-HCl buffer ต่อหลักการตรวจระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี จึงทำการทดสอบวัดตัวควบคุม (control normal: PD 2618, Randox, IMED Thailand) ด้วยเทคนิค spectrophotometric assay เปรียบเทียบผลที่ได้ของ tris-HCl buffer ที่มีการเติม 5 mM EDTA และที่ไม่มีการเติม ซึ่งพบว่า tris-HCl buffer ที่มีการเติม 5 mM EDTA และที่ไม่มีการเติม ให้ผลระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีไม่แตกต่างกัน ($p=0.700$, Mann-Whitney U test) ดังรูปที่ 42



รูปที่ 42 ผลการตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีตัวควบคุม เมื่อทำการทดลองเติม 5 mM EDTA ลงใน tris-HCl buffer เปรียบเทียบกับไม่ได้เติม (0 mM EDTA)

2.1.2 ผลการทดลองวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีเบื้องต้นในหลอดทดลอง



รูปที่ 43 ผลการทดลองวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีเบื้องต้นในหลอดทดลองคนปกติ (normal: ด้านซ้าย) ผู้มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี (deficient: ด้านขวา)

จากการทดสอบหลักการ cytochemical staining (รูปที่ 31) ที่จะใช้ในการผลิตอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษจากน้ำยาที่ผลิตขึ้นเองในหลอดทดลองพบว่าหลักการสามารถใช้ในการวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีได้ดังรูปที่ 43 โดยผู้ที่มีระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีปกติจะปรากฏเห็นสีดำนม่วงของ formazan จาก

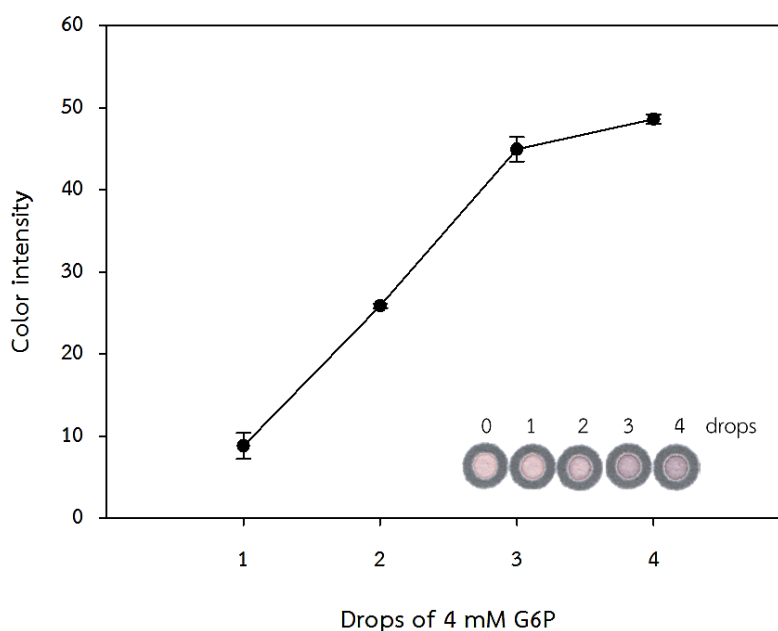
ความสามารถในการรีดิวซ์ของ NADPH ที่ผลิตขึ้นได้ ต่างจากกลุ่มผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี ที่จะยังคงปรากฏสีแดงของเลือดอยู่

2.2 ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของน้ำยาบนกระดาษ

นำผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของน้ำยาในหลอดทดลองสำหรับการตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี มาประยุกต์ใช้บนกระดาษเพื่อผลิตเป็นอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ โดยทำการทดสอบหาจำนวนหยดในการตรึงและความเข้มข้นของน้ำยา รวมถึงสารอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาที่ยังมิได้ทำการทดสอบในหลอดทดลอง (TNBT, 1-methoxyPMS)

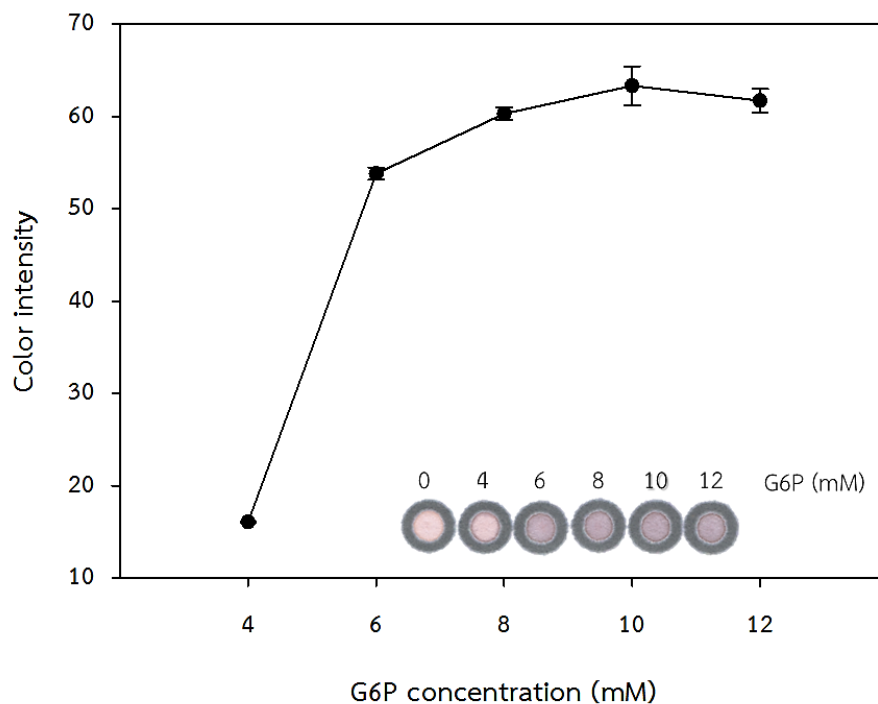
2.2.1 ผลการทดสอบหาจำนวนหยดที่เหมาะสมของ G6P ในการตรึง

เมื่อทำการทดสอบหาจำนวนหยดที่เหมาะสมของน้ำยา 4 mM G6P ในการตรึงลงบนหลุมปฏิกิริยาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.52 ซม. ที่ 0 ถึง 4 หยด ดังรูปที่ 44 ผลปรากฏว่า 4 mM G6P ที่ให้ความเข้มข้นที่เหมาะสมในหลอดทดลอง (ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เอนไซม์จีซิกพีดีตัวควบคุมในหลอดทดลองมีค่าเข้าใกล้ค่ากลางมากที่สุด) กลับต้องใช้ปริมาณหยดมากถึง 3 หยด (1 หยด: 1 μ l) จึงจะได้ค่าระดับความเข้มสีที่เด่นชัดและคงที่



รูปที่ 44 ผลการทดสอบหาจำนวนหยดที่เหมาะสมของ 4 mM G6P ในการตรึงลงบนกระดาษ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนหยดกับระดับความเข้มสีที่ปรากฏบนกระดาษ

ดังนั้นจึงทำการทดสอบเพิ่มเติม โดยการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของ G6P ให้ถึงระดับ 12 mM เพื่อลดระยะเวลาในการผลิต จากการที่ต้องตั้ง 4 mM G6P ถึง 3 หยด

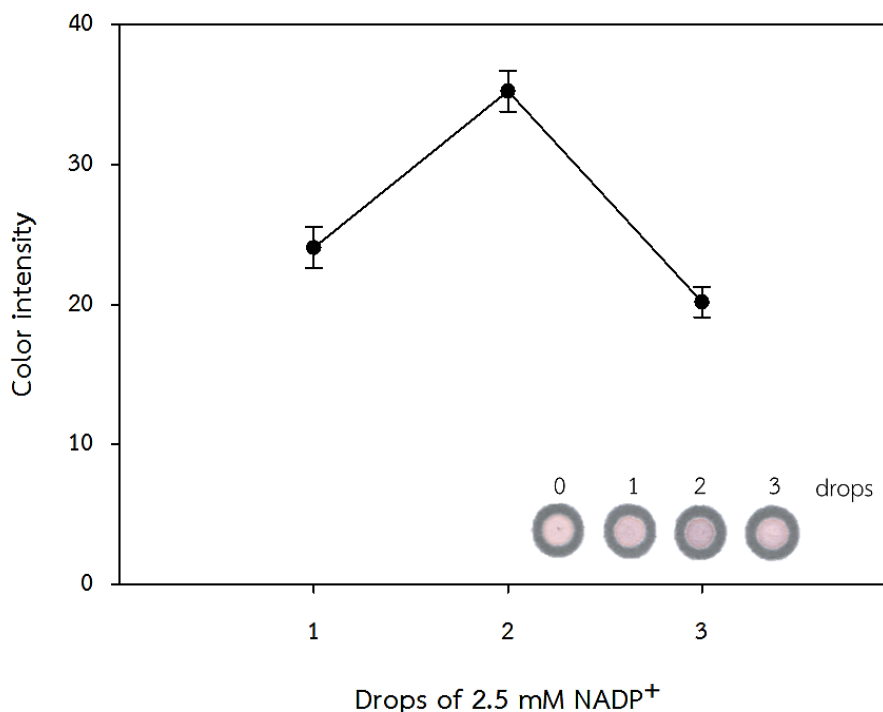


รูปที่ 45 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ G6P ในการตรึงลงบนกระดาษ เมื่อเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ G6P กับระดับความเข้มสีที่ปรากฏบนกระดาษ

ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ G6P ในการตรึงลงบนกระดาษ พบว่าระดับความเข้มสีที่ปรากฏบนกระดาษเริ่มเป็นเส้นตรงคงที่เมื่อ G6P มีความเข้มข้นตั้งแต่ 8 mM เป็นต้นไปแต่เพื่อเป็นการป้องกันการตรึงที่ผิดพลาด อันเนื่องมาจากความคลาดเคลื่อนในการปิเปตสาร (ปริมาตร) ทางผู้วิจัยจึงตัดสินใจใช้ความเข้มข้นที่ 10 mM G6P ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่มากเกินไปในการเกิดปฏิกิริยา

2.2.2 ผลการทดสอบหาจำนวนหยดที่เหมาะสมของ NADP^+ ในการตรึง

นำผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ G6P ในการตรึงลงบนหลุมปฏิกิริยาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.52 ซม มาใช้ในการทดสอบหาจำนวนหยดที่เหมาะสมของ 2.5 mM NADP^+ ในการตรึงลงบนหลุมปฏิกิริยาในลำดับต่อไป



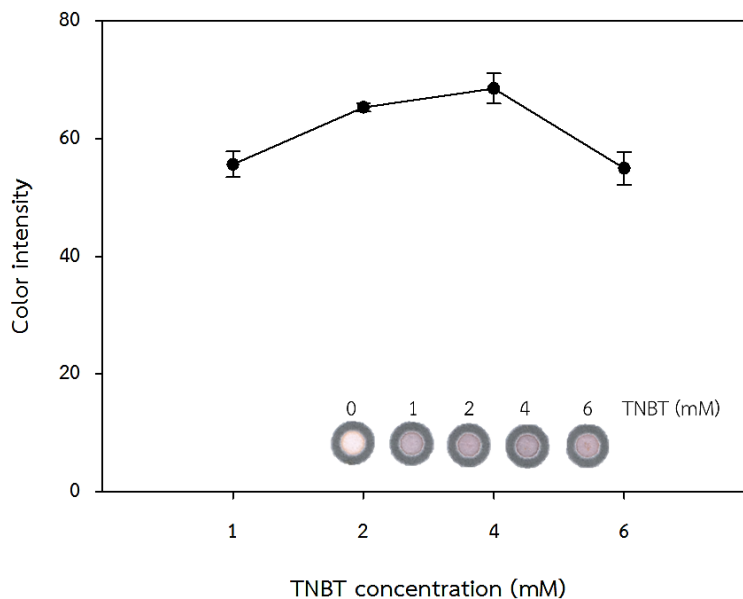
รูปที่ 46 ผลการทดสอบหาจำนวนหยดที่เหมาะสมของ 2.5 mM NADP⁺ ในการตรึงลงบนกระดาษ เมื่อทำการเปรียบเทียบจำนวนหยดกับระดับความเข้มสีที่ปรากฏบนกระดาษ

ผลการทดสอบหาจำนวนหยดที่เหมาะสมของ 2.5 mM NADP⁺ ในการตรึงลงบนกระดาษ คือ 2 หยด ซึ่งปรากฏระดับความเข้มสีที่เด่นชัดสุดบนกระดาษ

2.2.3 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TNBT ในการตรึง

นำผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ G6P และผลการทดลองหาจำนวนหยดที่เหมาะสมของ 2.5 mM NADP⁺ ในการตรึงลงบนหลุมปฏิกิริยาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.52 ซม. มาใช้ในการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TNBT (0, 1, 2, 4, 6 mM) ในการตรึงลงบนหลุมปฏิกิริยาในลำดับต่อไปนี้ดังรูปที่ 47

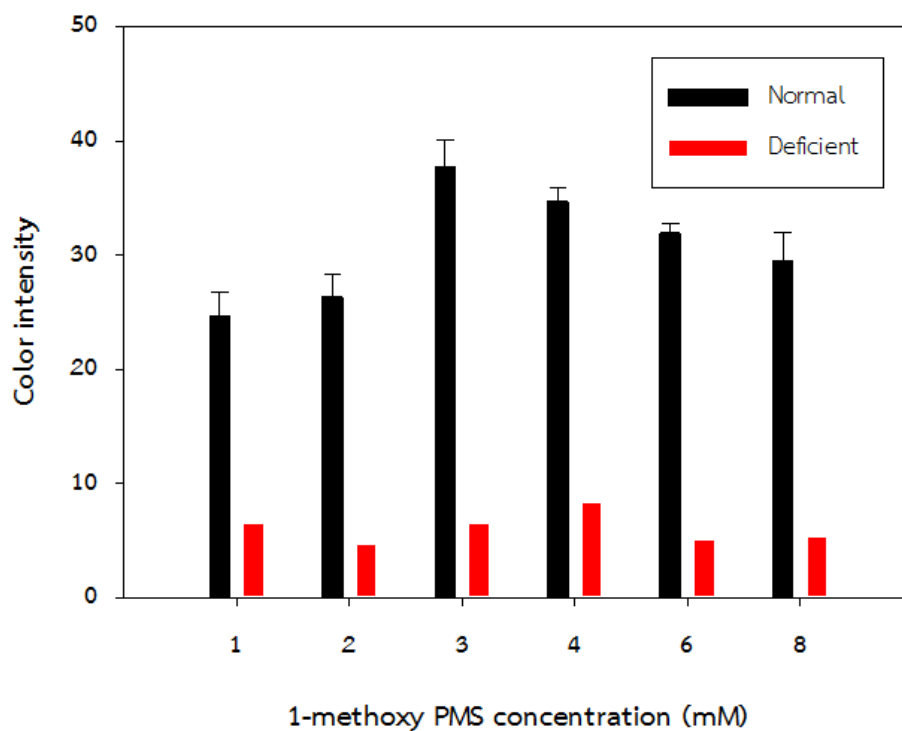
ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TNBT ในการตรึงลงบนกระดาษ คือ 4 mM ซึ่งปรากฏระดับความเข้มสีที่เด่นชัดสุดบนกระดาษ



รูปที่ 47 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TNBT ในการตรึงลงบนกระดาษ เมื่อทำการเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ TNBT กับระดับความเข้มสีที่ปรากฏบนกระดาษ

2.2.4 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1-methoxyPMS

1-methoxyPMS ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีสีชมพู การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมนี้ คือการทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถเร่งปฏิกิริยาให้ความเข้มสีเด่นชัดที่สุด และรบกวนการตรวจวัดความเข้มสีบนกระดาษน้อยที่สุด เนื่องจากการตรึง 1-methoxyPMS ลงบนหลุมปฏิกิริยาตำแหน่งเดียวกับ TNBT อาจให้ผลบปปลอมได้ จึงทำการผสม 1-methoxyPMS ลงในน้ำยาที่ใช้ตรวจก่อนหยดลงหลุมปฏิกิริยา โดยทำการทดสอบกับตัวอย่างเลือดคนปกติและตัวอย่างเลือดผู้มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี ผลการทดลองดังรูปที่ 48



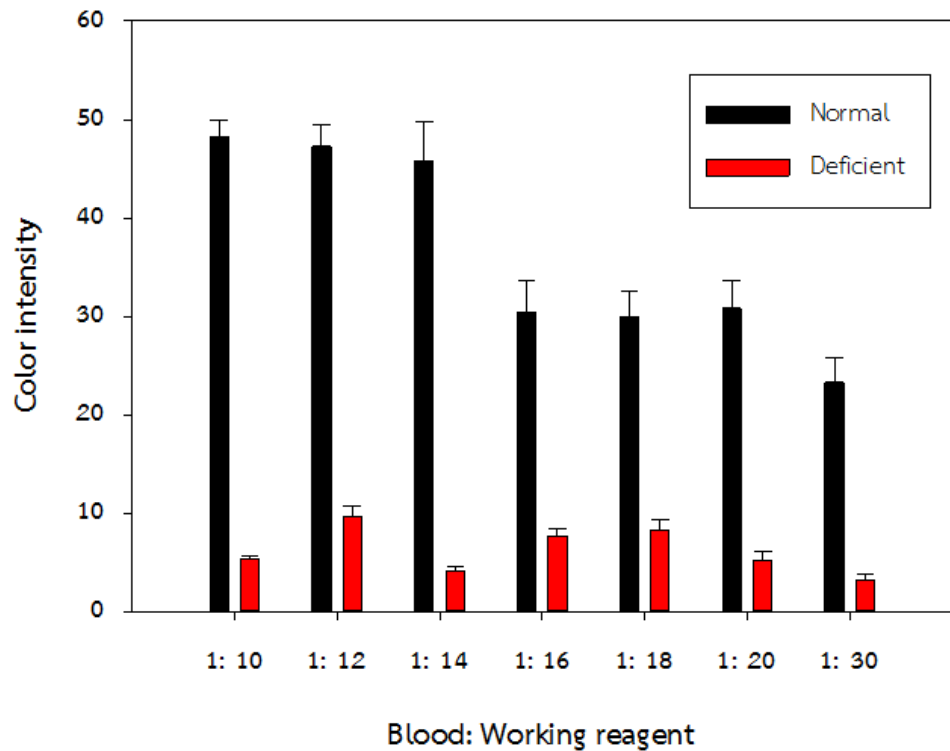
รูปที่ 48 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1-methoxyPMS โดยทำการเปรียบเทียบระดับความเข้มสีกับระดับความเข้มสีต่างๆของ 1-methoxyPMS ในกลุ่มคนปกติ (สีดำ) และกลุ่มผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี (สีแดง)

ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1-methoxyPMS พบว่าที่ 3 mM 1-methoxyPMS ให้ระดับความเข้มสีที่เป็นอัตราส่วนระหว่างกลุ่มคนปกติกับผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีมากที่สุด

2.3 ผลการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมในการตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี

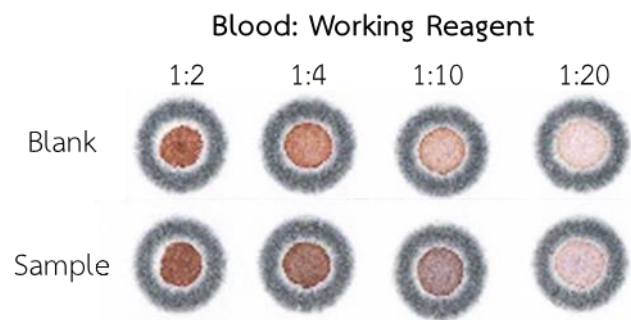
2.3.1 ผลการทดสอบหาอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างเลือดกับน้ำยาที่ใช้ตรวจ

เมื่อกำหนดค่าคงที่ของปริมาตรตัวอย่างเลือดที่จะใช้ในการตรวจบนอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษที่ 5 μl แล้ว มีความจำเป็นต้องทราบถึงปริมาตรน้ำยาที่จะนำมาใช้ในการสกัดเอนไซม์จีซิกพีดีก่อนหยดลงอุปกรณ์ตรวจ โดยทำการผสมตัวอย่างเลือดปริมาตร 5 μl กับน้ำยาตรวจปริมาตรตั้งแต่ 50 ถึง 150 μl หรืออัตราส่วนระหว่าง 1: 10 ถึง 1: 30



รูปที่ 49 ผลการทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างตัวอย่างเลือดกับน้ำยาที่ใช้ในการตรวจ โดยทำการเปรียบเทียบระดับความเข้มสีกับอัตราส่วนต่างๆระหว่างตัวอย่างเลือดกับน้ำยาที่ใช้ในการตรวจ ในกลุ่มคนปกติ (สีดำ) และกลุ่มผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี (สีแดง)

ผลการทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างตัวอย่างเลือดกับน้ำยาที่ใช้ในการตรวจ คือ 1: 10 หรือ เลือดครบส่วนปริมาตร 5 μ l กับน้ำยาตรวจ 50 μ l

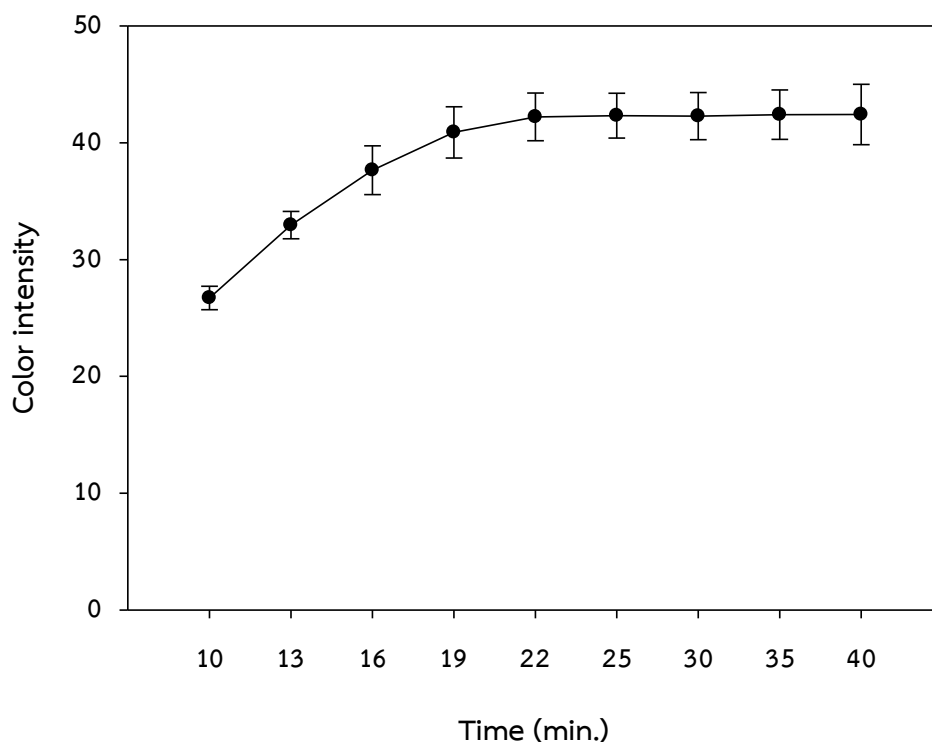


รูปที่ 50 ผลการทดสอบลดอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างเลือดกับน้ำยาที่ใช้ในการตรวจ

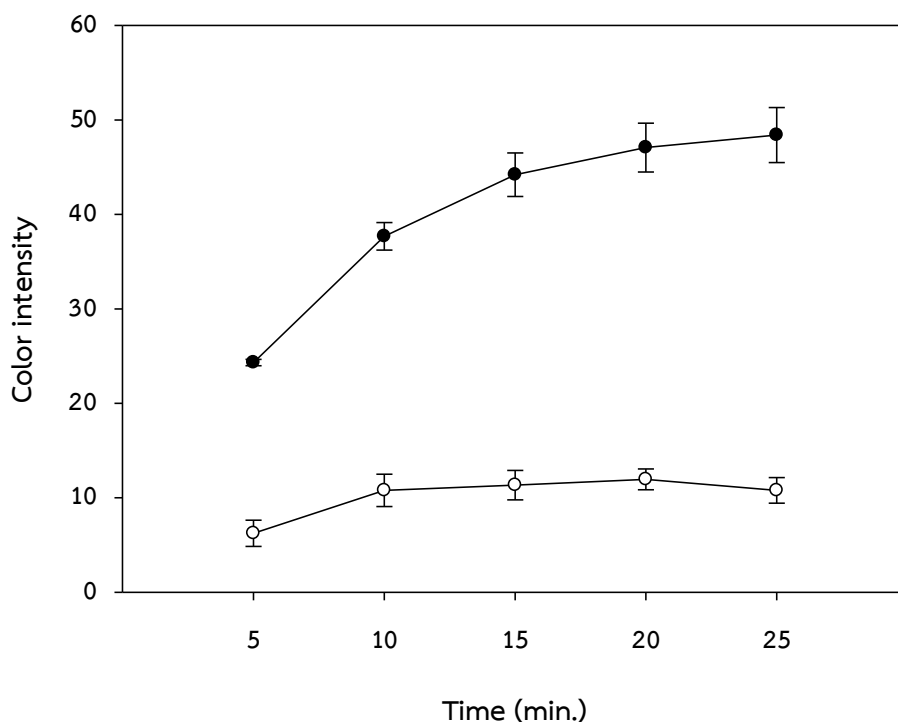
ผู้วิจัยได้ทดสอบลดอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างเลือดกับน้ำยาที่ใช้ในการตรวจลงจน (<1: 10) พบว่าอัตราส่วนที่ลดลงยิ่งทำให้มีสีพื้นหลังของหลุม blank มีค่าสูงขึ้น และมีความหนืดของสารไหลเพิ่มขึ้น ทำให้ไหลได้ไม่เต็มวง จากการที่มีค่าพื้นหลังที่สูงขึ้นจึงเป็นการยากในการอ่านผล ผู้วิจัยจึงเลือกอัตราส่วน 1: 10 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมดั้งเดิม

2.3.2 ผลการทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรวจวินิจฉัย

ผลการทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรวจวินิจฉัยด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ พบว่าที่ 20 ถึง 25 นาทีระดับความเข้มสีจะเริ่มคงที่ในตัวอย่างเลือดคนปกติ ดังนั้นระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีคือ 25 นาที ดังรูปที่ 51 และ 52



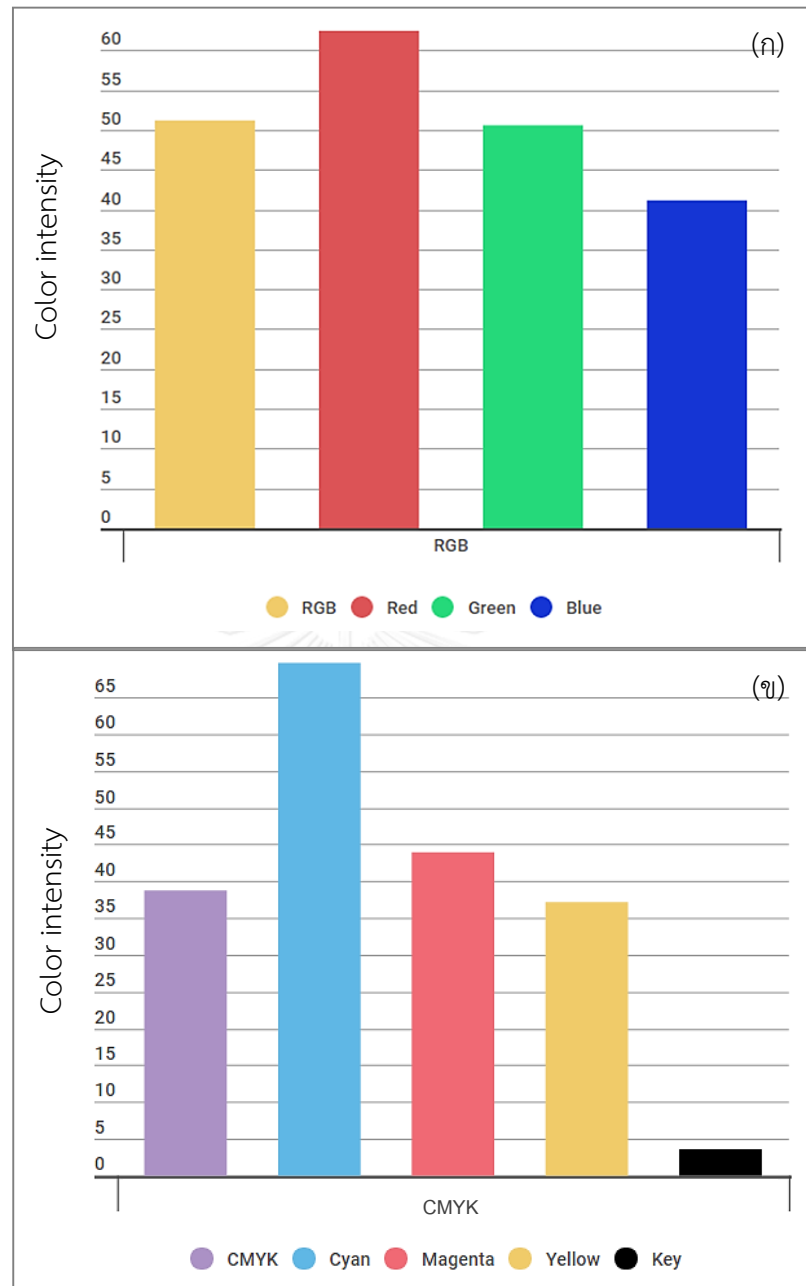
รูปที่ 51 ผลการทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรวจวินิจฉัยด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ เมื่อเปรียบเทียบระดับความเข้มสีกับระยะเวลา (นาที) 10 ถึง 40 นาที



รูปที่ 52 ผลการทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรวจวินิจฉัยด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ เมื่อเปรียบเทียบระดับความเข้มสีในกลุ่มคนปกติ (●) และผู้มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี (○) กับระยะเวลา (นาที) 5 ถึง 25 นาที

2.3.3 ผลการทดสอบหาระบบสีที่เหมาะสมในการรายงานผล

ในการตรวจวัดผลระดับความเข้มสีของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS6 สามารถตรวจวัดได้หลากหลายช่องสี อาทิ red, green, blue, RGB, cyan, magenta, yellow, key, CMYK เป็นต้น เพื่อทดสอบหาช่องสีและระบบสีที่เหมาะสมที่สุดในการรายงานผล กล่าวคือให้ช่วงสีที่กว้างที่สุดและสัมพันธ์กับปฏิกิริยาที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า



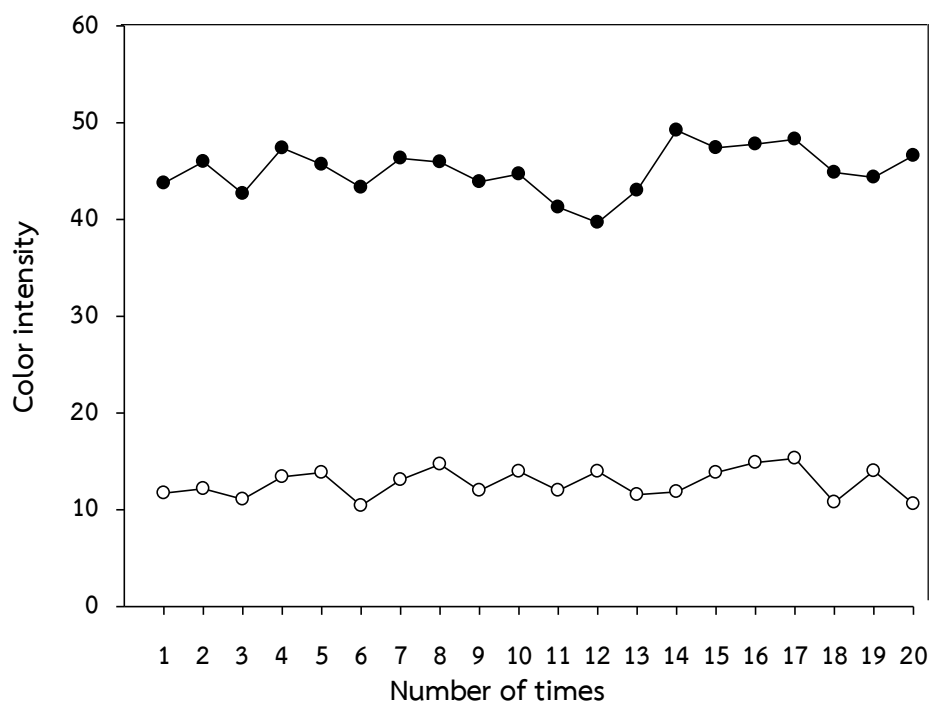
รูปที่ 53 ผลการเปรียบเทียบระดับความเข้มสีของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีคซิกพีดี
ฐานกระดาษ 1 ตัวอย่างในระบบสี RGB (ก) และระบบสี CMYK (ข)

ผลการทดสอบหาระบบสีที่เหมาะสมในการรายงานผล พบว่าในตัวอย่างเดียวกัน ระบบสี CMYK ช่องสี cyan ให้ค่าของระดับความเข้มสีในช่วงที่กว้างที่สุด (69.64) และมีความจำเพาะที่สุดกับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

3. ผลการศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ

3.1 ผลการทดสอบความแม่นยำของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ

ผลการทดสอบความแม่นยำของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ 20 ครั้ง (within run) พบว่ามีร้อยละของค่าสัมประสิทธิ์การแปรผัน (% CV) เท่ากับ 5.39 และ 11.91 ในกลุ่มผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี และผู้ที่ไม่ใช่ภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี ตามลำดับ ดังตารางที่ 14



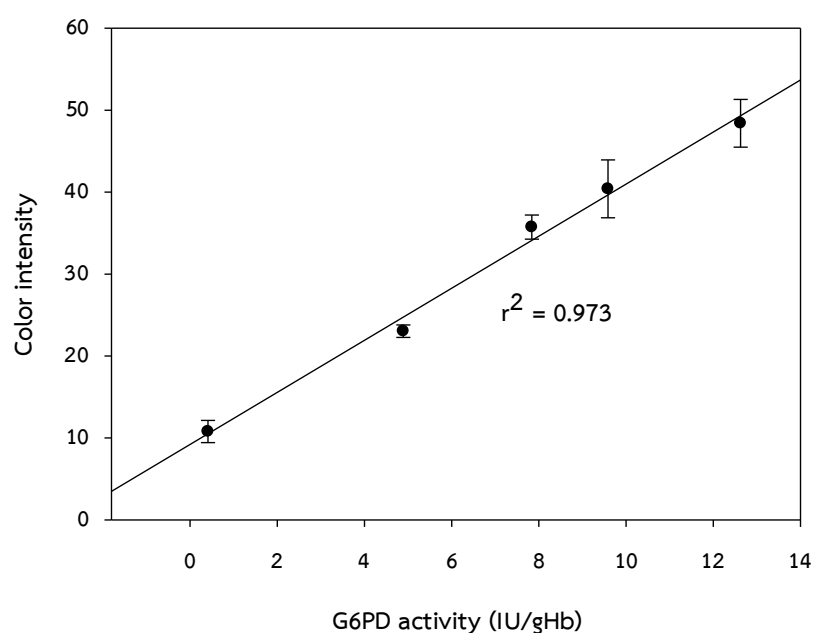
รูปที่ 54 กราฟผลการทดสอบความแม่นยำของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ ในผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี (○) และผู้ที่ไม่ใช่ภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี (●) จำนวน 20 ครั้ง

ตารางที่ 14 ผลการทดสอบความแม่นยำของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ

ค่าทางสถิติ	ผู้ที่ไม่มีความพร่องเอนไซม์	ผู้ที่มีความพร่องเอนไซม์
	จีซิกพีดี	ซิกพีดี
ค่าเฉลี่ย	45.11	12.76
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	2.43	1.52
ร้อยละของสัมประสิทธิ์ของการแปรผัน	5.39	11.91

3.2 ผลการสร้างกราฟมาตรฐานในการแปลผลของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ

อุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษมีความสามารถในการแปลผลในช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน 0.46-13.5 IU/gHb ($r^2 = 0.973$) และได้สมการในการแปลผลระดับความเข้มสีเป็นระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีจากการตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยอุปกรณ์ฐานกระดาษ คือ ระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี = $0.306 \times (\text{ระดับความเข้มสี}) - 2.631$ เมื่อทำการตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีแล้วพบว่าระดับความเข้มสีที่ได้ของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษมีค่ามากกว่า 50 ควรทำการเจาะจางตัวอย่างเลือดก่อนตรวจ เนื่องจากถึงจุดอิ่มตัวของสีบนกระดาษ



รูปที่ 55 กราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวินิจฉัยด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ $y = (3.177x) + 9.207$

3.3 ผลการทดสอบหาขีดจำกัด หรือ limit of detection (LOD) ในการตรวจของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีฐานกระดาษ

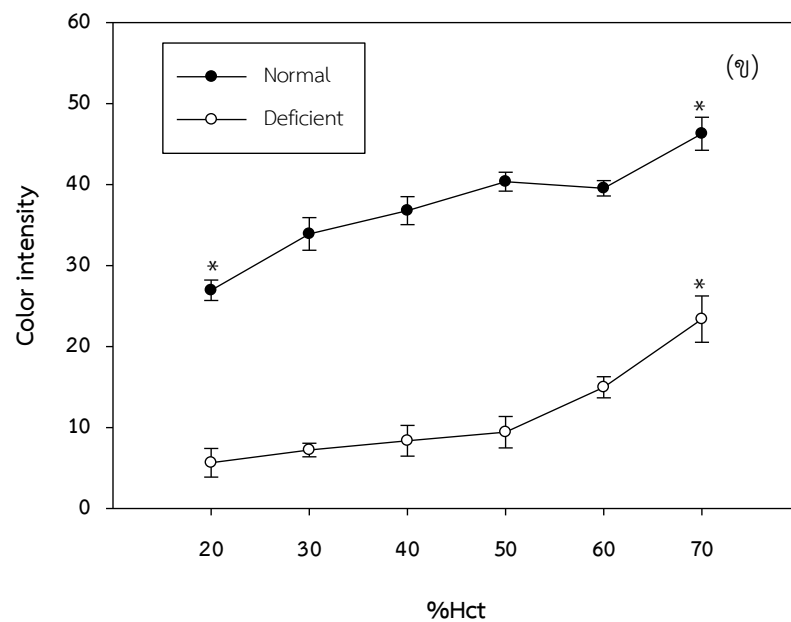
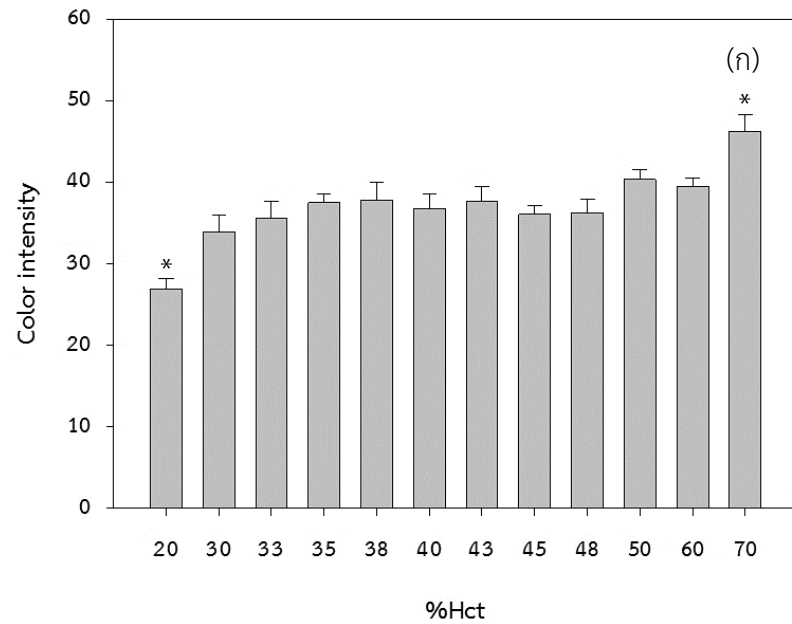
ทำการทดสอบหาขีดจำกัดในการตรวจที่น้อยที่สุดที่จะสามารถตรวจวัดได้ด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีฐานกระดาษ (limit of detection) จากการวัดความเข้มสีที่หลุมไม่เกิดปฏิกิริยา (blank) 10 ครั้ง ผลการทดสอบหาขีดจำกัดในการตรวจของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีฐานกระดาษเท่ากับ 0.381 IU/gHb ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ผลการทดสอบหาขีดจำกัดในการตรวจของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีฐานกระดาษ

ค่าทางสถิติ	ระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีตี
SD	0.37
3SD	1.21
Slope	3.17
LOD	0.381

3.4 ผลการทดสอบการรบกวนจากปริมาณเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างเลือดครบส่วน

เนื่องจากเอนไซม์จีซิกพีตีอยู่ในเม็ดเลือดแดง จึงทำการศึกษาผลกระทบของปริมาณเม็ดเลือดแดงตั้งต้นในตัวอย่างเลือดครบส่วนต่อผลการตรวจด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีฐานกระดาษ โดยการนำตัวอย่างเลือดของคนปกติและผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตี มาปรับปริมาณฮีมาโตคิต 20-70 และทดสอบกับอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีฐานกระดาษ ผลการทดสอบพบว่า ในกลุ่มคนปกติอาจให้ผลปลอมหรือได้ค่าต่ำกว่าปกติหากมีระดับฮีมาโตคิตต่ำกว่า 30 % และให้ค่าสูงกว่าปกติเมื่อมีระดับฮีมาโตคิตมากกว่า 60 % ในกลุ่มผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีที่ระดับฮีมาโตคิตมากกว่า 60 % ส่งผลให้อ่านค่าผิดเป็นคนปกติได้ (ผลบวกปลอม)

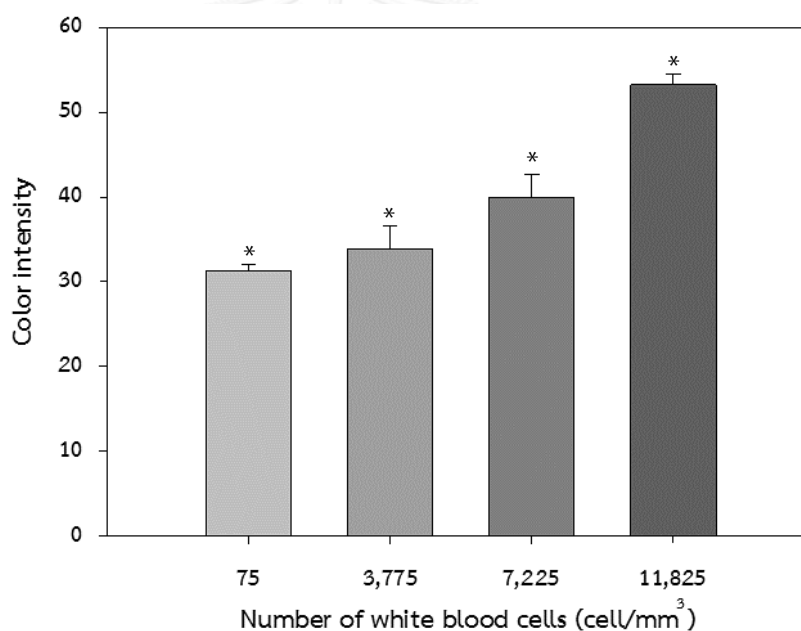


รูปที่ 56 ผลการทดสอบการรบกวนจากปริมาณเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างเลือดครบส่วนต่อระดับความเข้มสีของผลการตรวจด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษที่ 20-70 %Hct (ก) กราฟขยายผลการทดสอบการรบกวนจากปริมาณเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างเลือดครบส่วนต่อระดับความเข้มสีของผลการตรวจด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ กับกลุ่มคนปกติ (●) และผู้มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี (○) (ข)

3.5 ผลการทดสอบการรบกวนจากปริมาณเม็ดเลือดขาวในตัวอย่างเลือดครบส่วน

ผลการศึกษาผลกระทบของเม็ดเลือดขาวในตัวอย่างเลือดครบส่วนต่อผลการตรวจด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาศ อันเนื่องมาจากเอนไซม์จีซิกพีดีมีอยู่ในเม็ดเลือดขาวด้วย โดยนำตัวอย่างเลือดที่มีปริมาณเม็ดเลือดขาวแตกต่างกัน 4 ระดับ ทดสอบกับอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาศ

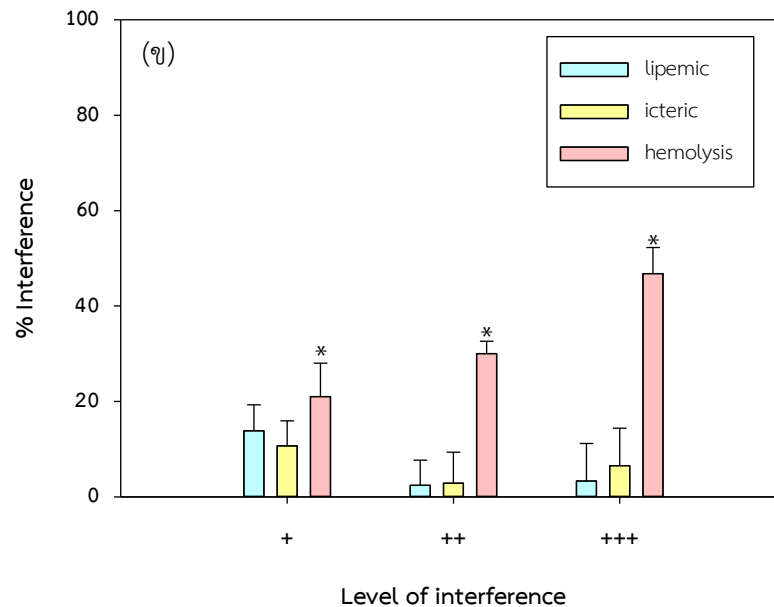
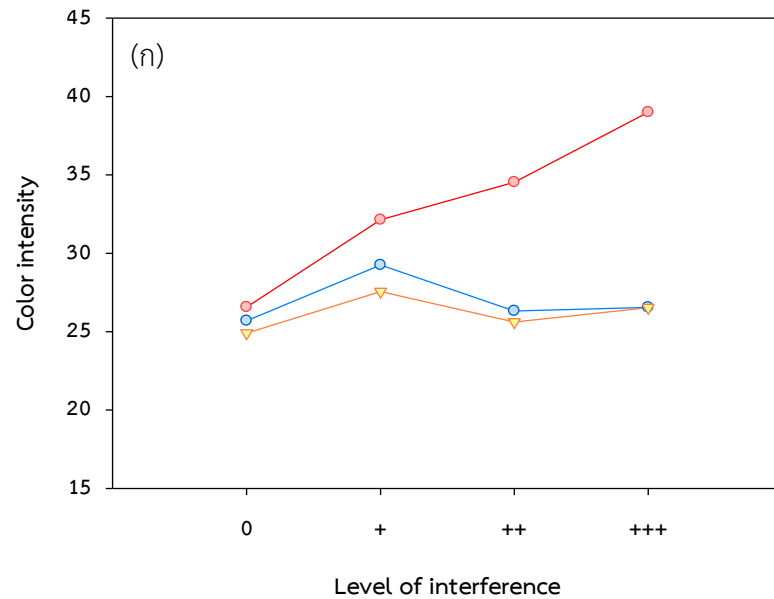
ผลการปรับเม็ดเลือดขาวใน 1 ตัวอย่างให้ได้ 4 ระดับและทำการนับจำนวนเม็ดเลือดขาวด้วยน้ำยา Turk's solution ได้จำนวน 75, 3,775, 7,225, 11,825 cell/mm³ ตามลำดับ โดยแต่ละระดับเป็นตัวแทนของตัวอย่างเลือดที่มีปริมาณเม็ดเลือดขาวต่ำมาก ต่ำ ปกติ และสูง ซึ่งพบว่าปริมาณเม็ดเลือดขาวที่ระดับต่างๆ มีผลต่อผลการตรวจด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาศ ดังรูปที่ 57



รูปที่ 57 ผลการศึกษาผลกระทบของเม็ดเลือดขาวในตัวอย่างเลือดครบส่วนต่อผลการตรวจด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาศ โดยทำการเปรียบเทียบระดับความเข้มสีที่ปริมาณเม็ดเลือดขาวแตกต่างกันสี่ระดับ

3.6 ผลการทดสอบสารรบกวนบนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ

ผลการศึกษาการรบกวนของสารต่างๆในน้ำเลือดที่อาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของพร่องเอนไซม์จิกพีดีด้วยอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ โดยทำการศึกษาในสารทั่วไปที่มักจะส่งผลกระทบต่อตรวจทางห้องปฏิบัติการ



รูปที่ 58 กราฟผลการทดสอบสารรบกวนบนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ โดยเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นกับระดับการรบกวนของ hemolysis (สีแดง) lipemic (สีฟ้า) และ icteric (สีเหลือง) (ก) กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การรบกวนบนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษที่ระดับการรบกวนต่างๆ(ข)

ผลการทดสอบพบว่า ตัวอย่างเลือดครบส่วนที่มีไขมันหรือบิลิรูบินในปริมาณสูงไม่รบกวนต่อผลการตรวจ แต่จะรบกวนผลการตรวจก็ต่อเมื่อมีการแตกของเม็ดเลือดในตัวอย่างเลือดครบส่วน (hemolysis) ตั้งแต่ระดับ + ถึง +++ ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ผลการทดสอบสารรบกวนบนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ

ระดับ	Lipemic		Icteric		Hemolysis	
	Triglyceride (mg/dl)	Interference %	Bilirubin (μ M)	Interference %	Hemoglobin (g/dl)	Interference %
0	~60	-	~0	-	~0	-
+	~400	14	~100	10	~1.5	21
++	~1000	2	~250	3	~3	30
+++	~2000	3	~500	7	~6	47

4. ผลการทดสอบตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธีที่ใช้อยู่ปัจจุบันและวิธีมาตรฐาน

4.1 คุณลักษณะกลุ่มตัวอย่าง

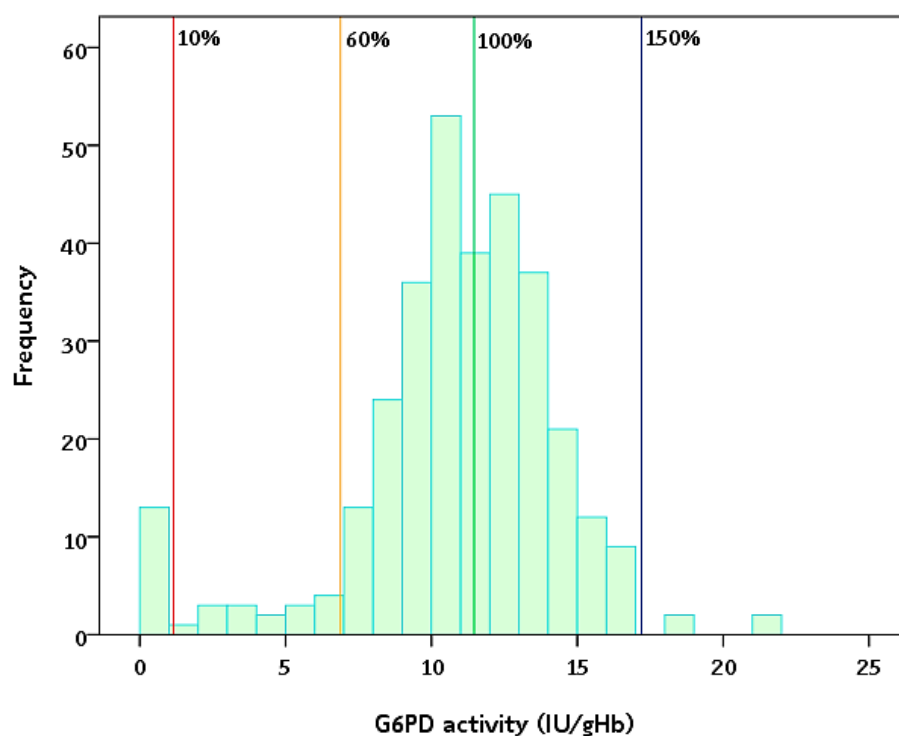
กลุ่มตัวอย่างจากภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลศิริราช จำนวน 322 คน อายุเฉลี่ยประมาณ 35 ± 12 ปี แบ่งเป็นเพศหญิงจำนวน 165 คน และเพศชายจำนวน 157 คน เป็นผู้มีสุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์ โดยพบผู้ที่มีภาวะความผิดปกติของฮีโมโกลบิน ชนิดอี และโรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย (thalassemia) จำนวน 72 คน ผลการตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดกลุ่มตัวอย่างจำนวน 322 คน จากภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด ดังตารางที่ 17

กลุ่มตัวอย่างจากภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลศิริราช จำนวน 322 คน จะได้รับการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี และนำมาประเมินประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ

ตารางที่ 17 ผลการตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดกลุ่มตัวอย่างจากศูนย์บริการโลหิต ภาควิชา
เวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลศิริราช จำนวน 322 คน

รายการ	ผลการตรวจ	ค่าปกติ	
จำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC count)	7.39 ± 1.62	5.00 - 10.00	×10 ³ /mm ³
จำนวนเกล็ดเลือด (Plt. count)	263.03 ± 58.38	150 - 450	×10 ³ /mm ³
จำนวนเม็ดเลือดแดง (RBC count)			
ผู้ชาย	5.29 ± 0.53	4.50 - 6.00	×10 ⁶ /mm ³
ผู้หญิง	4.72 ± 0.39	4.00 - 5.50	×10 ⁶ /mm ³
ฮีมาโตคริต (Hct)			
ผู้ชาย	44.10 ± 3.24	43.5 - 53.7	%
ผู้หญิง	40.17 ± 2.32	37.7 - 48.0	%
ฮีโมโกลบิน (Hb)			
ผู้ชาย	14.57 ± 1.13	14.1 - 18.1	g/dl
ผู้หญิง	13.12 ± 0.79	12.2 - 16.2	g/dl
MCV	84.67 ± 6.71	80.0 - 95.0	fL
MCH	27.83 ± 2.42	27.0 - 32.0	pg
MCHC	32.85 ± 0.92	32.0 - 36.0	g/dl
RDW	13.98 ± 1.14	9.0 - 15.0	%

กลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 322 คน ที่นำมาประเมินประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษมีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีทั้งหมด 15 คน จากการตรวจด้วยวิธีตรวจคัดกรอง Fluorescent spot test, ตรวจพบการกลายพันธุ์บนยีนจีซิกพีดีจำนวน 41 คนหรือ 12.73 % โดยแบ่งออกเป็น เวียงจันทน์ (Viangchan) จำนวน 17 คนหรือ 5.3 %, แคนตอน (Canton) จำนวน 5 คนหรือ 1.6 %, ไคปิง (Kaiping) จำนวน 4 คนหรือ 1.2 %, มหิดล (Mahidol) จำนวน 4 คนหรือ 1.2 %, ยูเนียน (Union) จำนวน 3 คนหรือ 0.9 %, และอื่นๆ จำนวน 8 คนหรือ 2.5 % ซึ่งมีระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีที่ 100 % ของกลุ่มตัวอย่างเท่ากับ 11.46 IU/gHb เส้นสีเขียวดังรูปที่ 59



รูปที่ 59 ผลการประเมินระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีกลุ่มตัวอย่าง (n=322) ระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีที่ 10 %, 60 %, 100 %, และ 150 % ของกลุ่มตัวอย่าง (เส้นสีแดง, ส้ม, เขียว และน้ำเงิน)

จากผลการประเมินระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีกลุ่มตัวอย่าง สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ตามหลักเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก World Health Organization (WHO) ดังนี้

- 1) ผู้ที่มีระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีปกติ (6.88-17.20 IU/gHb) จำนวน 290 คน
- 2) ผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีปานกลาง (1.15-6.88 IU/gHb) จำนวน 14 คน
- 3) ผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีรุนแรง (<1.15 IU/gHb) จำนวน 14 คน

ตารางที่ 18 ผลการจำแนกกลุ่มตัวอย่างตามระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี

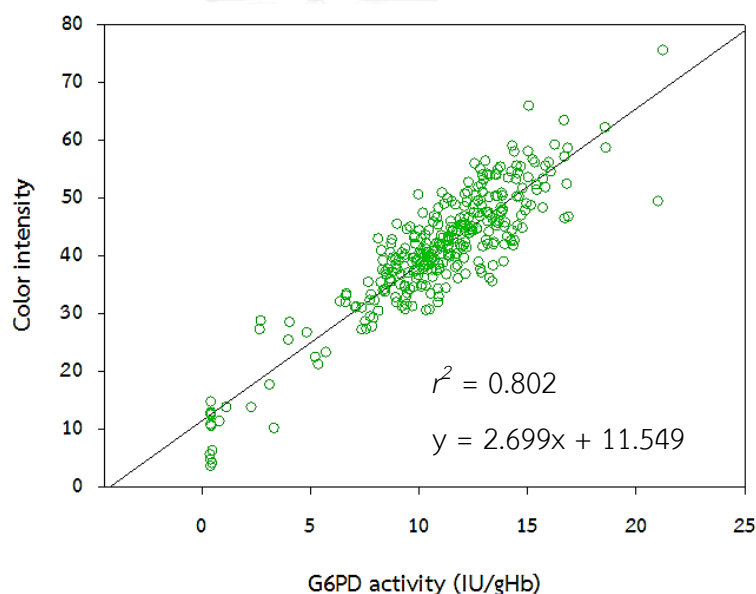
รายการ	ทั้งหมด	กลุ่มตัวอย่างจีซิกพีดี			p-value
		รุนแรง	ปานกลาง	ปกติ	
จำนวน (%)	318	14 (4.35)	14 (4.35)	290 (90.06)	-
ฮีโมโกลบิน (g/dl)	-	13.91	13.64	13.87	0.656
ฮีมาโตคริต (%)	-	42.42	41.66	42.22	0.711
เม็ดเลือดขาว ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	-	7.59	7.42	7.38	0.208
ระดับเอนไซม์ (IU/gHb)					
mean \pm SD	-	0.51 \pm 0.21	4.50 \pm 1.54	11.58 \pm 2.23	< 0.001
ระดับความเข้มข้น					
mean \pm SD	-	9.61 \pm 3.89	24.49 \pm 6.91	43.03 \pm 7.17	< 0.001

กลุ่มผู้ที่มีระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีสูง หรือ >150 % ของระดับการทำงานของเอนไซม์ปกติ (>17.20 IU/gHb) มีจำนวน 4 คน โดยพบว่าทั้งหมด (100 %) มีภาวะความผิดปกติของฮีโมโกลบิน ชนิดอี และโรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย (thalassemia) ร่วมด้วย

กลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่มที่จัดจำแนกตามระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี พบว่ามีระดับความเข้มข้นของสับอนุกรมตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.001$ แต่มีค่าของฮีโมโกลบิน, ฮีมาโตคริต และจำนวนเม็ดเลือดขาวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ p-value เท่ากับ 0.656, 0.711 และ 0.208 ตามลำดับ

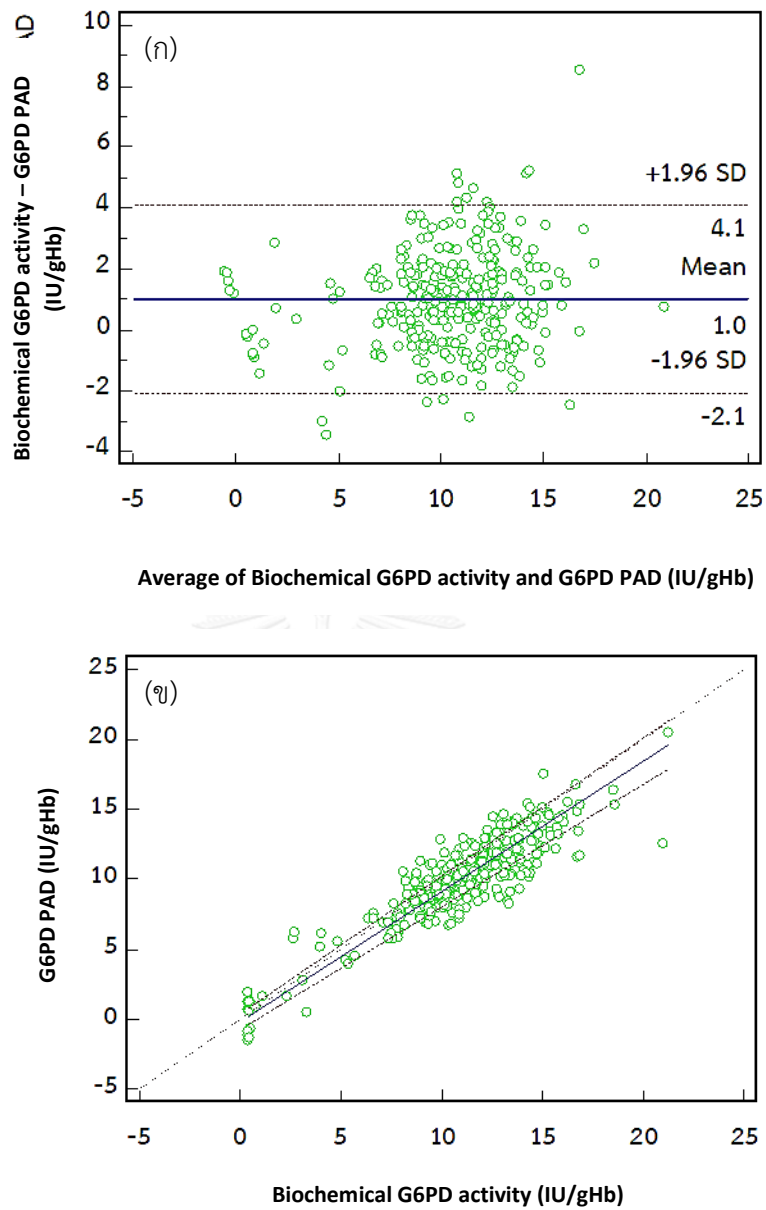
4.2 ผลการประเมินประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษกับวิธีตรวจอื่นๆ

กลุ่มตัวอย่างจำนวน จำนวน 322 คน จะถูกประเมินภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี ด้วยวิธีตรวจคัดกรอง fluorescent spot test, วิธีมาตรฐานการตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี biochemical G6PD activity และวิธีที่พัฒนาขึ้นด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ เพื่อใช้อุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษในการวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี จึงศึกษาความสัมพันธ์ของระดับความเข้มสีบนอุปกรณ์ตรวจตามหลักการ cytochemical staining ว่าสัมพันธ์กับระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีหรือไม่ ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีกับระดับความเข้มสีที่ได้จากการตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี ดังรูปที่ 60



รูปที่ 60 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีกับระดับความเข้มสีที่ได้จากการตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี (n=322)

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีกับระดับความเข้มสีที่ได้จากการตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีพบว่ามีความสัมพันธ์มาก ($p < 0.001$, $r^2 = 0.802$) แสดงถึงระดับความเข้มสีสามารถนำมาใช้ทำนายระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี จึงทำการประเมินประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษต่อการรายงานผลเชิงปริมาณวิเคราะห์ด้วยสถิติ Bland and Altman analysis และ Passing and Bablok regression



รูปที่ 61 กราฟผลการวิเคราะห์ด้วยสถิติ Bland and Altman analysis (ก) และ Passing and Bablok regression (ข)

จากรูปที่ 61 ผลการประเมินประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษในการรายงานผลเชิงปริมาณวิเคราะห์ด้วยสถิติ Bland and Altman analysis แกน y คือ ผลเฉลี่ยระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีของแต่ละตัวอย่างจากทั้งสองวิธี แกน x คือ ผลต่างระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีของแต่ละตัวอย่างจากทั้งสองวิธี

ผลการประเมินประสิทธิภาพด้วยสถิติ Bland and Altman analysis พบว่า 14 (4.35 %) ราย ออกนอกช่วงของการยอมรับ (limit of agreement $-2.1 - 4.1$ IU/gHb; เส้นประสีแดง) โดยมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากผลต่างของทั้งสองวิธีเท่ากับ 1.577 IU/gHb และมีค่าเฉลี่ยความเอนเอียง (mean bias) เท่ากับ 1 IU/gHb (เส้นสีฟ้า)

จากรูปที่ 61 ผลการประเมินประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีพื้นฐานกระดาษในการรายงานผลเชิงปริมาณวิเคราะห์ด้วยสถิติ Passing and Bablok regression

แกน y คือ ผลการตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีจากอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีพื้นฐานกระดาษ

แกน x คือ ผลการตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีจากวิธีมาตรฐาน biochemical G6PD activity

ผลการประเมินประสิทธิภาพด้วยสถิติ Passing and Bablok regression พบว่า สมการเชิงเส้นตรงเท่ากับ $y = 0.933x - 0.195$ โดยมีค่า A หรือ สัดส่วนความต่างของสองวิธี (proportional differences: ความชัน) เท่ากับ 0.933 และค่า B หรือ ความต่างของระบบ (systematic differences: จุดตัดแกน y) เท่ากับ -0.195

จากสมการ $y = Ax + B$ จุดมุ่งหมายของการประเมินคือ $y = x$ หรือ $A = 1$ และ $B = 0$ ช่วงความเชื่อมั่นของสัดส่วนความต่างของสองวิธีเท่ากับ 0.880 ถึง 0.987 ซึ่งไม่มีค่า 1 อยู่ในช่วง แสดงให้เห็นว่าทั้งสองวิธีให้ผลซึ่งมีสัดส่วนแตกต่างกัน แต่ช่วงความเชื่อมั่นของความต่างของระบบ -0.763 ถึง 0.353 ซึ่งมีค่า 0 อยู่ในช่วงแสดงให้เห็นว่าทั้งสองวิธีให้ผลความต่างของระบบไม่แตกต่างกัน

กลุ่มประชากรจำนวน 322 คน พบว่ามีผู้ที่มีระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีต่ำกว่าร้อยละ 40 ของคนปกติ (4.59 IU/gHb) มีจำนวน 21 คน หรือ 6.52 %, ตรวจคัดกรองด้วยวิธี fluorescent spot test ให้ผลเป็นผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีจำนวน 15 คน หรือ 4.66 % และเมื่ออ่านผลการตรวจจากอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีพื้นฐานกระดาษด้วยตาเปล่า ให้ผลเป็นผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีจำนวน 17 คน หรือ 5.28 % ดังตารางที่ 19 ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ระดับความเข้มสีของกลุ่มผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS6 ได้ค่าเฉลี่ยอยู่ 10.366 ± 4.109 (mean \pm SD) ค่าสูงสุดที่ใช้ในการตัดสินใจคือ 18

ผลการประเมินประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษในการรายงานผลเชิงคุณภาพวิเคราะห์เมื่อทำการเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจคัดกรอง fluorescent spot test พบว่า fluorescent spot test มีความไวร้อยละ 71.43, ความจำเพาะร้อยละ 100 และอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ ความไวร้อยละ 80.95 ความจำเพาะร้อยละ 100 ดังตารางที่ 20

ตารางที่ 19 ผลการตรวจคัดกรองเชิงคุณภาพวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี fluorescent spot test และ อุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ (cutoff = 4.59 IU/gHb)

การตรวจ	ผล	ระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี		ทั้งหมด
		(ร้อยละของปกติ)		
		≤ 40 %	> 40 %	
FST	Positive	15	0	15
	Negative	6	301	307
ทั้งหมด		21	301	322
G6PD PAD	Positive	17	0	17
	Negative	4	301	305
ทั้งหมด		21	301	322

ตารางที่ 20 ผลการประเมินประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษในการรายงานผลเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (cutoff = 4.59 IU/gHb)

การตรวจ	ประสิทธิภาพ (%)			
	ความไว Sensitivity	ความจำเพาะ Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value
FST	71.43	100	100	98.05
G6PD PAD	80.95	100	100	98.69

และเมื่อใช้เกณฑ์ที่ต่ำกว่าร้อยละ 30 ของระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีคนปกติ (3.44 IU/gHb) เป็นผู้ที่มีการตรวจพบเอนไซม์จีซิกพีดีมีจำนวน 19 คน หรือ 5.90 % ผลการประเมินประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษในการรายงานผลเชิงคุณภาพวิเคราะห์เมื่อทำการเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจคัดกรอง fluorescent spot test พบว่า fluorescent spot test มีความไวร้อยละ 78.95, ความจำเพาะร้อยละ 100 และอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ ความไวร้อยละ 89.47 ความจำเพาะร้อยละ 100 ดังตารางที่ 20

ตารางที่ 21 ผลการตรวจคัดกรองเชิงคุณภาพวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี fluorescent spot test และ อุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ (cutoff = 3.44 IU/gHb)

การตรวจ	ผล	ระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี (ร้อยละของปกติ)		ทั้งหมด
		≤30 %	>30 %	
		FST	Positive	
	Negative	4	303	307
ทั้งหมด		19	303	322
G6PD PAD	Positive	17	0	17
	Negative	2	303	305
ทั้งหมด		19	303	322

ตารางที่ 22 ผลการประเมินประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษในการรายงานผลเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (cutoff = 3.44 IU/gHb)

การตรวจ	ประสิทธิภาพ (%)			
	ความไว	ความจำเพาะ	Positive	Negative
	Sensitivity	Specificity	predictive value	predictive value
FST	78.95	100	100	98.70
G6PD PAD	89.47	100	100	99.34

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการประดิษฐ์อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลฐานกระดาษและนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี โดยการสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลฐานกระดาษด้วยเทคนิค wax printing กล่าวคือใช้กระดาษกรอง Whatman NO.4 เป็นวัสดุติดหลักในการผลิตอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษและใช้โปรแกรม Microsoft PowerPoint 2013 ในการออกแบบอุปกรณ์ตรวจ โดยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีจะประกอบด้วย บริเวณที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์จีซิกพีดี บริเวณที่ใช้ในการระบุชื่อเจ้าของตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ และบริเวณหลุมปฏิกิริยาทั้งสี่หลุม แบ่งออกเป็นหลุมไม่เกิดปฏิกิริยา (blank) 1 หลุมและหลุมที่เกิดปฏิกิริยา 3 หลุม โดยนำหลักการย้อมคูเมต์เลือดเพื่อวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี หรือ cytochemical staining มาประยุกต์ใช้บนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ ซึ่งเลือกใช้ปริมาณความเข้มข้นของสารในปฏิกิริยาดังกล่าวดังนี้ 10 mM G6P, 2.5 mM NADP⁺ (x2), 4 mM TNBT ปริมาตรละ 1 µl และ 50 µl working reagent ที่ประกอบด้วย 0.06 mM 1-metoxypMS, 200 mM tris-HCl buffer pH 7.7-7.8, 0.02 % digitonin และ 5 mM EDTA ในการตรวจวินิจฉัยตัวอย่างเลือดครบส่วน 5 µl

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นหากเป็นผู้ที่ไม่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีจะสามารถผลิต NADPH และเกิดปฏิกิริยาปรากฏเป็นสีม่วงดำ (ผลิตภัณฑ์ formazan ของ TNBT) ที่สามารถสังเกตและอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า หรือเป็นการรายงานผลเชิงคุณภาพวิเคราะห์ที่ประมาณ 10 นาที แต่ในผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีจะไม่มีสีปรากฏหรือปรากฏน้อยมากหรือมีสีเท่ากันทั้งสี่หลุม หากต้องการรายงานผลในเชิงปริมาณวิเคราะห์จะต้องทำการบันทึกภาพถ่ายขนาด 9.4x14.2 ซม., 24-bit, 1,200 dpi, ระบบสี RGB ที่ 25 นาที เพื่อนำเข้าโปรแกรม Adobe Photoshop CS6 ในการวิเคราะห์ผลระดับความเข้มสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น โดยต้องทำการแปลงระบบสีของภาพเป็นระบบสี CMYK และทำการวัดระดับความเข้มสีในช่องสี cyan ของหลุมปฏิกิริยาด้วยเครื่องมือ elliptical marquee tool ขนาด 175x175 พิกเซล และนำค่าที่วัดได้ทั้งสี่หลุมเข้าโปรแกรม G6PDCalColor เพื่อคำนวณและแปลผลระดับความเข้มสีเป็นผลของระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี พร้อมทั้งจัดจำแนกกลุ่มตัวอย่างว่าจัดอยู่ในกลุ่มใดของ G6PD Class จากขั้นตอนการตรวจวัดสีด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS6 ในช่องสี cyan หรือสีฟ้า สีของขอบหลุมปฏิกิริยาที่ผลิตมาจึงมีความจำเป็นต้องเป็นสีเหลืองเพื่อลดการรบกวนในการตรวจวัดผลในช่องสี cyan ซึ่งมีขนาดความหนาของเส้น 1 pt.

อุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาศสามารถรายงานผลเชิงคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณเคราะห์ได้ในคราวเดียวกัน จากการทดสอบประเมินประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาศ ด้วยกลุ่มตัวอย่างจำนวน 322 คน ระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีกลุ่มตัวอย่างที่ 100 % ของคนปกติเท่ากับ 11.46 IU/gHb ใช้ระดับการทำงานของเอนไซม์ที่ 1.15 ถึง 6.88 IU/gHb และ <1.15 IU/gHb เป็นเกณฑ์ในการจำแนกกลุ่มตัวอย่างออกเป็นกลุ่มผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีปานกลาง และกลุ่มผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีรุนแรงตามลำดับ จากการประดิษฐ์อุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาศพบว่าระดับความเข้มข้นอุปกรณ์ตรวจมีความสัมพันธ์กับระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี ($p < 0.001$, $r^2 = 0.802$) ซึ่งแต่ละกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่มพบว่ามึระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$)

เมื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพของผลการตรวจด้วยสถิติ Bland and Altman พบว่า 95 % ของผลตรวจตกอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ และ Passing and Bablok regression ($y = 0.933x - 0.195$) ยอมรับสมมุติฐาน $B=0$ และปฏิเสธสมมุติฐาน $A=1$ แต่ถึงกระนั้นช่วงของความเชื่อมั่นก็มีค่าที่เข้าใกล้ 1 มาก (0.987) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาศมีประสิทธิภาพเทียบเท่าวิธีมาตรฐาน biochemical G6PD activity โดยมีค่าร้อยละของค่าสัมประสิทธิ์การแปรผัน (% CV) เท่ากับ 5.39 และ 11.91 ในกลุ่มผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี และผู้ที่ไม่มีความพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี ตามลำดับ มีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 89.47, 100 % (ที่ระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีต่ำกว่าร้อยละ 30 ของปกติ) และ 80.95, 100% (ที่ระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีต่ำกว่าร้อยละ 40 ของปกติ) ซึ่งมีความไวสูงกว่าวิธี fluorescent spot test (78.95 %, 71.43 % ตามลำดับ) สามารถแปลผลได้ในช่วง 0.46-13.5 IU/gHb ($r^2 = 0.973$) ชัดจำกัดในการตรวจ (LOD) อยู่ที่ 0.38 IU/gHb โดยตัวอย่างเลือดที่มีปริมาณไขมันและบิลิรูบินสูงไม่ส่งผลต่อการตรวจ แต่ภาวะแตกทำลายของเม็ดเลือดในตัวอย่างเลือดครบส่วน ปริมาณของเม็ดเลือดขาว และเม็ดเลือดแดงส่งผลต่อการตรวจด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาศอย่างมีนัยสำคัญ

อุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาศที่ประดิษฐ์ขึ้นนี้ผลิตจากกระดาศกรองและเทปกาวใส จึงมีต้นทุนในการผลิตที่ต่ำ และสามารถหาซื้อได้ง่ายภายในประเทศ ลดการนำเข้าเครื่องมือที่มีราคาสูง ตัวอุปกรณ์ทำจากกระดาศจึงมีขนาดบางและเบา (~500 มิลลิกรัม) สะดวกต่อการพกพา ในการออกตรวจนอกห้องปฏิบัติการ ตัวอุปกรณ์ตรวจมีขั้นตอนในการทดสอบที่ไม่ยุ่งยาก ใช้งานง่าย ใช้ตัวอย่างเลือดเพียง 5 μ l อีกทั้ง ใช้ปริมาณน้ำยาในการทดสอบน้อย ราคาต้นทุนในการผลิตประมาณ 4 บาท/ตรวจ

2. อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาและพัฒนาเทคนิคการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีนี้ เป็นการประดิษฐ์อุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีให้มีลำดับขั้นตอนการตรวจที่ไม่ยุ่งยาก แต่มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับวิธีมาตรฐาน (quantitative assay: biochemical G6PD activity) สามารถรายงานผลได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณวิเคราะห์ อีกทั้งมีต้นทุนที่ต่ำ ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งในการคัดแยกผู้ที่มีความเสี่ยงในการเกิดการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงอย่างฉับพลัน (acute intravascular hemolysis) และภาวะแทรกซ้อนที่ตามมา อันเกิดมาจากภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ภายหลังจากการได้รับยาหรือสารเคมีบางชนิด [53] เช่น ยาต้านมาลาเรียในกลุ่มซัลฟา ไพโรมาควิน เป็นต้น [12] ซึ่งในสภาวะปกติผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีนี้จะไม่แสดงอาการและอาจไม่ได้รับการตรวจมาก่อน ทำให้ไม่ทราบถึงความเสี่ยงที่จะเกิดขึ้นกับตน แพทย์จึงมีความจำเป็นที่จะต้องทราบและสั่งตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีในผู้ป่วยก่อนที่จะมีการได้รับยาดังกล่าว ภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีเป็นความผิดปกติที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมบนโครมาโซม X ที่มีอุบัติการณ์สูงประมาณกว่า 400 ล้านคนทั่วโลก [5] โดยเฉพาะในแถบประเทศที่มีการแพร่ระบาดของโรคมาลาเรีย รวมทั้งประเทศไทย ซึ่งพบผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีถึงประมาณร้อยละ 11 ถึง 14.2 [6, 7, 130] โดยมีรูปแบบการกลายพันธุ์ G6PD Viangchan (871 G>A), G6PD Canton (1376 G>T) และ G6PD Mahidol (487 G>A) มากที่สุดสามอันดับแรกของประเทศ ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่ม WHO class II และ WHO class III การนำเอาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลฐานกระดาษมาใช้ในการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการตรวจในผู้ป่วยที่ต้องได้รับการรักษาต้านมาลาเรีย โดยใช้กรรมวิธีการผลิตด้วยเทคนิค Wax printing ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว มีกระบวนการผลิตที่ง่าย และต้นทุนต่ำ [30, 31] วัสดุที่ใช้ในการผลิตคือกระดาษกรอง Whatman NO.4 ที่มีขนาดรูพรุน 20-25 ไมโครเมตร ซึ่งมีการแพร่กระจายของสารน้ำได้ดีกว่ากระดาษกรอง Whatman NO.1 ที่มีขนาดรูพรุน 11 ไมโครเมตร และใช้โปรแกรม Microsoft PowerPoint 2013 ในการออกแบบอุปกรณ์ตรวจ อุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีจะประกอบด้วย 3 พื้นที่หลักคือ 1) พื้นที่ที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์จีซิกพีดี 2) พื้นที่ที่ใช้ในการระบุชื่อเจ้าของตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ และ 3) พื้นที่ที่ใช้ในการอ่านผล โดยแบ่งออกเป็นหลุมปฏิกิริยาสี่หลุม: 1 หลุมไม่เกิดปฏิกิริยา (blank) และ 3 หลุมที่เกิดปฏิกิริยา

หลักการย้อมดูเม็ดเลือดเพื่อวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี หรือ cytochemical staining [22, 103, 131] ถูกนำมาประยุกต์ใช้บนอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ โดยพบว่าปัจจุบันมีชุดตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีบนกระดาษที่ใช้หลักการเดียวกันนี้ ได้แก่ CareStart™ G6PD deficiency [94] และ BinaxNow® G6PD [132] ทั้งสองชุดตรวจใช้

หลักการการแพร่ของสารน้ำตัวอย่างบนกระดาษแพร่ไปยังบริเวณที่มีการตรึงน้ำยา และอ่านสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากบริเวณที่มีการตรึงน้ำยาได้ด้วยตาเปล่าเช่นเดียวกับอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษ ซึ่งสามารถตรวจผลได้อย่างรวดเร็วที่ 10 นาที และที่ประมาณ 5-7 นาทีตามลำดับ ซึ่งมีระยะเวลาใกล้เคียงกับอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษในการรายงานผลเชิงคุณภาพวิเคราะห์ ทั้งนี้ชุดตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีทั้งสองเหล่านี้ก็เป็นเพียงการรายงานผลเชิงคุณภาพวิเคราะห์ หลักการการทำงานของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี คือผสมตัวอย่างเลือดกับน้ำยาตรวจในอัตราส่วน 1: 10 หรือ ผสมตัวอย่างเลือดครบส่วน 5 μ l กับน้ำยาตรวจ 50 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ตัวอย่างเลือดไม่เจือจางและไม่ข้นจนเกินไปทำให้สามารถสังเกตปฏิกิริยาได้ชัดเจน น้ำยาที่ใช้ในการตรวจที่ประกอบด้วย 0.02 % ของ digitonin ทำหน้าที่ในการสกัดเอนไซม์ออกจากเม็ดเลือดแดง, 200 mM tris-HCl buffer ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมปฏิกิริยา ซึ่งมีช่วงความเป็นกรดเบส (pH) ที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีอยู่ที่ 7.7-7.8 สอดคล้องกับงานวิจัยของคณะวิจัย Beutler และคณะวิจัย Jiang [3, 133], 5 mM EDTA ทำหน้าที่ช่วยรักษาสภาพของเอนไซม์ [134] และป้องกันการรบกวนปฏิกิริยาจากโลหะหนัก ซึ่งพบว่าไม่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี ($p=0.700$) และมี 0.06 mM 1-methoxyPMS ที่ทำหน้าที่ในการช่วยถ่ายเทอิเล็กตรอนให้เกิดสีของปฏิกิริยาบนกระดาษ โดยพบว่าตัวเร่งปฏิกิริยา 1-methoxyPMS มีสีชมพูหากมีปริมาณความเข้มข้นสูงจะทำให้ค่าพื้นหลังสูงบดบังสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เมื่อทำการสกัดเอนไซม์บริเวณพื้นที่ที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์จีซิกพีดีวงกลมสีฟ้าเสร็จแล้ว ทำการดูดสารสกัดดังกล่าวหยดลงหลุมปฏิกิริยาขนาด 0.52 ซม. ที่ใช้ในการอ่านผลทั้งสิ้น หลุม ซึ่งหลุมปฏิกิริยาขนาด 0.52 สามารถรองรับของเหลวได้ปริมาตร 1 μ l หรือ หยดละ 1 μ l โดยที่บริเวณหลุมปฏิกิริยาจะถูกเคลือบไว้ด้วย G6P, NADP⁺ และ TNBT จากการศึกษาพบว่าต้องใช้ความเข้มข้นของ 10 mM G6P 1 หยด และ 2.5 mM NADP⁺ 2 หยดบนกระดาษจึงจะถึงจุดอิ่มตัวของสี ซึ่งความเข้มข้นของ G6P และ NADP⁺ ที่ใช้จะมีความเข้มข้นสูงกว่าวิธีการตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยเทคนิค spectrophotometry assay เนื่องจากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์มีประสิทธิภาพความไวในการตรวจหาผลผลิตของปฏิกิริยามากกว่าการตรวจวัดระดับความเข้มข้นบนกระดาษ สำหรับ TNBT จะใช้ที่ระดับความเข้ม 4 mM ทำหน้าที่เป็นตัวบ่งชี้ (indicator) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น กล่าวคือ ถ้าตัวอย่างเลือดของผู้ที่มาตรวจมีระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีปกติจะสามารถผลิต NADPH และรีดิวซ์ TNBT เป็น formazan ปรากฏเป็นสีม่วงดำ ที่สามารถสังเกตและอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า แต่ในผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีจะไม่มีสีปรากฏหรือปรากฏน้อยมาก สารตระกูล tetrazolium salt ที่มีคุณสมบัติเปลี่ยนสีจากการเกิดปฏิกิริยารีดักซ์ชันมีหลายชนิดได้แก่ MTT, XTT, MTS เป็นต้น [135] ซึ่งสารตระกูล tetrazolium salt ที่ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีในปัจจุบันนอกจาก TNBT คือ WST8 ซึ่งสามารถวัดความเข้มสีที่

ความยาวคลื่น 450-595 [136, 137] การอ่านผลจากการสังเกตสีที่ปรากฏขึ้นบนกระดาษด้วยตาเปล่า เป็นหลักการพื้นฐานทั่วไปที่ได้รับการความนิยมเป็นอย่างมากในการนำมาประยุกต์ใช้ตรวจหาสารต่างๆบนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลฐานกระดาษทางด้านการแพทย์ เช่น การตรวจโปรตีน, การตรวจน้ำตาล (glucose, ketone) , การตรวจความเป็นกรดเบส และการตรวจไนไตรด์ เป็นต้น [27, 113]

สำหรับการรายงานผลในเชิงปริมาณวิเคราะห์ สามารถทำได้โดยวิเคราะห์ระดับความเข้มสีจากภาพถ่าย โดยทำการบันทึกภาพถ่ายขนาด 9.4×14.2 ซม., 24-bit, 1,200 dpi, ระบบสี RGB ที่ 25 นาที และนำเข้าโปรแกรม Adobe Photoshop CS6 ในการวิเคราะห์ผลระดับความเข้มสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น [1, 33] ทั้งนี้การตั้งค่าความละเอียดและขนาดของภาพขึ้นอยู่กับระบบและประสิทธิภาพของเครื่องสแกนเนอร์ในแต่ละห้องปฏิบัติการ ระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโดยรวมประมาณ 25-27 นาที ซึ่งใช้ระยะเวลาที่สั้นกว่าเทคนิคการตรวจ spectrophotometry assay (G6PD Randox, PD 410) จากการศึกษาปฏิกิริยาความเข้มสีที่ปรากฏขึ้นบนอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษพบว่าสีเริ่มปรากฏเด่นชัดเจนนี 10 นาทีและเริ่มคงที่ที่ 25 นาที ขั้นตอนการวิเคราะห์ระดับความเข้มสีจากภาพถ่าย ถ่ายภาพอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีนาทีที่ 25 แปลงระบบสีของภาพเป็นระบบสี CMYK และทำการวัดระดับความเข้มสีในช่องสี cyan ของหลุมปฏิกิริยาด้วยเครื่องมือ elliptical marquee tool โดยวาดเป็นวงกลมขนาด 175×175 พิกเซล ซึ่งระบบสี CMYK และช่องสี cyan ที่ใช้ในการวัดมีความสัมพันธ์กับสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนอุปกรณ์ตรวจให้ช่วงของค่าที่กว้างที่สุด จึงเหมาะสมที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับระบบสีและช่องสีอื่นๆ เช่น RGB, greyscale เป็นต้น นำค่าที่วัดได้ทั้งสี่หลุมเข้าโปรแกรม G6PDCalColor เพื่อคำนวณและแปลผลระดับความเข้มสีเป็นผลของระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี จากสมการระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี $= 0.306 \times (\text{ระดับความเข้มสี}) - 2.631$ ($r^2=0.973$) กล่าวคือ หลุมแรกจะไม่มี G6P เป็นหลุมที่ไม่เกิดปฏิกิริยา (blank) ใช้สำหรับคำนวณหักล้างระดับความเข้มสีพื้นหลัง (background color) ของหลุมที่เกิดปฏิกิริยาอีก 3 หลุม ทั้งนี้หากมีการเปลี่ยนแปลงอุปกรณ์บันทึกภาพหรือมีการผลิตน้ำยาชุดใหม่ควรทำกราฟมาตรฐานใหม่และแก้ไขสมการนี้ในตัวโปรแกรม นอกจากนี้โปรแกรม G6PDCalColor ยังสามารถจัดจำแนกกลุ่มตัวอย่างว่าจัดอยู่ในกลุ่มใดของ G6PD Class ได้ จากขั้นตอนการตรวจวัดสีด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS6 ในช่องสี cyan หรือสีฟ้า ด้วยเหตุนี้สีของขอบหลุมปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาษจึงมีความจำเป็นต้องเป็นสีเหลืองเพื่อลดการรบกวนในการตรวจวัดผลในช่องสี cyan ซึ่งมีขนาดความหนาของเส้น 1 pt.

จากกลุ่มตัวอย่างผู้ผ่านการตรวจคัดกรองการบริจาคโลหิต ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลศิริราช จำนวน 322 คน พบการกลายพันธุ์ทั้งหมด 12.73 %

โดยพบการกลายพันธุ์ชนิดเวียงจันทน์ (Viangchan) 5.3 % และแคนตอน (Canton) 1.6 % ในกลุ่มตัวอย่างมากที่สุดสองอันดับแรกสอดคล้องกับงานวิจัยของคณะนุชประยูร [6] โดย 100% ของระดับการทำงานเอนไซม์จีซิกพีตีปกติของกลุ่มตัวอย่างเท่ากับ 11.46 IU/gHb ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับคณะวิจัยนันทโกมล [7] ระดับการทำงานของเอนไซม์ที่ 1.15 ถึง 6.88 IU/gHb และ <1.15 IU/gHb ถูกใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกกลุ่มตัวอย่างออกเป็น กลุ่มผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีปานกลาง และกลุ่มผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีรุนแรงตามลำดับ ตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก WHO กลุ่มตัวอย่างทั้งสามกลุ่มที่จัดจำแนกตามระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีตี พบว่ามีระดับความเข้มข้นของฮีโมโกลบินต่ำกว่าภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีฐานกระดาศแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.001$ โดยไม่ขึ้นกับค่าของฮีโมโกลบิน, ฮีมาโตคริต และจำนวนเม็ดเลือดขาว (p -value เท่ากับ 0.656, 0.711 และ 0.208 ตามลำดับ) ทำการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ของระดับความเข้มข้นฮีโมโกลบินกับระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีตี พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมากระหว่างฮีโมโกลบินกับระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีตี ($p < 0.001$, $r^2 = 0.802$) จึงน่าจะใช้ระดับความเข้มข้นฮีโมโกลบินในการทำนายระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีตีได้ ทำการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของผลการตรวจจากอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีฐานกระดาศในการรายงานผลเชิงปริมาณวิเคราะห์เปรียบเทียบกับวิธีตรวจมาตรฐานด้วยสถิติ Bland and Altman พบว่า 95 % ของผลตรวจตกอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ [129] การวิเคราะห์ด้วยสถิติ Passing and Bablok regression ยอมรับสมมติฐาน $B=0$ และปฏิเสธสมมติฐาน $A=1$ แต่ถึงกระนั้นช่วงของความเชื่อมั่นก็มีค่าที่เข้าใกล้ 1 มาก (0.987) จากสถิติการวิเคราะห์ 2 ใน 3 ให้ผลยอมรับอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีฐานกระดาศนี้ จึงสรุปได้ว่าอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีฐานกระดาศมีประสิทธิภาพเทียบเท่าวิธีมาตรฐาน biochemical G6PD activity สามารถใช้ทดแทนกันได้ โดยมีค่าร้อยละของค่าสัมประสิทธิ์การแปรผัน (% CV) เท่ากับ 5.39 และ 11.91 ในกลุ่มผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตี และผู้ที่ไม่มีความพร่องเอนไซม์จีซิกพีตี ตามลำดับ การศึกษาความไวและความจำเพาะของอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีฐานกระดาศใช้เกณฑ์ที่ ผู้ที่มีระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีตีต่ำกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 40 ของระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีตีปกติถือว่าเป็นผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตี หรือเท่ากับ 4.59 IU/gHb พบว่าอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีฐานกระดาศมีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 80.59 % และ 100 % ซึ่งมีความไวสูงกว่าวิธี fluorescent spot test (71.43 %) แต่มีความจำเพาะเท่ากัน (100 %) โดยมีข้อดีกว่าชุดตรวจ CareStart™ G6PD deficiency ที่มีความจำเพาะต่ำกว่า fluorescent spot test (specificity) แต่มีความไวมากกว่า (sensitivity) จากงานวิจัยของคณะ Baird, คณะ Roca-Feltrer และคณะ Larue [94] [131, 138] ซึ่งใช้เกณฑ์เดียวกันนี้คือต่ำกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 40 ของระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีตีปกติถือว่าเป็นผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตี งานวิจัยคณะ Tinley ได้ทำการศึกษาความไวและความจำเพาะของชุดตรวจ BinaxNow® G6PD โดยมีค่าความไวเท่ากับ 97 % และ

ความจำเพาะเท่ากับ 98 % ทั้งนี้ได้ทำการเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะกับวิธีการตรวจ fluorescent spot test ในกลุ่มตัวอย่างเดียวกัน [132] โดยเมื่อลดระดับการตัดสินใจในการจำแนกผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีลงมาจากร้อยละ 40 เป็นเมื่อต่ำกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 30 ของระดับการทำงานเอนไซม์จีซิกพีตีปกติตามคำแนะนำขององค์การอนามัยโลก WHO พบว่าความไวเพิ่มขึ้นเป็น 89.47 % อุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีฐานกระดาษสามารถแปลผลได้ในช่วง 0.46-13.5 IU/gHb ($r^2 = 0.973$) และมีขีดจำกัดในการตรวจ (LOD) อยู่ที่ 0.38 IU/gHb โดยตัวอย่างเลือดที่มีปริมาณไขมันและบิลิรูบินสูงไม่ส่งผลต่อการตรวจ แต่ภาวะแตกทำลายของเม็ดเลือดในตัวอย่างเลือดครบส่วน (≥ 1.5 g/dl) ปริมาณของเม็ดเลือดขาวส่งผลต่อการตรวจด้วยอุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีฐานกระดาษอย่างมีนัยสำคัญในทุกระดับ ส่วนปริมาณเม็ดเลือดแดงอาจให้ผลผิดพลาดได้ในกลุ่มผู้ที่มีปริมาณเม็ดเลือดแดงต่ำ (Hct<30 %) และปริมาณเม็ดเลือดแดงสูง (Hct>60 %)

อุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีฐานกระดาษ สามารถรายงานผลเชิงคุณภาพวิเคราะห์โดยการอ่านผลด้วยตาเปล่า และรายงานผลเชิงปริมาณเคราะห์โดยการวิเคราะห์ความเข้มสีของภาพถ่ายอุปกรณ์ตรวจด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS6 อุปกรณ์ตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีฐานกระดาษผลิตจากกระดาษกรองและเทปกาวใส จึงมีต้นทุนในการผลิตที่ต่ำ ราคาต้นทุนในการผลิตประมาณ 4 บาท/ตรวจ สามารถหาซื้อได้ง่ายภายในประเทศ ลดการนำเข้าเครื่องมือที่มีราคาสูง เนื่องจากอุปกรณ์ตรวจผลิตมาจากกระดาษจึงมีขนาดบางและมีน้ำหนักเบาประมาณ 500 มิลลิกรัม สะดวกต่อการพกพา ในการออกตรวจนอกห้องปฏิบัติการ ตัวอุปกรณ์ตรวจมีขั้นตอนในการตรวจที่ไม่ยุ่งยาก ใช้งานง่าย เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน ใช้ตัวอย่างเลือดเพียง 5 μ l อีกทั้ง ใช้ปริมาณน้ำยาในการทดสอบน้อย ตัวอุปกรณ์เป็นกระดาษสามารถย่อยสลายได้ง่ายเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

รายการอ้างอิง

- [1] A.W. Martinez, S.T. Phillips, E. Carrilho, S.W. Thomas, 3rd, H. Sindi, G.M. Whitesides, Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis, *Anal Chem.* 80 (2008), 10 3699-707.
- [2] E. Beutler, The genetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, *Semin Hematol.* 27 (1990), 2 137-64.
- [3] E. Beutler, G6PD deficiency, *Blood.* 84 (1994), 11 3613-36.
- [4] A.M. Salvati, D. Maffi, P. Caprari, M.T. Pasquino, M.P. Caforio, A. Tarzia, [Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and hereditary hemolytic anemia], *Ann Ist Super Sanita.* 35 (1999), 2 193-203.
- [5] E.T. Nkhoma, C. Poole, V. Vannappagari, S.A. Hall, E. Beutler, The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis, *Blood Cells Mol Dis.* 42 (2009), 3 267-78.
- [6] I. Nuchprayoon, S. Sanpavat, S. Nuchprayoon, Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Thailand: G6PD Viangchan (871G>A) is the most common deficiency variant in the Thai population, *Hum Mutat.* 19 (2002), 2 185.
- [7] D. Nantakomol, R. Paul, A. Palasuwan, N.P. Day, N.J. White, M. Imwong, Evaluation of the phenotypic test and genetic analysis in the detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, *Malar J.* 12 (2013), 289.

- [8] G. Bancone, C.S. Chu, R. Somsakchaicharoen, N. Chowwiwat, D.M. Parker, P. Charunwatthana, et al., Characterization of G6PD genotypes and phenotypes on the northwestern Thailand-Myanmar border, *PLoS One*. 9 (2014), 12 e116063.
- [9] P. Phompradit, J. Kuesap, W. Chaijaroenkul, R. Rueangweerayut, Y. Hongkaew, R. Yamnuan, et al., Prevalence and distribution of glucose-6 - phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in Thai and Burmese populations in malaria endemic areas of Thailand, *Malar J*. 10 (2011), 368.
- [10] W.Y. Jiang, B.Y. Zhou, G.L. Yu, H. Liu, J.B. Zeng, Q.D. Lin, et al., G6PD genotype and its associated enzymatic activity in a Chinese population, *Biochem Genet*. 50 (2012), 1-2 34-44.
- [11] R.W. Kellermeyer, A.R. Tarlov, G.J. Brewer, P.E. Carson, A.S. Alving, Hemolytic effect of therapeutic drugs. Clinical considerations of the primaquine-type hemolysis, *JAMA*. 180 (1962), 388-94.
- [12] K.N. Bangchang, W. Songsaeng, A. Thanavibul, P. Choroenlarp, J. Karbwang, Pharmacokinetics of primaquine in G6PD deficient and G6PD normal patients with vivax malaria, *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 88 (1994), 2 220-2.
- [13] K. Myat Phone, O. Myint, N. Aung, H. Aye Lwin, The use of primaquine in malaria infected patients with red cell glucose-6 - phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in Myanmar, *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 25 (1994), 4 710-3.
- [14] A.S. Alving, P.E. Carson, C.L. Flanagan, C.E. Ickes, Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes, *Science*. 124 (1956), 3220 484-5.

- [15] Na-Nakorn S, Wasi P, Panich V, Sookanek M, Pornpakul M, P. P, Acute hemolysis in glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency. A study in 20 patients., *Siriraj Hosp Gaz* 22 (1970), 1117-37.
- [16] J.K. Baird, N. Valecha, S. Duparc, N.J. White, R.N. Price, Diagnosis and Treatment of *Plasmodium vivax* Malaria, *Am J Trop Med Hyg.* 95 (2016), 6 Suppl 35-51.
- [17] Standardization of procedures for the study of glucose-6 - phosphate dehydrogenase. Report of a WHO Scientific Group, World Health Organ Tech Rep Ser. 366 (1967), 1-53.
- [18] C.E. Amiwero, P.O. Olatunji, Re-evaluation of methaemoglobin reduction as a screening procedure for glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), *Afr J Med Med Sci.* 36 (2007), 2 177-81.
- [19] W.N. Gibbs, Screening for glucose-6 -phosphate dehydrogenase deficiency in haemolytic disorders: the methylene blue reduction test, *West Indian Med J.* 28 (1979), 3 148-55.
- [20] B.H. Wolf, R.S. Weening, R.B. Schutgens, C.J. van Noorden, I.M. Vogels, N.J. Nagelkerke, Detection of glucose-6 -phosphate dehydrogenase deficiency in erythrocytes: a spectrophotometric assay and a fluorescent spot test compared with a cytochemical method, *Clin Chim Acta.* 168 (1987), 2 129-36.
- [21] I.K. Tan, T.P. Whitehead, Automated fluorometric determination of glucose-6 -phosphate dehydrogenase (G6PD) and 6 -phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) activities in red blood cells, *Clin Chem.* 15 (1969), 6 467-78.
- [22] A.L. Peters, C.J. Van Noorden, Glucose-6 -phosphate dehydrogenase deficiency and malaria: cytochemical detection of heterozygous G6 PD deficiency in women, *J Histochem Cytochem.* 57 (2009), 11 1003-11.

- [23] A.W. Martinez, S.T. Phillips, G.M. Whitesides, E. Carrilho, Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices, *Anal Chem.* 82 (2010), 1 3-10.
- [24] A.W. Martinez, S.T. Phillips, M.J. Butte, G.M. Whitesides, Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays, *Angew Chem Int Ed Engl.* 46 (2007), 8 1318-20.
- [25] A.W. Martinez, S.T. Phillips, B.J. Wiley, M. Gupta, G.M. Whitesides, FLASH: a rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices, *Lab Chip.* 8 (2008), 12 2146-50.
- [26] D.A. Bruzewicz, M. Reches, G.M. Whitesides, Low-cost printing of poly(dimethylsiloxane) barriers to define microchannels in paper, *Anal Chem.* 80 (2008), 9 3387-92.
- [27] K. Abe, K. Suzuki, D. Citterio, Inkjet-printed microfluidic multianalyte chemical sensing paper, *Anal Chem.* 80 (2008), 18 6928-34.
- [28] X. Li, J. Tian, T. Nguyen, W. Shen, Paper-based microfluidic devices by plasma treatment, *Anal Chem.* 80 (2008), 23 9131-4.
- [29] X. Li, J. Tian, G. Garnier, W. Shen, Fabrication of paper-based microfluidic sensors by printing, *Colloids Surf B Biointerfaces.* 76 (2010), 2 564-70.
- [30] Y. Lu, W. Shi, L. Jiang, J. Qin, B. Lin, Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost, portable bioassay, *Electrophoresis.* 30 (2009), 9 1497-500.

- [31] E. Carrilho, A.W. Martinez, G.M. Whitesides, Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics, *Anal Chem.* 81 (2009), 16 7091-5.
- [32] W. Dungchai, O. Chailapakul, C.S. Henry, A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing, *Analyst.* 136 (2011), 1 77-82.
- [33] T. Songjaroen, W. Dungchai, O. Chailapakul, W. Laiwattanapaisal, Novel, simple and low-cost alternative method for fabrication of paper-based microfluidics by wax dipping, *Talanta.* 85 (2011), 5 2587-93.
- [34] C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nat Methods.* 9 (2012), 7 671-5.
- [35] J. Noiphung, K. Talalak, I. Hongwarittorn, N. Pupinyo, P. Thirabowonkitphithan, W. Laiwattanapaisal, A novel paper-based assay for the simultaneous determination of Rh typing and forward and reverse ABO blood groups, *Biosens Bioelectron.* 67 (2015), 485-9.
- [36] J. Noiphung, T. Songjaroen, W. Dungchai, C.S. Henry, O. Chailapakul, W. Laiwattanapaisal, Electrochemical detection of glucose from whole blood using paper-based microfluidic devices, *Anal Chim Acta.* 788 (2013), 39-45.
- [37] C.J. Van Noorden, I.M. Vogels, A sensitive cytochemical staining method for glucose-6 - phosphate dehydrogenase activity in individual erythrocytes. II. Further improvements of the staining procedure and some observations with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, *Br J Haematol.* 60 (1985), 1 57-63.

- [38] K.J. Tsai, I.J. Hung, C.K. Chow, A. Stern, S.S. Chao, D.T. Chiu, Impaired production of nitric oxide, superoxide, and hydrogen peroxide in glucose 6-phosphate-dehydrogenase-deficient granulocytes, *FEBS Lett.* 436 (1998), 3 411-4.
- [39] F.M. Low, M.B. Hampton, C.C. Winterbourn, Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte, *Antioxid Redox Signal.* 10 (2008), 9 1621-30.
- [40] M.D. Cappellini, G. Fiorelli, Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, *Lancet.* 371 (2008), 9606 64-74.
- [41] G.D. Gaetani, J.C. Parker, H.N. Kirkman, Intracellular restraint: a new basis for the limitation in response to oxidative stress in human erythrocytes containing low-activity variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 71 (1974), 9 3584-7.
- [42] S.K. Srivastava, E. Beutler, Oxidized glutathione levels in erythrocytes of glucose-6-phosphate-dehydrogenase-deficient subjects, *Lancet.* 2 (1968), 7558 23-4.
- [43] L. Luzzatto, Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency: from genotype to phenotype, *Haematologica.* 91 (2006), 10 1303-6.
- [44] M.G. Persico, G. Viglietto, G. Martini, D. Toniolo, G. Paonessa, C. Moscatelli, et al., Isolation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA clones: primary structure of the protein and unusual 5' non-coding region, *Nucleic Acids Res.* 14 (1986), 6 2511-22.
- [45] P. Szabo, M. Purrello, M. Rocchi, N. Archidiacono, B. Alhadeff, G. Filippi, et al., Cytological mapping of the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene distal to the fragile-X site suggests a high rate of meiotic recombination across this site, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81 (1984), 24 7855-9.

- [46] B.J. Trask, H. Massa, S. Kenwrick, J. Gitschier, Mapping of human chromosome Xq28 by two-color fluorescence in situ hybridization of DNA sequences to interphase cell nuclei, *Am J Hum Genet.* 48 (1991), 1 1-15.
- [47] T. Bulliamy, L. Luzzatto, A. Hirono, E. Beutler, Hematologically important mutations: glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Blood Cells Mol Dis.* 23 (1997), 2 302-13.
- [48] A. Franze, M.I. Ferrante, F. Fusco, A. Santoro, E. Sanzari, G. Martini, et al., Molecular anatomy of the human glucose 6-phosphate dehydrogenase core promoter, *FEBS Lett.* 437 (1998), 3 313-8.
- [49] Transcript: G6PD-001 ENST00000393562.6 2017 [updated March 2017; cited 2017 May 14]. glucose-6-phosphate dehydrogenase]. Available from: http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000160211;r=X:154531391-154547572;t=ENST00000393562.
- [50] T. Vulliamy, P. Mason, L. Luzzatto, The molecular basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, *Trends Genet.* 8 (1992), 4 138-43.
- [51] C.E. Naylor, P. Rowland, A.K. Basak, S. Gover, P.J. Mason, J.M. Bautista, et al., Glucose 6-phosphate dehydrogenase mutations causing enzyme deficiency in a model of the tertiary structure of the human enzyme, *Blood.* 87 (1996), 7 2974-82.
- [52] S.W. Au, S. Gover, V.M. Lam, M.J. Adams, Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP(+) molecule and provides insights into enzyme deficiency, *Structure.* 8 (2000), 3 293-303.
- [53] P.J. Mason, J.M. Bautista, F. Gilsanz, G6PD deficiency: the genotype-phenotype association, *Blood Rev.* 21 (2007), 5 267-83.

- [54] J.E. Frank, Diagnosis and management of G6PD deficiency, *Am Fam Physician*. 72 (2005), 7 1277-82.
- [55] L. Luzzatto, Genetics of red cells and susceptibility to malaria, *Blood*. 54 (1979), 5 961-76.
- [56] C.H. Ko, K. Li, C.L. Li, P.C. Ng, K.P. Fung, A.E. James, et al., Development of a novel mouse model of severe glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficiency for in vitro and in vivo assessment of hemolytic toxicity to red blood cells, *Blood Cells Mol Dis*. 47 (2011), 3 176-81.
- [57] D. Mendez, M. Linares, A. Diez, A. Puyet, J.M. Bautista, Stress response and cytoskeletal proteins involved in erythrocyte membrane remodeling upon *Plasmodium falciparum* invasion are differentially carbonylated in G6PD A-deficiency, *Free Radic Biol Med*. 50 (2011), 10 1305-13.
- [58] K. Becker, L. Tilley, J.L. Vennerstrom, D. Roberts, S. Rogerson, H. Ginsburg, Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions, *Int J Parasitol*. 34 (2004), 2 163-89.
- [59] A. Radfar, A. Diez, J.M. Bautista, Chloroquine mediates specific proteome oxidative damage across the erythrocytic cycle of resistant *Plasmodium falciparum*, *Free Radic Biol Med*. 44 (2008), 12 2034-42.
- [60] E.F. Roth, Jr., C. Raventos-Suarez, A. Rinaldi, R.L. Nagel, Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency inhibits in vitro growth of *Plasmodium falciparum*, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 80 (1983), 1 298-9.

- [61] J. Miller, J. Golenser, D.T. Spira, N.S. Kosower, *Plasmodium falciparum*: thiol status and growth in normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient human erythrocytes, *Exp Parasitol.* 57 (1984), 3 239-47.
- [62] H. Atamna, G. Pascarmona, H. Ginsburg, Hexose-monophosphate shunt activity in intact *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and in free parasites, *Mol Biochem Parasitol.* 67 (1994), 1 79-89.
- [63] L. Luzzatto, O. Sodeinde, G. Martini, Genetic variation in the host and adaptive phenomena in *Plasmodium falciparum* infection, *Ciba Found Symp.* 94 (1983), 159-73.
- [64] N.J. White, L.G. Qiao, G. Qi, L. Luzzatto, Rationale for recommending a lower dose of primaquine as a *Plasmodium falciparum* gametocytocide in populations where G6PD deficiency is common, *Malar J.* 11 (2012), 418.
- [65] R.E. Howes, F.B. Piel, A.P. Patil, O.A. Nyangiri, P.W. Gething, M. Dewi, et al., G6PD deficiency prevalence and estimates of affected populations in malaria endemic countries: a geostatistical model-based map, *PLoS Med.* 9 (2012), 11 e1001339.
- [66] P.W. Gething, I.R. Elyazar, C.L. Moyes, D.L. Smith, K.E. Battle, C.A. Guerra, et al., A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010, *PLoS Negl Trop Dis.* 6 (2012), 9 e1814.
- [67] Glucose-6 - phosphate dehydrogenase deficiency. WHO Working Group, *Bull World Health Organ.* 67 (1989), 6 601-11.
- [68] B. Ley, N. Luter, F.E. Espino, A. Devine, M. Kalnoky, Y. Lubell, et al., The challenges of introducing routine G6PD testing into radical cure: a workshop report, *Malar J.* 14 (2015), 377.

- [69] P. Cocco, P. Todde, S. Fornera, M.B. Manca, P. Manca, A.R. Sias, Mortality in a cohort of men expressing the glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, *Blood*. 91 (1998), 2 706-9.
- [70] C.Q. Edwards, Anemia and the liver. Hepatobiliary manifestations of anemia, *Clin Liver Dis*. 6 (2002), 4 891-907, viii.
- [71] O. Selroos, Reversible renal failure and G.-6-P.D. deficiency, *Lancet*. 2 (1972), 7771 284-5.
- [72] L. Luzzatto, Glucose-6-phosphate dehydrogenase and other genetic factors interacting with drugs, *Prog Clin Biol Res*. 214 (1986), 385-99.
- [73] T. Siddiqui, A.H. Khan, Hepatitis A and cytomegalovirus infection precipitating acute hemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, *Mil Med*. 163 (1998), 6 434-5.
- [74] P. Tugwell, Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency in Nigerians with jaundice associated with lobar pneumonia, *Lancet*. 1 (1973), 7810 968-9.
- [75] R.P. McCaffrey, C.H. Halsted, M.F. Wahab, R.P. Robertson, Chloramphenicol-induced hemolysis in Caucasian glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, *Ann Intern Med*. 74 (1971), 5 722-6.
- [76] W.Y. Au, S.C. Chan, Association between glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency and fatal outcome of hepatitis E infection in middle-aged men, *Singapore Med J*. 53 (2012), 2 148-9.
- [77] C.R. Angle, Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and acute renal failure, *Lancet*. 2 (1972), 7768 134.

- [78] C.A. Kattamis, M. Kyriazakou, S. Chaidas, Favism: clinical and biochemical data, *J Med Genet.* 6 (1969), 1 34-41.
- [79] M.A. Belsey, The epidemiology of favism, *Bull World Health Organ.* 48 (1973), 1 1-13.
- [80] P. Arese, A. De Flora, Pathophysiology of hemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, *Semin Hematol.* 27 (1990), 1 1-40.
- [81] G. Schiliro, A. Russo, R. Curreri, S. Marino, A. Sciotto, G. Russo, Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Sicily. Incidence, biochemical characteristics and clinical implications, *Clin Genet.* 15 (1979), 2 183-8.
- [82] P.A. Nair, S.M. Al Khusaiby, Kernicterus and G6PD deficiency--a case series from Oman, *J Trop Pediatr.* 49 (2003), 2 74-7.
- [83] L.H. Johnson, V.K. Bhutani, A.K. Brown, System-based approach to management of neonatal jaundice and prevention of kernicterus, *J Pediatr.* 140 (2002), 4 396-403.
- [84] M. Sgro, D. Campbell, V. Shah, Incidence and causes of severe neonatal hyperbilirubinemia in Canada, *CMAJ.* 175 (2006), 6 587-90.
- [85] T. Valaes, S.A. Doxiadis, P. Fessas, Acute Hemolysis Due to Naphthalene Inhalation, *J Pediatr.* 63 (1963), 904-15.
- [86] R.P. Perkins, Hydrops fetalis and stillbirth in a male glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient fetus possibly due to maternal ingestion of sulfisoxazole; a case report, *Am J Obstet Gynecol.* 111 (1971), 3 379-81.

- [87] M. Kaplan, F.F. Rubaltelli, C. Hammerman, M.T. Vilei, C. Leiter, A. Abramov, et al., Conjugated bilirubin in neonates with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, *J Pediatr.* 128 (1996), 5 Pt 1 695-7.
- [88] M. Kaplan, P. Renbaum, E. Levy-Lahad, C. Hammerman, A. Lahad, E. Beutler, Gilbert syndrome and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a dose-dependent genetic interaction crucial to neonatal hyperbilirubinemia, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94 (1997), 22 12128-32.
- [89] J.W. Hamilton, F.G. Jones, M.F. McMullin, Glucose-6-phosphate dehydrogenase Guadalajara--a case of chronic non-spherocytic haemolytic anaemia responding to splenectomy and the role of splenectomy in this disorder, *Hematology.* 9 (2004), 4 307-9.
- [90] L. Corash, S. Spielberg, C. Bartsocas, L. Boxer, R. Steinherz, M. Sheetz, et al., Reduced chronic hemolysis during high-dose vitamin E administration in Mediterranean-type glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, *N Engl J Med.* 303 (1980), 8 416-20.
- [91] E. Beutler, A series of new screening procedures for pyruvate kinase deficiency, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, and glutathione reductase deficiency, *Blood.* 28 (1966), 4 553-62.
- [92] A. Jalloh, I.S. Tantular, S. Pusarawati, A.P. Kawilarang, H. Kerong, K. Lin, et al., Rapid epidemiologic assessment of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in malaria-endemic areas in Southeast Asia using a novel diagnostic kit, *Trop Med Int Health.* 9 (2004), 5 615-23.
- [93] I.S. Tantular, F. Kawamoto, An improved, simple screening method for detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, *Trop Med Int Health.* 8 (2003), 6 569-74.

- [94] J.K. Baird, M. Dewi, D. Subekti, I. Elyazar, A.W. Satyagraha, Noninferiority of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency diagnosis by a point-of-care rapid test vs the laboratory fluorescent spot test demonstrated by copper inhibition in normal human red blood cells, *Transl Res.* 165 (2015), 6 677-88.
- [95] E. Beutler, M.C. Baluda, Methemoglobin Reduction. Studies of the Interaction between Cell Populations and of the Role of Methylene Blue, *Blood.* 22 (1963), 323-33.
- [96] S.S. Shah, S.A. Diakite, K. Traore, M. Diakite, D.P. Kwiatkowski, K.A. Rockett, et al., A novel cytofluorometric assay for the detection and quantification of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, *Sci Rep.* 2 (2012), 299.
- [97] R.E. Bernstein, Brilliant cresyl blue screening test for demonstrating glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in red cells, *Clin Chim Acta.* 8 (1963), 158-60.
- [98] H.S. Jacob, J.H. Jandl, A simple visual screening test for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency employing ascorbate and cyanide, *N Engl J Med.* 274 (1966), 21 1162-7.
- [99] CareStart™ G6PD RDT*: ACCESS BIO.; 2017 [cited 2017 May 14]. Available from: http://accessbio.net/eng/products/products01_01.asp.
- [100] BinaxNOW® G6PD: Alere; [updated 2017; cited 2017 May 14]. Available from: <http://www.alere.com/en/home/product-details/binaxnow-g6pd.html#>.
- [101] C.J. van Noorden, I.M. Vogels, J. James, J. Tas, A sensitive cytochemical staining method for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in individual

- erythrocytes. I. Optimization of the staining procedure, *Histochemistry*. 75 (1982), 4 493-506.
- [102] C.J. Van Noorden, *Histochemistry and cytochemistry of glucose-6-phosphate dehydrogenase*, *Prog Histochem Cytochem*. 15 (1984), 4 1-85.
- [103] N. Gurbuz, T.A. Aksu, C.J. Van Noorden, *Biochemical and cytochemical evaluation of heterozygote individuals with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency*, *Acta Histochem*. 107 (2005), 4 261-7.
- [104] C.J. Van Noorden, F. Dolbeare, J. Aten, *Flow cytofluorometric analysis of enzyme reactions based on quenching of fluorescence by the final reaction product: detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in human erythrocytes*, *J Histochem Cytochem*. 37 (1989), 9 1313-8.
- [105] G.W. Lohr, H.D. Waller, O. Karges, *[Quantitative enzyme determination in erythrocytes]*, *Klin Wochenschr*. 35 (1957), 17 871-5.
- [106] B. Ringelhahn, *A simple laboratory procedure for the recognition of A - (African type) G-6PD deficiency in acute haemolytic crisis*, *Clin Chim Acta*. 36 (1972), 1 272-4.
- [107] V. Laosombat, B. Sattayasevana, W. Janejindamai, V. Viprakasit, T. Shirakawa, K. Nishiyama, et al., *Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in the south of Thailand and identification of a novel variant (G6PD Songklanagarind)*, *Blood Cells Mol Dis*. 34 (2005), 2 191-6.
- [108] J. Olkkonen, K. Lehtinen, T. Erho, *Flexographically printed fluidic structures in paper*, *Anal Chem*. 82 (2010), 24 10246-50.

- [109] J. Nie, Y. Liang, Y. Zhang, S. Le, D. Li, S. Zhang, One-step patterning of hollow microstructures in paper by laser cutting to create microfluidic analytical devices, *Analyst*. 138 (2013), 2 671-6.
- [110] C.L. Sones, I.N. Katis, P.J. He, B. Mills, M.F. Namiq, P. Shardlow, et al., Laser-induced photo-polymerisation for creation of paper-based fluidic devices, *Lab Chip*. 14 (2014), 23 4567-74.
- [111] X. Yang, O. Forouzan, T.P. Brown, S.S. Shevkoplyas, Integrated separation of blood plasma from whole blood for microfluidic paper-based analytical devices, *Lab Chip*. 12 (2012), 2 274-80.
- [112] T. Songjaroen, W. Dungchai, O. Chailapakul, C.S. Henry, W. Laiwattanapaisal, Blood separation on microfluidic paper-based analytical devices, *Lab Chip*. 12 (2012), 18 3392-8.
- [113] S.A. Klasner, A.K. Price, K.W. Hoeman, R.S. Wilson, K.J. Bell, C.T. Culbertson, Paper-based microfluidic devices for analysis of clinically relevant analytes present in urine and saliva, *Anal Bioanal Chem*. 397 (2010), 5 1821-9.
- [114] E. Carrilho, S.T. Phillips, S.J. Vella, A.W. Martinez, G.M. Whitesides, Paper microzone plates, *Anal Chem*. 81 (2009), 15 5990-8.
- [115] Fundamentals of Digital Imaging [cited 2016 April 15]. Available from: pages.towson.edu/apatel/CS109/PPTS/ch02.pptx.
- [116] CSS, HTML und Javascript mit {stil}. Available from: <http://www.mediaevent.de/css/color.html>.

- [117] A. Inc. About Color Spaces [updated 2013-08-08; cited 2016 April 17]. Available from:<https://developer.apple.com/library/mac/documentation/Cocoa/Conceptual/DrawColor/Concepts/AboutColorSpaces.html>.
- [118] คล้ายเพ็ชร์. วิธีการวัดสีแผ่นพิมพ์ธนบัตรด้วยการประมวลผลภาพดิจิทัล เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจสอบคุณภาพงานพิมพ์สีพื้น: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2556.
- [119] M. Sommers, B. Beacham, R. Baker, J. Fargo, Intra- and inter-rater reliability of digital image analysis for skin color measurement, *Skin Res Technol.* 19 (2013), 4 484-91.
- [120] Y. Xia, J. Si, Z. Li, Fabrication techniques for microfluidic paper-based analytical devices and their applications for biological testing: A review, *Biosens Bioelectron.* 77 (2016), 774-89.
- [121] K. Grudpan, S.D. Kolev, S. Lapanantnopakhun, I.D. McKelvie, W. Wongwilai, Applications of everyday IT and communications devices in modern analytical chemistry: A review, *Talanta.* 136 (2015), 84-94.
- [122] C.C. Liu, S.L. Liu, H.L. Xi, H.L. Yu, S.K. Zhou, G.L. Huang, et al., Simultaneous quantification of four metabolites of sulfur mustard in urine samples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid phase extraction, *J Chromatogr A.* (2017).
- [123] J.Z. Ji, Q.H. Meng, Evaluation of the interference of hemoglobin, bilirubin, and lipids on Roche Cobas 6000 assays, *Clin Chim Acta.* 412 (2011), 17-18 1550-3.
- [124] G. Steen, A. Klerk, K.v.d. Laan, E.F. Eppens, Evaluation of the interference due to haemoglobin, bilirubin and lipids on Immulite 2500 assays: a practical approach, *Annals of Clinical Biochemistry.* 48 (2011), 2 170-5.

- [125] S. Agarwal, G. Vargas, C. Nordstrom, E. Tam, G.J. Buffone, S. Devaraj, Effect of interference from hemolysis, icterus and lipemia on routine pediatric clinical chemistry assays, *Clin Chim Acta.* 438 (2015), 241-5.
- [126] S.W. Nicole LaRue, and Dr. Sampa Pal. A guide to fluorescent spot testing for G6PD deficiency: PATH; April, 2014.
- [127] FavorPrep Blood Genomic DNA Extraction Mini Kit 2009 May 14 [cited 2017]. Available from: [http://www.favorgen.com/pdf/DataSheet/Nucleic_Acid_Extraction/Genomic_DNA/FABGK%20000%20001%20001_1%20001_2%20\(2015\).pdf](http://www.favorgen.com/pdf/DataSheet/Nucleic_Acid_Extraction/Genomic_DNA/FABGK%20000%20001%20001_1%20001_2%20(2015).pdf).
- [128] H. Passing, Bablok, A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I, *J Clin Chem Clin Biochem.* 21 (1983), 11 709-20.
- [129] D. Giavarina, Understanding Bland Altman analysis, *Biochem Med (Zagreb).* 25 (2015), 2 141-51.
- [130] S. Tuchinda, D.L. Rucknagel, S. Na-Nakorn, P. Wasi, The Thai variant and the distribution of alleles of 6 - phosphogluconate dehydrogenase and the distribution of glucose 6 - phosphate dehydrogenase deficiency in Thailand, *Biochem Genet.* 2 (1968), 3 253-64.
- [131] N. LaRue, M. Kahn, M. Murray, B.T. Leader, P. Bansil, S. McGray, et al., Comparison of quantitative and qualitative tests for glucose-6 - phosphate dehydrogenase deficiency, *Am J Trop Med Hyg.* 91 (2014), 4 854-61.

- [132] K.E. Tinley, A.M. Loughlin, A. Jepson, E.D. Barnett, Evaluation of a rapid qualitative enzyme chromatographic test for glucose-6 - phosphate dehydrogenase deficiency, *Am J Trop Med Hyg.* 82 (2010), 2 210-4.
- [133] J. Jiang, X. Ma, C. Song, B. Lin, W. Cao, S. Wu, et al., Using the fluorescence spot test for neonatal screening of G6PD deficiency, *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 34 Suppl 3 (2003), 140-2.
- [134] D.S. Auld, Removal and replacement of metal ions in metallopeptidases, *Methods Enzymol.* 248 (1995), 228-42.
- [135] M.V. Berridge, P.M. Herst, A.S. Tan, Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction, *Biotechnol Annu Rev.* 11 (2005), 127-52.
- [136] M. De Niz, A.C. Eziefula, L. Othieno, E. Mbabazi, D. Nabukeera, E. Ssemmondo, et al., Tools for mass screening of G6PD deficiency: validation of the WST8/1-methoxy-PMS enzymatic assay in Uganda, *Malar J.* 12 (2013), 210.
- [137] M. Kuwahata, R. Wijesinghe, M.F. Ho, A. Pelecanos, A. Bobogare, L. Landry, et al., Population screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiencies in Isabel Province, Solomon Islands, using a modified enzyme assay on filter paper dried bloodspots, *Malar J.* 9 (2010), 223.
- [138] A. Roca-Feltrer, N. Khim, S. Kim, S. Chy, L. Canier, A. Kerleguer, et al., Field trial evaluation of the performances of point-of-care tests for screening G6PD deficiency in Cambodia, *PLoS One.* 9 (2014), 12 e116143.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

การเตรียมสาร

1. การเตรียม 12 mM G6P [MW=304.1] ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (stock)

ชั่งสาร 36.5 มิลลิกรัม ในน้ำ 10 มิลลิลิตร

1.1 การเตรียม 10 mM G6P ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ชั่งสาร 15.2 มิลลิกรัม ในน้ำ 5 มิลลิลิตร

2. การเตรียม 2.5 mM NADP⁺ [MW=765.39] (stock)

NADP⁺ ขวดละ 5 มิลลิกรัม เติมน้ำ 2,613 ไมโครลิตร

3. การเตรียม 6 mM TNBT [MW=907.63] ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (stock)

ชั่งสาร 54.5 มิลลิกรัม ในน้ำ 10 มิลลิลิตร

3.1 การเตรียม 4 mM TNBT ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

ชั่งสาร 7.3 มิลลิกรัม ในน้ำ 2 มิลลิลิตร

4. การเตรียม 10 mM 1-methoxyPMS [MW=336.36] ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (stock)

ชั่งสาร 33.6 มิลลิกรัม ในน้ำ 10 มิลลิลิตร

4.1 การเตรียม 1 mM 1-methoxyPMS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

ชั่งสาร 0.7 มิลลิกรัม ในน้ำ 2 มิลลิลิตร

5. การเตรียม 300 mM tris-HCl buffer [MW=121.14] ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (stock)

ชั่งสาร 1.817 กรัม ในน้ำ 40 มิลลิลิตร + 1 N HCl ในการปรับ pH

เติมน้ำจนกระทั่งได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

6. การเตรียม 0.9% NSS ปริมาตร 400 มิลลิลิตร (stock)

ชั่งสาร sodium chloride [MW=58.44] $0.9 \times 4 = 3.6$ กรัม เติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร

7. การเตรียม 200 mM tris-HCl buffer pH 7.7-7.8 + 5 mM EDTA + 0.02 % digitonin

ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

(เติมน้ำ 40 มล. ใช้ 1 N HCl ในการปรับ pH เติมน้ำเพิ่มจนได้ปริมาตร 50 มล.)

Tris-base [MW=121.14]	1,211.4	มิลลิกรัม
EDTA [MW=372.24]	93.1	มิลลิกรัม
Digitonin [MW=1,229.31]	20	มิลลิกรัม

8. การเตรียมตัวอย่างเลือดเพื่อใช้ในการทดสอบสารรบกวนของอุปกรณ์ตรวจ

เตรียมตัวอย่างเลือดฮีมาโทคริต (Hct) 50 % ปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร

ตัวอย่างเลือดหมู่เดียวกัน (กรุ๊ปบี)		
	เม็ดเลือดแดง: Pack red cells (ไมโครลิตร)	น้ำพลาสมา: plasma (ไมโครลิตร)
ผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีรุนแรง	500	500
ผู้ที่ไม่มีความพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี	500	500

9. การเตรียม 20 % intralipid ปริมาตร 400 ไมโครลิตร

ส่วนประกอบ

น้ำมันถั่วเหลือง	18 × 4	= 72	ไมโครลิตร
ไข่แดงไก่	1.9 × 4	= 7.6	ไมโครลิตร
Glycerin	0.9 × 4	= 3.6	ไมโครลิตร
น้ำเกลือ 0.9 %	79.2 × 4	= 316.8	ไมโครลิตร
รวม	100 × 4	= 400	ไมโครลิตร

10. การเตรียม hemolysate สำหรับการทดลองสารบวกรจาก hemolysis

- 1) นำเม็ดเลือดแดงเข้มข้นของผู้มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีมาผสมกับเม็ดเลือดแดงเข้มข้นของผู้ที่ไม่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีอัตราส่วน 1:1 หรือ 100: 100 μl
- 2) นำเม็ดเลือดแดงเข้มข้นที่ผสมแล้วเข้าช่องแช่แข็ง $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ประมาณ 30 นาที
- 3) นำออกจากช่องแช่แข็งและละลาย
- 4) ทำซ้ำข้อ 2-3 อีก 2 ครั้ง รวมทั้งหมด 3 ครั้ง
- 5)ปั่นตกที่ 14,000 rpm. เก็บส่วนน้ำไปวัด OD_{540} และใช้ในการทดลอง

11. การเตรียมน้ำยา DRABKIN ปริมาตร 4,000 มิลลิลิตร

ส่วนประกอบ

Sodium bicarbonate anhydrate (NaHCO_3)	1	$\times 4 = 4$	กรัม
Potassium cyanide (KCN)	0.05	$\times 4 = 0.2$	กรัม
Potassium fericyanide ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)	0.2	$\times 4 = 0.8$	กรัม
น้ำ	1,000	$\times 4 = 4,000$	ไมโครลิตร

เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

12. การเตรียม 20 mmol/L NaOH [MW=39.997] ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ขั้วสาร 40 มิลลิกรัม ในน้ำ 50 มิลลิลิตร

12.1 การเตรียม 0.1 mmol/L NaOH ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

นำ 20 mmol/L NaOH มา 0.05 มิลลิลิตร เติมน้ำเพิ่มอีก 9.95 มิลลิลิตร

13. การเตรียม 5 mmol/L EDTA [MW=584.66] ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ขั้วสาร 93.1 มิลลิกรัม ในน้ำ 50 มิลลิลิตร

14. การเตรียม 0.02 % digitonin ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (stock)

ขั้วสาร digitonin 10 มิลลิกรัม เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

15. การเตรียมบิลิรูบิน 1,000 $\mu\text{mol/L}$ [MW=584.66] ปริมาตร 4.333 มิลลิลิตร

ชั้นสาร 2.6 มิลลิกรัม

ละลายใน	0.1 mmol/L NaOH	333	ไมโครลิตร
	5 mmol/L EDTA	2,000	ไมโครลิตร
	20 mmol/L NaOH	2,000	ไมโครลิตร

16. การเตรียม 4 % nusieve: agarose gel ปริมาตร 400 มิลลิลิตร

ชั้นสาร nusieve 12 กรัม ร่วมกับ agarose 4 กรัม ละลายใน 0.5x TBE buffer 400 มิลลิลิตร (เก็บที่ 4 °C)

17. การเตรียม 0.5x TBE buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร (stock)

นำ 10x TBE buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร

18. การเตรียม DNA ladder ปริมาตร 80 ไมโครลิตร

ส่วนประกอบ

DNA ladder	1×10	= 10	ไมโครลิตร
6x loading dye	2×10	= 20	ไมโครลิตร
น้ำ PCR grade	5×10	= 50	ไมโครลิตร

19. การเตรียม 70 % alcohol ปริมาตร 300 มิลลิลิตร

นำ absolute ethanol ปริมาตร 210 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นอีก 90 มิลลิลิตร

20. การเตรียมน้ำยาของชุดสกัดดีเอ็นเอ (FABGK 001-2, 300 preps)

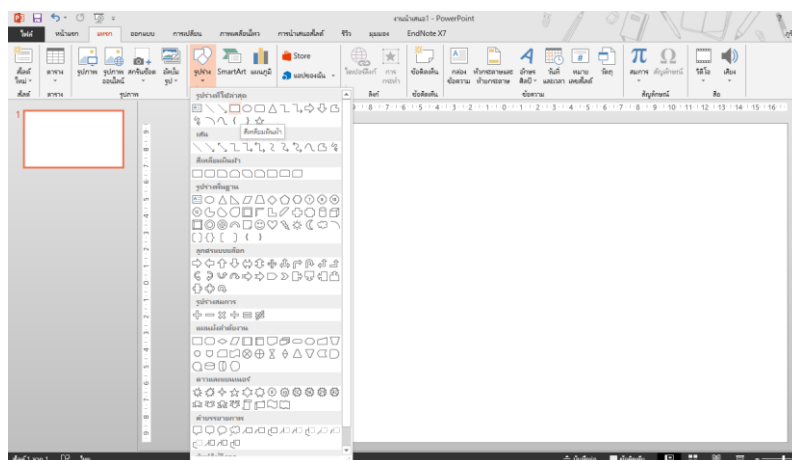
เติม absolute ethanol ดังนี้	W1 buffer	45	มิลลิลิตร
	Wash buffer	200	มิลลิลิตร
เติมน้ำ PCR grade ดังนี้	Proteinase K	1.1	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

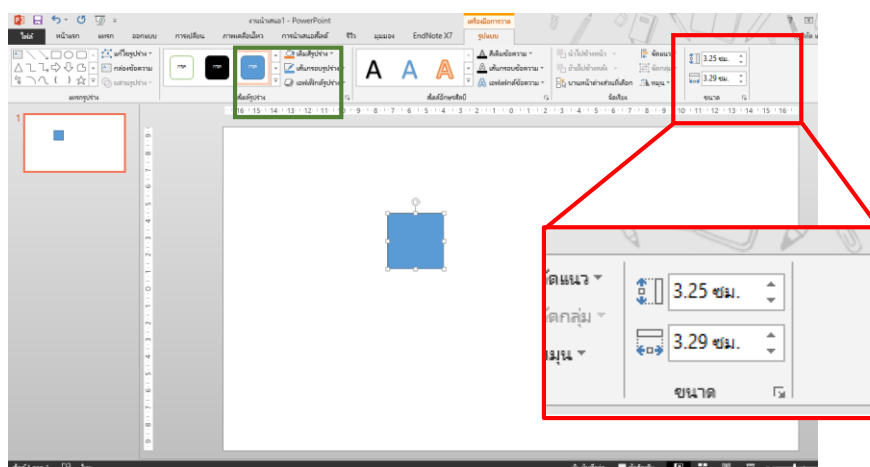
การใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์

1. การใช้โปรแกรม Microsoft PowerPoint 2013 ในการออกแบบอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ

1.1 การแทรกรูปภาพ: เลือกแทรกที่แถบเมนู > เลือกรูปร่างที่แถบเครื่องมือ > เลือกรูปทรงที่ต้องการใช้สร้างอุปกรณ์ตรวจ > วาด

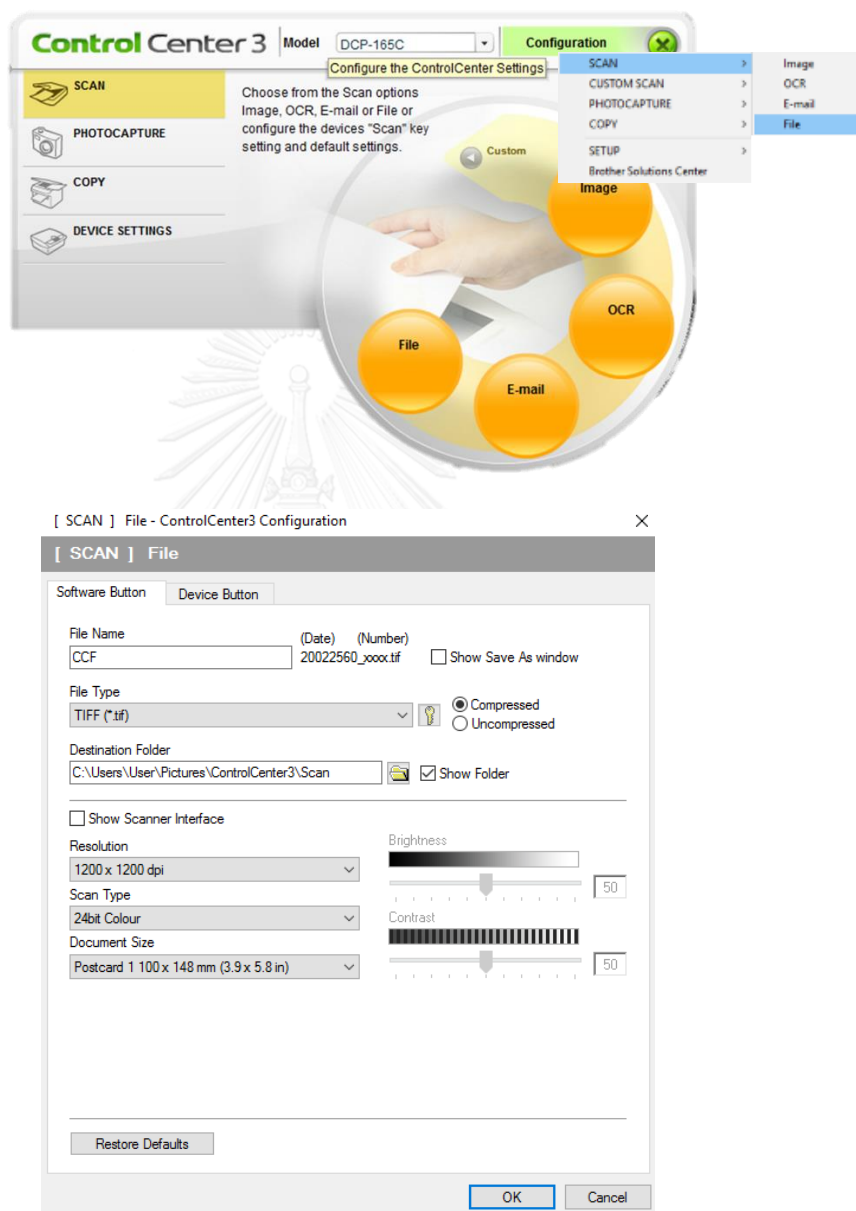


1.2 การกำหนดขนาดและรูปทรงของวัตถุ: คลิกที่รูปวาดที่วาดขึ้นจะปรากฏแถบเมนูรูปแบบ > สามารถกำหนดขนาดความกว้างและยาว ดึงกรอบสี่เหลี่ยมสีแดงในรูป และสามารถกำหนดสีเส้นและสีของวัตถุได้ดึงกรอบสี่เหลี่ยมสีเขียวในรูป ภายหลังจากวาดเสร็จจะทำการ copy รูปไปวางใน Microsoft Word 2013



2. การใช้โปรแกรม Control Center 3 ในการถ่ายภาพอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษด้วยเครื่องพิมพ์

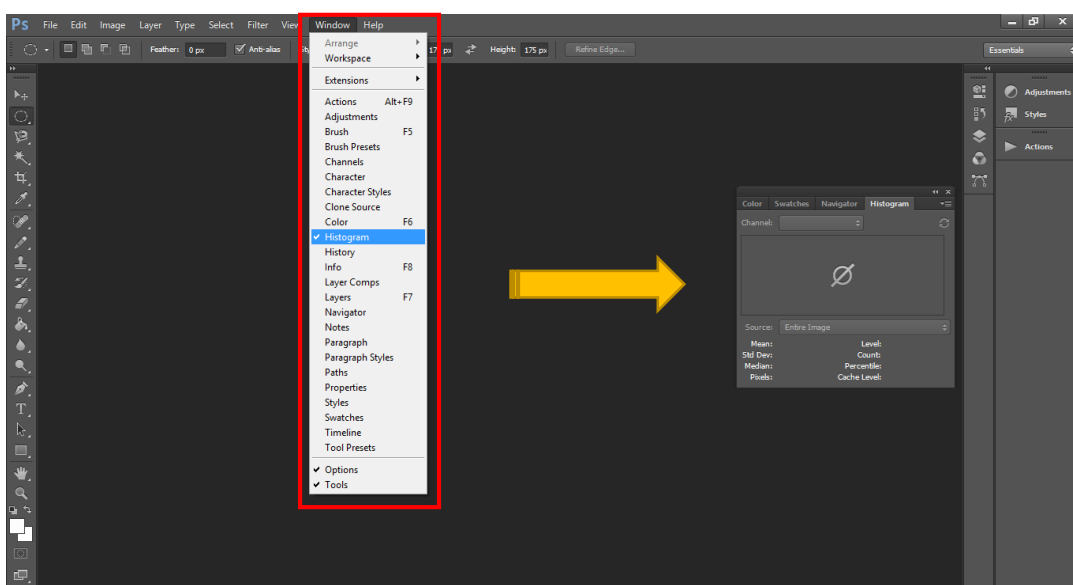
2.1 การตั้งค่าโปรแกรม: กดที่ configuration > scan > file > ตั้งค่าตามภาพ > ok



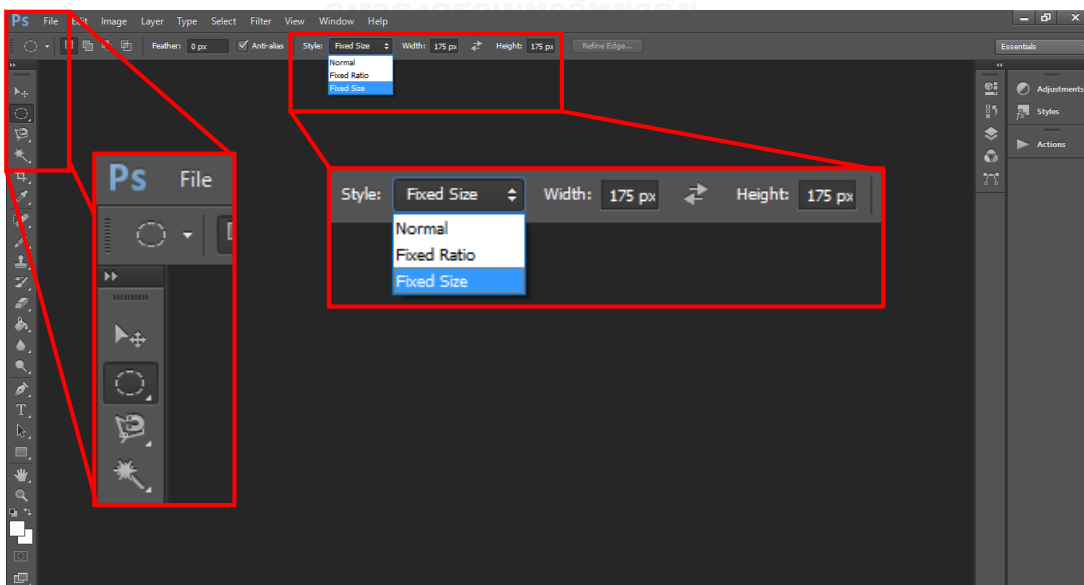
2.2 การใช้งานโปรแกรมการถ่ายภาพ: กดที่ เมนู scan > file

3. การใช้งานโปรแกรม Adobe Photoshop CS6 สำหรับวัดค่าความเข้มสีของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์พื้นฐานกระดาษ

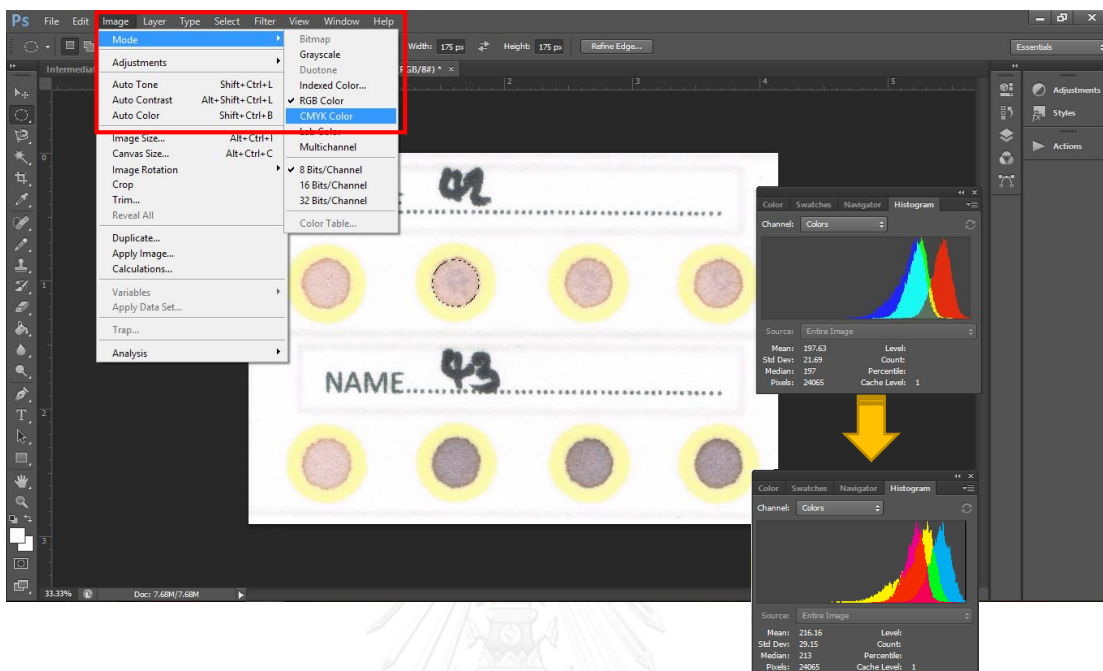
3.1 การเปิดหน้าต่างสำหรับการวัดความเข้มสี: กดที่ window > histogram



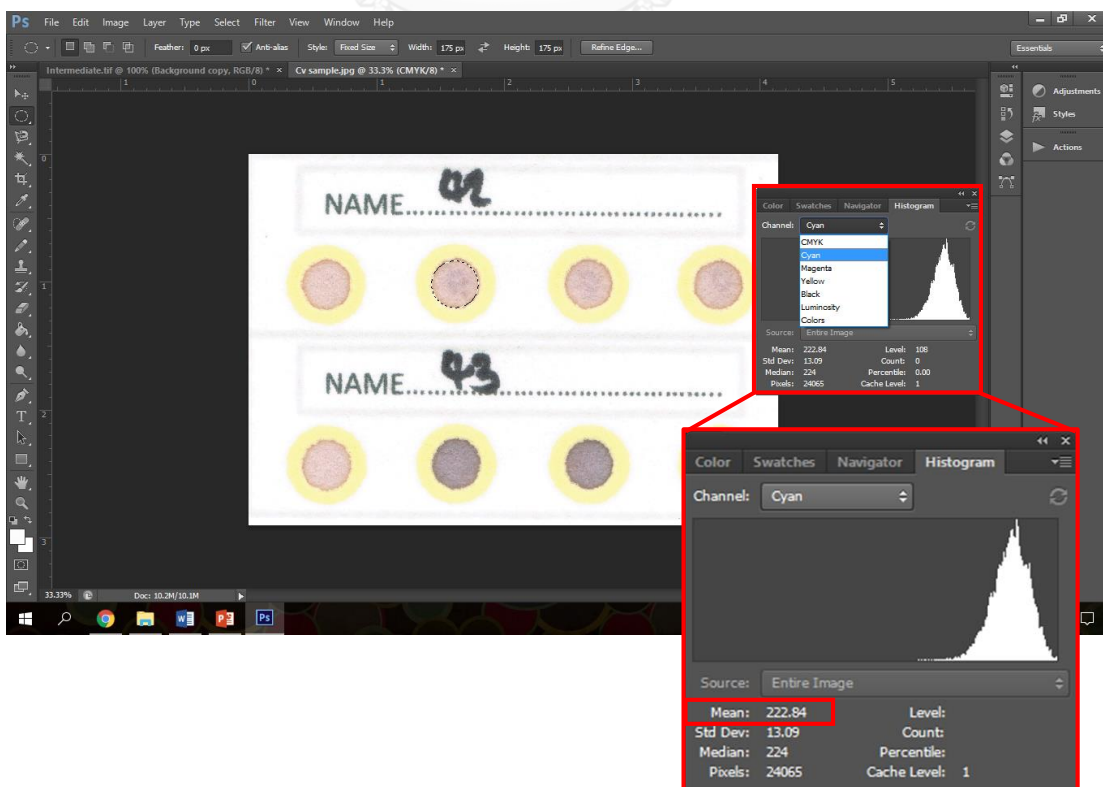
3.2 การกำหนดเครื่องมือที่ใช้สำหรับการวัดความเข้มสี: เลือก elliptical marquee tools (แถบเครื่องมือ) > ที่แถบคุณสมบัติ แก้ไข style จาก normal เป็น fixed size > กำหนดขนาด 175 x 175



3.3 การเปลี่ยนระบบสีของภาพเป็น CMYK: image > mode > CMYK color > ok (ซึ่งจะสังเกตเห็นลักษณะของสีที่เปลี่ยนไปในหน้าต่าง histogram)



3.3 การเลือกช่องสีในการวัดความเข้มสี: ใช้เครื่องมือ elliptical marquee tool ครอบคลุมพื้นที่ปฏิกริยา > ที่หน้าต่าง histogram เปลี่ยน channel เป็น cyan > บันทึกค่า mean

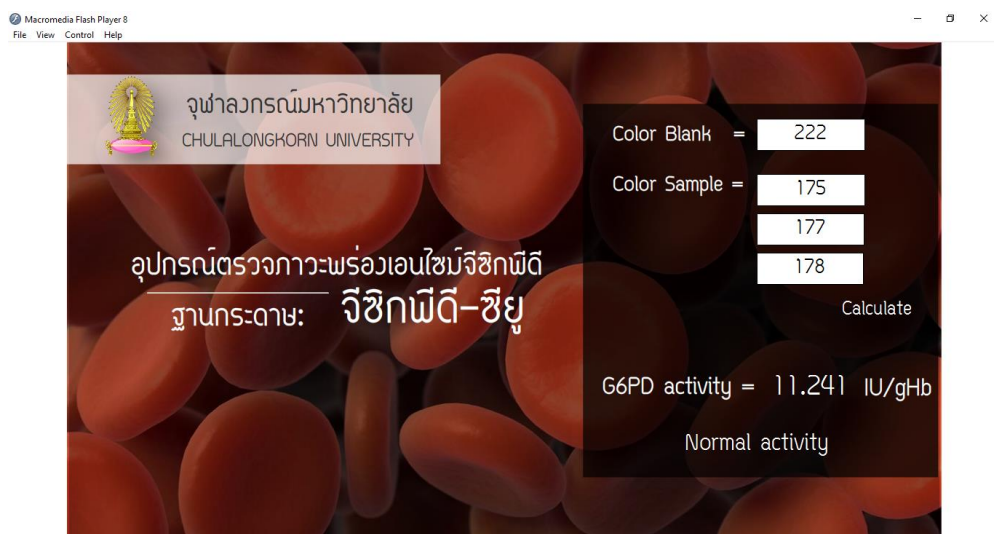


4. การใช้โปรแกรม G6PD CalColor.exe

โปรแกรม G6PD CalColor ผู้วิจัยได้เขียนโปรแกรมนี้ขึ้นจากโปรแกรม Macromedia FLASH Professional 8 เพื่ออำนวยความสะดวกในการใช้งาน ในการแปลงผลความเข้มสีเป็นระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีพร้อมทั้งสามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างตามมาตรฐานองค์การอนามัยโลก (World Health Organization – WHO)



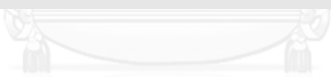
- 1) ทำการกรอกตัวเลขของระดับความเข้มสีที่ได้จากโปรแกรม Adobe Photoshop CS6 ทั้งสี่ช่อง
- 2) กด calculate
- 3) โปรแกรมจะแสดงระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดี พร้อมทั้งระบุกลุ่มจีซิกพีดีของตัวอย่าง



หลักการทํางาน

ณ ปุ่ม calculate จะมีรหัสที่ทำการรับค่าตัวเลขจากทั้ง 4 ช่องที่กรอกมาคำนวณค่าความเข้มสีของตัวอย่าง และนำลงสมการมาตรฐานเพื่อทำการแปลงผลเป็นระดับการทํางานของเอนไซม์จีซิกพีดี

```
on(release, keyPress "<Enter>"){
  a = Number(B.text);
  b = Number(S1.text);
  c = Number(S2.text);
  d = Number(S3.text);
  e = ((a-b)+(a-c)+(a-d))/3;
  f = (0.306*e)-2.631;
  R.text = f ;
  if(f<=1.15){i.text="Severely deficient";}
  else{if(f<=6.88){i.text="Moderately deficient";}
  else{if(f<=17.20){i.text="Normal activity";}
  else{i.text="increase activity";}}}}
```



ภาคผนวก ค
เอกสารที่เกี่ยวข้อง

1. ใบรับรองจริยธรรมการทำวิจัยในมนุษย์ของการศึกษาวิจัยนี้ เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยเรื่อง “ความสัมพันธ์ของไมโครพาคีเคิลในภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีและพาหะธาลัสซีเมียในผู้ป่วยจากโลหิตและปฏิกิริยาไม่พึงประสงค์จากการให้เลือด” รหัส Si 395/2016

<p>2 ถนนวิภาวดี บางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700</p>		<p>โทร +66 2419 2667-72 โทรสาร +66 2411 0162</p>
<p>คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล เอกสารรับรองโครงการวิจัย</p>		
<p>หมายเลข Si 395/2016</p>		
<p>ชื่อโครงการภาษาไทย : ความสัมพันธ์ของไมโครพาคีเคิลในภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีและพาหะธาลัสซีเมียในผู้ป่วยจากโลหิตและปฏิกิริยาไม่พึงประสงค์จากการให้เลือด</p>		
<p>รหัสโครงการ : 259/2559(EC1)</p>		
<p>หัวหน้าโครงการ / หน่วยงานที่สังกัด : อ. พญ.กุลวรา กิตติสารเศ / ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล</p>		
<p>สถานที่ทำวิจัย : คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล</p>		
<p>เอกสารที่รับรอง :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. แบบขอรับการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล 2. โครงร่างการวิจัย 3. แบบบันทึกข้อมูล 4. ประวัติผู้วิจัย 		
<p>วันที่รับรอง : 20 มิถุนายน 2559</p>		
<p>วันหมดอายุ : 19 มิถุนายน 2560</p>		
<p>คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ดำเนินการให้การรับรองโครงการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในคนที่เป็นสากล ได้แก่ Declaration of Helsinki, the Belmont Report, CIOMS Guidelines และ the International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP)</p>		
<p>ลงนาม (ศาสตราจารย์ นายแพทย์ชัยรัตน์ ฉายากุล) ประธานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน</p>	<p>27 ส.ย. ๒๕๕๙ วันที่</p>	
<p>ลงนาม (ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ประสิทธิ์ วัฒนาภา) คณบดี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล</p>	<p>27 ส.ย. ๒๕๕๙ วันที่</p>	
<p><small>หน้า 1 / 2</small></p>		

2 WANGLANG Rd. BANGKOKNOI
BANGKOK 10700



Tel. +66 2419 2667

Fax. +66 2411 0163

Siriraj Institutional Review Board

Certificate of Approval

COA no. Si 395/2016

Protocol Title : Microparticle in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and thalassemia carrier in blood donors and transfusion reaction

Protocol number : 259/2559(EC1)

Principal Investigator/Affiliation : Dr.Kulvara Kittisares, M.D. / Department of Transfusion Medicine
Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University

Research site : Faculty of Medicine Siriraj Hospital

Approval includes :

1. SIRB submission form
2. Proposal
3. Case record form
4. Curriculum vitae

Approval date : June 20, 2016

Expired date : June 19, 2017

This is to certify that Siriraj Institutional Review Board is in full compliance with international guidelines for human research protection such as the Declaration of Helsinki, the Belmont Report, CIOMS Guidelines and the International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP)

(Prof. Chairat Shayakul, M.D.)
Chairperson

27 JUN 2016

date

(Prof. Dr. Prasit Watanapa, M.D., Ph.D.)
Dean of Faculty of Medicine Siriraj Hospital

27 JUN 2016

date

Case Record Form

Specimen No. _____

Microparticle in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and thalassemia carrier in blood donors and transfusion reaction

Donation

Donation date	Collection Date	Sex M / F	Age	yr
---------------	-----------------	-----------	-----	----

CBC

Hb	Hct	MCV	MCH	RBC
WBC	N % L % M % E % B %		Platelet	MPV

G6PD deficiency

MR test
Flow cytometry test
G6PD activity assay
Paper-based G6PD test
G6PD genotyping
Conclusion

Thalassemia

Hb typing	
PCR: Test	Result
Conclusion	

Microparticle

	Unit number	Day 1		Day issue/expired			
		Date	Microparticle	Issue/Exp	Date issue	Day	Microparticle
Whole blood							
PRC							
Plasma							
Platelet							

Transfusion reaction

	Date/time Transfusion	Date/ time Reaction	Symptom	Diagnosis
PRC				
Plasma				
Platelet				



2. คำขอรับสิทธิบัตร เรื่อง “อุปกรณ์ตรวจวัดภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาศหรือวัสดุดูดซึมน้ำ” เลขที่คำขอ 1601004998

ฉบับเนา

สถาบันทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University Intellectual Property Institute



สิงหาคม 2559

เรื่อง ขออนุญาตส่งเอกสารประกอบคำขอรับสิทธิบัตร ครั้งที่ 1

เรียน ผู้อำนวยการกองสิทธิบัตร

ฝ่ายรับคำขอชั้น ๓

กองสิทธิบัตร

เลขรับที่ 1601004998

วันที่ 31 ส.ค. 2559

พิศิภา

ด้วยสถาบันทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยได้รับมอบหมายจาก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ให้ดำเนินการยื่นคำขอรับสิทธิบัตร เรื่อง “อุปกรณ์ตรวจวัดภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีฐานกระดาศหรือวัสดุดูดซึมน้ำ” โดยมีข้าพเจ้า นายมงคล แก้วมหา ตัวแทนสิทธิบัตร เลขที่ 1453 เป็นผู้ดำเนินการ ซึ่งขณะนี้ระหว่างดำเนินการให้ผู้ที่เกี่ยวข้องลงนามในสัญญาโอนสิทธิในการขอรับสิทธิบัตร และหนังสือมอบอำนาจ ซึ่งถ้าเป็นอันสำเร็จเรียบร้อยแล้ว ข้าพเจ้าจึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณาอนุมัติขออนุญาตส่งเอกสารประกอบคำขอรับสิทธิบัตร ข้าพเจ้าเกรงว่าจะมีผลต่อการพิจารณาปรับจดทะเบียนของคำขอรับสิทธิบัตรฉบับนี้ได้

ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้น ข้าพเจ้าจึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณาอนุมัติขออนุญาตส่งเอกสารประกอบคำขอรับสิทธิบัตรพร้อมกับคำขอรับสิทธิบัตรด้วย จักขอบพระคุณยิ่ง

ขอแสดงความนับถือ

มงคล แก้วมหา

(นายมงคล แก้วมหา)

ผู้รับมอบอำนาจ

ตัวแทนสิทธิบัตร เลขที่ 1453

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายภูริทัต แก้วอาสา เกิดเมื่อวันที่ 2 มกราคม 2535 ที่จังหวัดระนอง สำเร็จการศึกษา ระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) เกียรตินิยมอันดับ 2 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ.2556 และได้เข้าศึกษาต่อระดับมหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตรโลhit วิทยาคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2557 โดยได้รับทุนสนับสนุนการศึกษาจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษาและทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับรางวัลการนำเสนองานวิจัยดีเด่นแบบลายลักษณ์เรื่อง “3’ untranslated region (3’ UTR): a novel marker for diagnosis of G6PD deficiency” ในงานการประชุมวิชาการ และนำเสนอผลงานวิทยานิพนธ์ระหว่างนักศึกษา-นิสิตเทคนิคการแพทย์ ธรรมศาสตร์-จุฬาฯ (ครั้งที่8) วันที่ 9 ตุลาคม 2556

ได้รับรางวัล Travel Award จากการเดินทางไปนำเสนอผลงานวิจัยด้วยวาจาเรื่อง “ Paper-based analytical device for detection of Glucose-6 - phosphate dehydrogenase deficiency” งานประชุมวิชาการ The 78th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology ที่ประเทศญี่ปุ่น วันที่ 14 ตุลาคม 2559

และผ่านการคัดเลือกเข้าร่วมจัดนิทรรศการชิงรางวัล “นักคิดสิ่งประดิษฐ์รุ่นใหม่ ประจำปี 2560” ในงานวันนักประดิษฐ์ ประจำปี 2560 ของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ระหว่างวันที่ 2 ถึง 6 กุมภาพันธ์