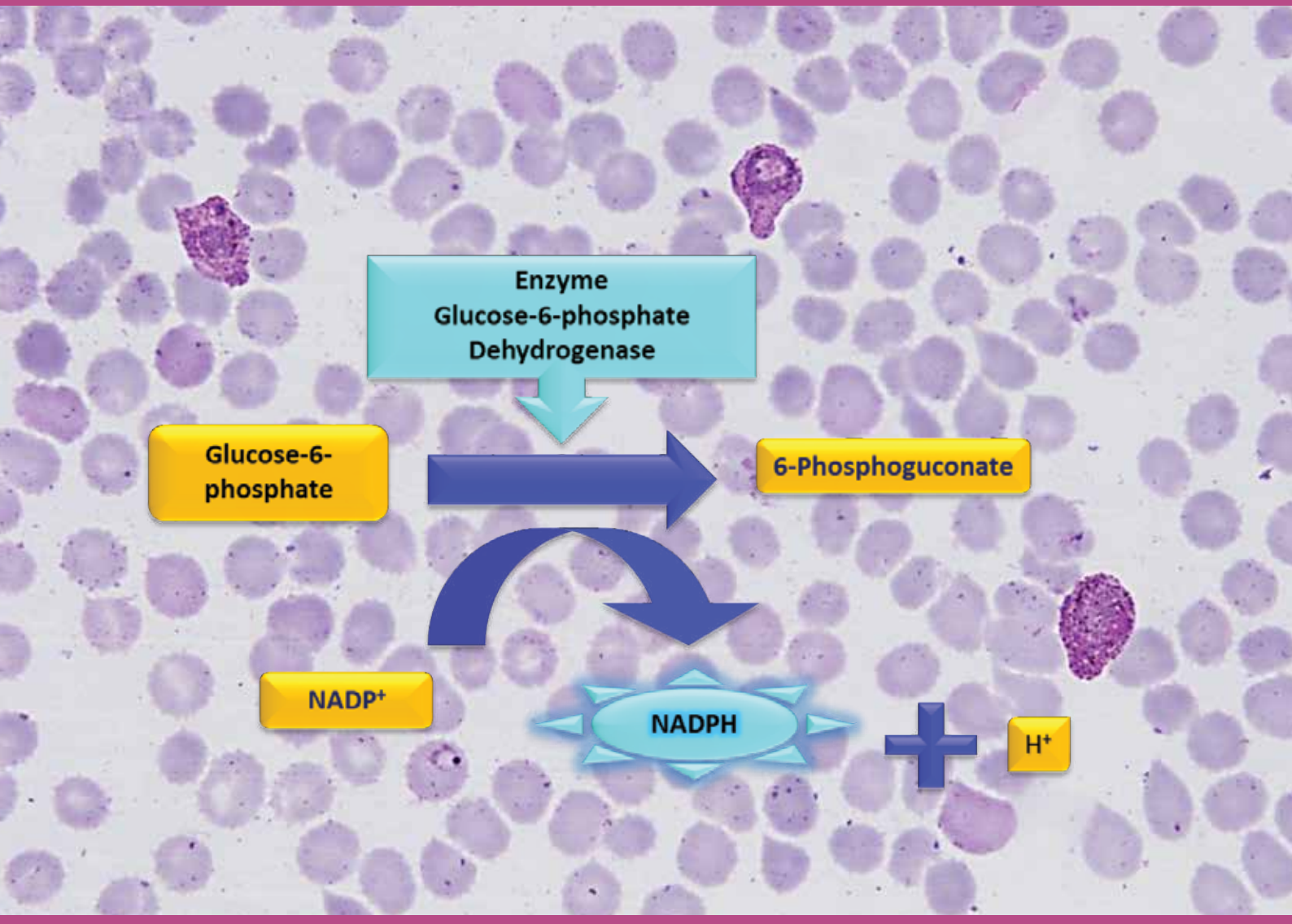
กรมควบคุมโรค
Department of Disease Control

คู่มือการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD สำหรับผู้ป่วยมาลาเรีย และการควบคุมคุณภาพ



กองโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2564

ISBN: 978-616-11-4609-2

DDC 64037

คู่มือการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD และการควบคุมคุณภาพ ได้ผ่านการตรวจประเมินและรับรองมาตรฐานผลิตภัณฑ์ เพื่อการเฝ้าระวังป้องกันควบคุมโรคและภัยสุขภาพ กรมควบคุมโรค ณ วันที่ 6 ตุลาคม 2564

Division of Vector Borne Disease, Department of Disease Control, Ministry of Public Health. Standard Operating Procedures G6PD screening test for malaria patient and Quality Control. 1st edition.; Nonthaburi: Department of Disease Control (TH); 2021.

คู่มือ

การตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD

สำหรับผู้ป่วยมาลาเรีย และการควบคุมคุณภาพ

กองโรคติดต่อนำโดยแมลง
กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข
คู่มือ การตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD สำหรับผู้ป่วยมาลาเรีย และการควบคุมคุณภาพ
ISBN : 978-616-11-4609-2

คณะที่ปรึกษา :

แพทย์หญิงชีวนันท์	เลิศพิริยสุวัฒน์
แพทย์หญิงฉันทนา	ผดุงทศ
แพทย์หญิงดารินทร์	อารีย์โชคชัย
ดร. คนึงนิจ	คงพ่วง
ศ.ดร. สาคร	พรประเสริฐ
รศ.ดร. ยุพา	เอื้อวิจิตรอรุณ

คณะผู้จัดทำ :

ดร.อังคณา	แซ่เจ็ง
นางพัชริดา	บุญเดช
นางสาววรรณา	ศรีสัจจารักษ์
นางสาวธุวาพร	สุวรรณลา
นายพลวัชร์	เรืองศิรรักษ์
นางสาวสาริณี	ศรีเทพ
นายวรเชษฐ์	คันธวังอินทร์
นายรุ่งนิรันดร์	สุขอร่าม
นางจันทร์พร	จินา

พิมพ์ครั้งที่ 1: เดือนพฤศจิกายน 2564 จำนวน 500 เล่ม
จัดพิมพ์โดย: กองโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค
กระทรวงสาธารณสุข ถนนติวานนท์ จังหวัดนนทบุรี 11000

พิมพ์ที่: บริษัท สแกนด์-มีเดีย คอร์ปอเรชั่น จำกัด
211 ซอยประเสริฐมนูกิจ 29 ถนนประเสริฐมนูกิจ แขวงจรเข้บัว เขตลาดพร้าว กทม. 10230
โทร. 02 943 7166-8

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำคู่มือการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD สำหรับผู้ป่วยมาลาเรีย และการควบคุมคุณภาพ ได้รับความร่วมมือจากคณาจารย์มหาวิทยาลัย ผู้เชี่ยวชาญมาลาเรียจากหน่วยงานที่เกี่ยวข้องทั้งในและนอกกระทรวงสาธารณสุข และคณะทำงานศูนย์อ้างอิงห้องปฏิบัติการการตรวจวินิจฉัยมาลาเรียระดับประเทศ ซึ่งมีประสบการณ์การทำงาน ได้สละเวลามาร่วมกันเขียนคู่มือวิธีการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD สำหรับผู้ป่วยมาลาเรียเล่มนี้ เพื่อนำไปใช้ในการปฏิบัติงานได้ในห้องปฏิบัติการที่ให้บริการตรวจวินิจฉัยมาลาเรีย โดยเฉพาะในงานมาลาเรียภาคสนาม

ขอขอบพระคุณ ดร.คนึงนิจ คงพ่วง ผู้เชี่ยวชาญทางด้านการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรีย ที่ให้คำแนะนำและเป็นที่ปรึกษาอย่างใกล้ชิด ตั้งแต่เริ่มจนสำเร็จ พร้อมทั้งจัดทำเป็นภาษาอังกฤษ

ขอขอบพระคุณ Dr. Maria Dorina Bustos และ Dr. Deyer Gopinath จากองค์การอนามัยโลกประจำประเทศไทย ที่สนับสนุนด้านวิชาการ คำแนะนำต่าง ๆ ตลอดจนงบประมาณ เพื่อให้คู่มือเล่มนี้สอดคล้องตามมาตรฐานที่องค์การอนามัยโลกกำหนด คู่มือเล่มนี้จะเป็นส่วนหนึ่งของการผลักดันให้การกำจัดโรคไข้มาลาเรียของประเทศไทยประสบความสำเร็จ

คู่มือแนวทางการปฏิบัติงานเล่มนี้มีเนื้อหาและขั้นตอนการปฏิบัติงานอย่างละเอียด ต้องใช้ความตั้งใจ ความสามารถ ประสบการณ์ และเวลาของทีมงานทุกท่าน รวมทั้งการสนับสนุนจากผู้เกี่ยวข้องทุกด้านตามที่กล่าวมาแล้ว จนทำให้หนังสือเล่มนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี คณะผู้จัดทำต้องขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

คณะผู้จัดทำ
ศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการ พ.ศ. 2564

คำนำ

การรักษาผู้ป่วยมาลาเรียแบบหายขาด มีความสำคัญอย่างมากที่ต้องใช้ยาเพื่อฆ่าเชื้อที่แฝงในตับ คือ ยา Primaquine หรือยา Tafenoquine ซึ่งมีผลต่อผู้ป่วยที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD โดยส่งผลให้เม็ดเลือดแดงแตกอย่างรุนแรง เกิดภาวะไตวายเฉียบพลัน และทำให้เสียชีวิตได้ ดังนั้นการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ก่อนจ่ายยารักษามาลาเรียจึงมีความสำคัญอย่างมาก แต่อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจทุกขั้นตอนจะต้องเป็นไปตามมาตรฐานกำหนด เพื่อให้มีความไว ความจำเพาะ และความถูกต้องมากที่สุด

กองโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค ได้รับความอนุเคราะห์จาก คณาจารย์มหาวิทยาลัย ผู้เชี่ยวชาญมาลาเรียจากหน่วยงานที่เกี่ยวข้องทั้งในและนอกกระทรวงสาธารณสุข คณะที่ปรึกษา คณะอนุกรรมการ และคณะทำงานศูนย์อ้างอิงห้องปฏิบัติการการตรวจวินิจฉัยมาลาเรียระดับประเทศ ซึ่งมีประสบการณ์การทำงาน และการศึกษาวิจัยด้านการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ร่วมให้ข้อคิดเห็น เสนอแนะ และจัดทำคู่มือการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD สำหรับผู้ป่วยมาลาเรีย และการควบคุมคุณภาพเล่มนี้

โดยคู่มือนี้สามารถนำไปใช้ สำหรับห้องปฏิบัติการทุกแห่ง ทั้งส่วนกลาง ส่วนภูมิภาค โรงพยาบาล รวมทั้งสถานบริการที่ให้บริการตรวจวินิจฉัยมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์

คณะผู้จัดทำหนังสือเล่มนี้หวังเป็นอย่างยิ่งว่าหนังสือนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้เกี่ยวข้องกับงานตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรีย และผู้สนใจทั่วไป

สารบัญ

บทนำ 6

การตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD
(Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase)

G6PD-SOP-01: 12

การตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD
ด้วยวิธี Qualitative fluorescent spot test ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป

G6PD-SOP-02: 16

การตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD
ด้วยวิธี Qualitative fluorescent spot test ด้วยน้ำยาที่เตรียมเอง

G6PD-SOP-03: 22

การควบคุมคุณภาพการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD
ด้วยวิธี Qualitative fluorescent spot test

G6PD-SOP-04: 25

การตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD
ด้วยวิธี STANDARD™ G6PD test (SD Biosensor)

G6PD-SOP-05: 33

การควบคุมคุณภาพการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD
ด้วยวิธี STANDARD™ G6PD test (SD Biosensor)

บทนำ

การตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD (Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase)

ความสำคัญ

กลูโคส 6 ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (glucose -6 - phosphate dehydrogenase; G6PD) เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในเซลล์ต่างๆ ของร่างกาย และเม็ดเลือดแดง มีหน้าที่สำคัญใน Hexose monophosphate shut หรืออีกชื่อหนึ่งคือ Pentose phosphate pathway (PPP) โดยทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน กลูโคส-6- ฟอสเฟต (glucose-6-phosephate, G-6-P) ให้เป็น 6 - ฟอสโฟกลูโคโนแลกโตน (6-phosphogluconolactone) และเปลี่ยน นิโคตินาไมด์ อะดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ ฟอสเฟต (nicotinamide adeninedinucleotide phosphate, NADP) ให้เป็น nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) ซึ่ง NADPH จะเปลี่ยนลูตาไธโอน glutathione ที่อยู่ในรูป ออกซิไดซ์ (glutathione disulfide, GSSG) ให้เป็น glutathione ในรูป รีดิวซ์ (GSH) ซึ่งมีฤทธิ์ทำลายอนุมูลอิสระต่างๆ ที่เป็นพิษต่อเซลล์ และป้องกันเซลล์เม็ดเลือดแดงไม่ให้ถูกทำลาย (Beutler, 1994) เนื่องจากเม็ดเลือดแดงสร้าง NADPH ได้จาก PPP เพียงแหล่งเดียว ภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD จึงมีผลต่อเม็ดเลือดแดงเด่นชัดกว่าเซลล์ในระบบอื่น ๆ ในภาวะปกติ เอนไซม์ G6PD ในเม็ดเลือดแดงจะทำหน้าที่อยู่ในระดับต่ำกว่าที่สามารถทำได้จริง เมื่อมี oxidative stress เพิ่มขึ้น เช่น ได้รับสารที่มีอนุมูลอิสระ เอนไซม์ G6PD จะเพิ่มการทำงานมากขึ้น ดังนั้น ผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD แม้จะมีเอนไซม์อยู่ในระดับต่ำกว่าคนทั่วไป ในภาวะปกติจึงมักไม่แสดงอาการ และจะแสดงอาการซีดจากเม็ดเลือดแดงแตกเมื่อมี oxidative stress มากกว่าปกติ (WHO, 1989; พิมพ์ลักษณ์ เจริญขวัญ, 2561, น. 124)

ผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD เมื่อได้รับสารอนุมูลอิสระ พบว่าเม็ดเลือดแดงไม่สามารถสร้างโคเอนไซม์ชนิด NADPH ได้ จึงทำให้อนุมูลอิสระเกิดการออกซิไดซ์ free-sulfhydryl group ที่อยู่ในฮีโมโกลบิน เป็นพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bridge) ทำให้ฮีโมโกลบินมีความสามารถในการละลายน้ำลดลง และตกตะกอนเป็น ไฮน์ บอดีย์ (heinz body) อยู่ภายในเม็ดเลือดแดงส่งผลให้เม็ดเลือดแดงแตกแบบเฉียบพลันและเกิดภาวะซีด (รูปที่ 1) ซึ่งนำไปสู่ภาวะไตวายเฉียบพลัน และมีภาวะแทรกซ้อนต่างๆ เป็นสาเหตุทำให้เสียชีวิตได้ (Cappellini & Fiorelli, 2008)

ภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD เป็นความผิดปกติที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ X-linked ซึ่งมักพบบ่อยในประชากรที่อาศัยอยู่ในบริเวณที่มีมาลาเรียเป็นโรคประจำถิ่น เช่น แอฟริกาและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยมีข้อสันนิษฐานว่า เชื้อมาลาเรียเป็นตัวกระตุ้นทำให้จีโนมของมนุษย์เกิดการกลายพันธุ์เพื่อให้ร่างกายสามารถป้องกันหรือลดความรุนแรงของการติดเชื้อได้ (Carter & Mendis, 2002) ซึ่งการกลายพันธุ์นี้สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ โดยผ่านทางโครโมโซมเพศ (X โครโมโซม) ในผู้ชายมีโครโมโซม X เพียงโครโมโซมเดียว ต่างจากเพศหญิงที่มี 2 X โครโมโซม ถ้าความผิดปกติเกิดที่โครโมโซม X เพียงโครโมโซมเดียวจะไม่แสดงอาการผิดปกติ การแสดงอาการผิดปกติมักเกิดจากมี ความผิดปกติของ X ทั้ง 2 ตัว ดังนั้นจึงพบภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ในเพศชายมากกว่าเพศหญิง

ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD และการกลายพันธุ์ของยีน G6PD ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

ประชากรในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้แต่ละประเทศมีหลายชาติพันธุ์ แต่ละชาติพันธุ์มีความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD สูง โดยเฉพาะในชายชาวเขมร ลาว ไทย พม่า มอญ ที่พบบ่อยที่สุดมี 2 ชนิด คือ ชนิดมหิดล (G6PD

Mahidol) และชนิดเวียงจันทน์ (G6PD Viangchan) การกลายพันธุ์ชนิดมหิดลพบได้มากที่สุดในกลุ่มชาติพันธุ์ที่อาศัยอยู่บริเวณฝั่งตะวันตกของคาบสมุทรอินโดจีน คือ พม่า มอญ กะเหรี่ยง ส่วนการกลายพันธุ์ชนิดเวียงจันทน์เป็น G6PD ประจำชาติพันธุ์ที่อาศัยอยู่บริเวณฝั่งตะวันออกของคาบสมุทรอินโดจีน โดยมีความชุกสูงสุดในชาวเขมร และลาว และปานกลางในชาวไทย และมาเลย์ ซึ่งอยู่ตอนกลางของคาบสมุทร และสำหรับการกลายพันธุ์ชนิดอื่นที่พบมากในชาวจีน และอินเดีย สามารถพบประปรายได้ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เช่นกัน (Nuchprayoon *et.al.*, 2008; Manucci *et.al.*, 2012) การกลายพันธุ์ชนิดที่พบได้บ่อยในคนจีนสามารถพบได้ในชาวจีนโพ้นทะเลในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ไทย สิงคโปร์ และมาเลเซีย เป็นต้นแต่มักพบในปริมาณที่ไม่มากเมื่อเทียบกับการกลายพันธุ์ชนิดมหิดลและเวียงจันทน์ แสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ของยีน G6PD ในภูมิภาคนี้ส่วนหนึ่งมาจากบรรพบุรุษจึงทำให้พบได้ในปริมาณที่สูง แต่อีกส่วนที่พบได้ไม่มากนักได้รับอิทธิพลมาจากการอพยพของคนจีนและคนอินเดียหรือการแต่งงานระหว่างชาติพันธุ์ จึงทำให้ยีน G6PD ของประชากรในภูมิภาคนี้มีลักษณะผสมผสาน จากการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อมาลาเรียในชนเผ่ากะเหรี่ยงที่อาศัยอยู่บริเวณชายแดนไทยและพม่าในจังหวัดราชบุรี พบว่าชนเผ่ากระเหรี่ยงมีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD สูงถึงร้อยละ 24 (louicharoen *et.al.*, 2009) และจากการศึกษาก่อนหน้านี้ในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทยพบผู้ที่มีภาวะพร่อง G6PD ร้อยละ 15.7 (Flatz *et.al.*, 1964) ถึงแม้ว่าจะมีรายงานว่าภาวะพร่อง G6PD สามารถช่วยลดความรุนแรงของการติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P.vivax* ได้ก็ตามแต่การจ่ายยา primaquine ในผู้ป่วย G6PD ที่ติดเชื้อมาลาเรีย ก็ทำให้เกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกและเป็นอันตรายต่อผู้ป่วย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการตรวจ G6PD ก่อนกินยา

อาการและอาการแสดงของภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD

ผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ส่วนใหญ่จะไม่มีอาการผิดปกติ ส่วนในรายที่มีอาการจะมาด้วยภาวะตัวเหลืองในทารกแรกเกิด (neonatal jaundice) และภาวะเม็ดเลือดแดงแตกสลายอย่างเฉียบพลัน (acute hemolytic anemia) หลังจากที่ได้รับยารักษาโรคไข้มาลาเรียด้วยยากลุ่ม 8-aminoquinoline เช่น ยา Primaquine และ Tafenoquine หรือได้รับสารหรืออาหารบางชนิด หรือเกิดภาวะที่กระตุ้นให้มีการแตกสลายของเม็ดเลือดแดง เช่น ภาวะติดเชื้อ ผู้ป่วยมีอาการซีดลงเฉียบพลัน ตัวเหลืองจากการที่มีระดับสารสีเหลือง หรือบิลิรูบิน (bilirubin) ที่เกิดจากการสลายตัวของฮีโมโกลบินในเลือด บางรายอาจพบว่ามีปัสสาวะสีน้ำตาลดำหรือสีโคล่า ซึ่งเป็นสีของฮีโมโกลบินที่ได้จากเม็ดเลือดแดงที่แตกในหลอดเลือดและถูกขับออกมาทางปัสสาวะ อาการต่างๆ มักเกิดขึ้นภายใน 24-72 ชั่วโมง ในรายที่รุนแรงอาจพบว่าปริมาณปัสสาวะออกน้อยลงจนก่อให้เกิดภาวะไตวายเฉียบพลัน (acute renal failure)

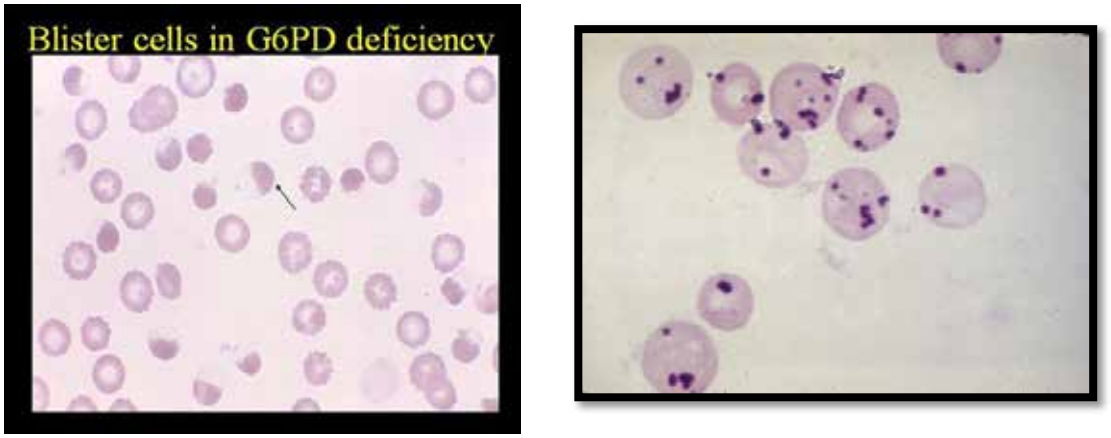
องค์การอนามัยโลกแบ่งกลุ่มระดับการพร่องเอนไซม์ G6PD แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่

1. Class I ภาวะพร่อง G6PD อย่างรุนแรง มีปริมาณ G6PD น้อยกว่าร้อยละ 10 ของปกติ ร่วมกับภาวะซีดจากเม็ดเลือดแดงแตกแบบเรื้อรัง Chronic non-spherocytic haemolytic anemia (CNSHA)
2. Class II ภาวะพร่อง G6PD อย่างรุนแรง มีปริมาณ G6PD น้อยกว่าร้อยละ 10 ของปกติ
3. Class II ภาวะพร่อง G6PD ปานกลาง มีปริมาณ G6PD ร้อยละ 10 - 60 ของปกติ
4. Class IV ภาวะ G6PD ปกติ (very mild or normal) มีปริมาณ G6PD ร้อยละ 60 - 150 ของปกติ
5. Class V ภาวะ G6PD มากกว่าปกติ Increase enzyme activity (more than twice normal)

การวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD

การตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD แพทย์จะวินิจฉัยโรคจากอาการและอาการแสดง การซักประวัติและการตรวจเสมียร์เลือดที่มีลักษณะเป็น hemighost cell, bite cell, basket cell หรือ contracted cell และมีจำนวนเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนเพิ่มขึ้น การย้อม Supravital stain อาจพบ Heinz bodies ซึ่งเป็น denatured hemoglobin ที่ตกตะกอนในเม็ดเลือดแดง (รูปที่ 1) การตรวจระดับเอนไซม์ G6PD ในช่วงที่มีเม็ดเลือดแดงแตก

และเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนมีจำนวนเพิ่มขึ้นอาจพบว่าระดับเอนไซม์เป็นปกติ เนื่องจากเม็ดเลือดแดงที่อายุมากและพร่องเอนไซม์ถูกทำลายไป มีการสร้างเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนเพิ่มขึ้นซึ่งมีระดับเอนไซม์สูงกว่า ดังนั้นการวินิจฉัยที่แน่นอนจำเป็นต้องตรวจวัดระดับเอนไซม์ในช่วงปกติที่ไม่มีภาวะเม็ดเลือดแดงแตก การตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่น พบระดับ indirect bilirubin เพิ่มขึ้น haptoglobin ลดลง และพบ hemoglobinuria (พิมพ์ลักษณ์ เจริญขวัญ, 2561, น. 124)



รูปที่ 1 ลักษณะของเม็ดเลือดแดงในภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD (A) เม็ดเลือดแดงแตกสลายในภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD (B) เม็ดเลือดแสดงที่มี Heinz bodies ในภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD Downloaded 15 สิงหาคม 2564: จาก https://s3.amazonaws.com/classconnection/980/ Flashcards /7597980/ png/heinz_bodies-14C2A0D66704D99828E.png

สำหรับการวินิจฉัยที่แน่นอนกว่าการตรวจจากอาการ และรูปร่างของเม็ดเลือดแดงในฟิล์มเลือด หรือเสมียร์เลือด คือ การตรวจโดยวิธีดังต่อไปนี้

1. การตรวจยีนพันธุกรรม (Genotyping) เป็นการตรวจที่หาการกลายพันธุ์ของยีน G6PD ในตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับการสร้างหรือผลิตเอนไซม์ G6PD การตรวจยีนพันธุกรรมไม่สามารถวัดระดับเอนไซม์ G6PD ว่ามีระดับสูงหรือต่ำ

2. การตรวจที่เกี่ยวข้องกับอาการแสดงของโรค (Phenotyping) เป็นการตรวจวัดระดับของเอนไซม์ G6PD ในเลือด ซึ่งในปัจจุบันมีวิธีการตรวจหลายวิธี ได้แก่ การตรวจวัดระดับเอนไซม์โดยตรง (Direct measurement enzyme activities) เช่น วิธี Spectrophotometry ซึ่งเป็นการวัดแบบเชิงปริมาณ และ วิธี Fluorescent spot test (FST) เป็นการวัดแบบเชิงคุณภาพ ทั้งสองวิธีนี้เป็นวิธีมาตรฐานที่นิยมใช้ นอกจากนี้ยังมีวิธีการวัดโดยอ้อม (indirect measurement) ได้แก่ การวัดระดับของ Methaemoglobin ซึ่งการวัดแบบเชิงคุณภาพ และ วิธี Cytofluorometric assay การวัดโดยอ้อมมีข้อจำกัดคือ ต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ทำได้เฉพาะในห้องปฏิบัติการ รวมทั้งต้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้นในขั้นตอนทดสอบ บางวิธีใช้เวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง วิธีการวัดโดยอ้อมจึงไม่เหมาะสมที่จะใช้ในภาคสนาม

ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีที่สามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้ โดยเฉพาะสำหรับการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ในผู้ป่วยมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ ที่มีระยะแฝงในตับ ซึ่งต้องได้รับยา Primaquine เพื่อทำลายเชื้อระยะแฝงในตับ ยา Primaquine มีผลข้างเคียงทำให้เม็ดเลือดแดงแตกในผู้ป่วยที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD วิธีการทดสอบที่สามารถนำมาใช้ในมาลาเรียคลินิกเพื่อตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ได้แก่

1. Fluorescent spot test (FST) เป็นวิธีที่ใช้กันแพร่หลายในการตรวจคัดกรองผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD โดยใช้เลือดครบส่วน (whole blood) หรือหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรอง (dried blood spots) เพราะเป็นวิธีทดสอบที่ง่าย รวดเร็วและราคาไม่แพง

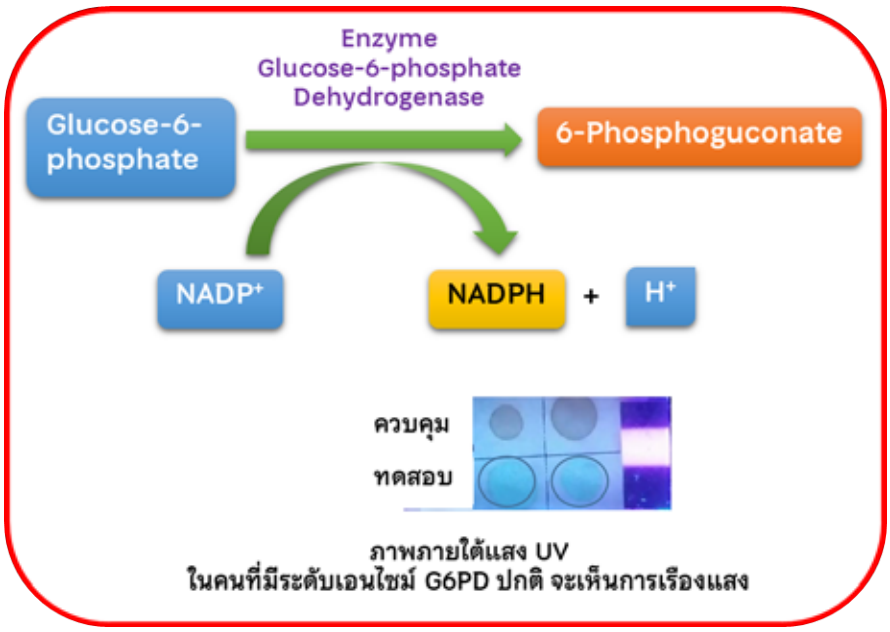
2. ชุดตรวจแบบรวดเร็ว (Rapid tests) ได้แก่ Hirono-1- methoxy PMS Sephadex method และ WST8/1-methoxy PMS method 5. Rapid, point - of - care tests ได้แก่ BinaxNow® G6PD test และ CareStart® G6PD deficiency screening test ชุดตรวจแบบรวดเร็ว ได้ถูกนำมาใช้ในพื้นที่ ในหลายๆ ประเทศ รวมทั้งประเทศไทย แต่ชุดตรวจเหล่านี้มีปัญหาการอ่านผลค่อนข้างยาก และชัดเจน จึงไม่ได้รับการพิจารณานำมาใช้งานมาลาเรียของประเทศไทย
3. Biosensor เป็นวิธีใหม่ที่ตรวจวัดระดับเอนไซม์ G6PD แบบเชิงปริมาณ เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาล สำหรับการนำไปงานในภาคสนามจริงยังอยู่ในระหว่างการศึกษาวิจัย

คู่มือเล่มนี้รวมรวบวิธีการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ที่สามารถนำมาใช้ในภาคสนามสำหรับประกอบการพิจารณาให้ยารักษาผู้ป่วยมาลาเรียที่มาลาเรียคลินิกในชุมชน ประกอบด้วย 2 วิธีการหลัก คือวิธี Fluorescent spot test และวิธี Biosensor

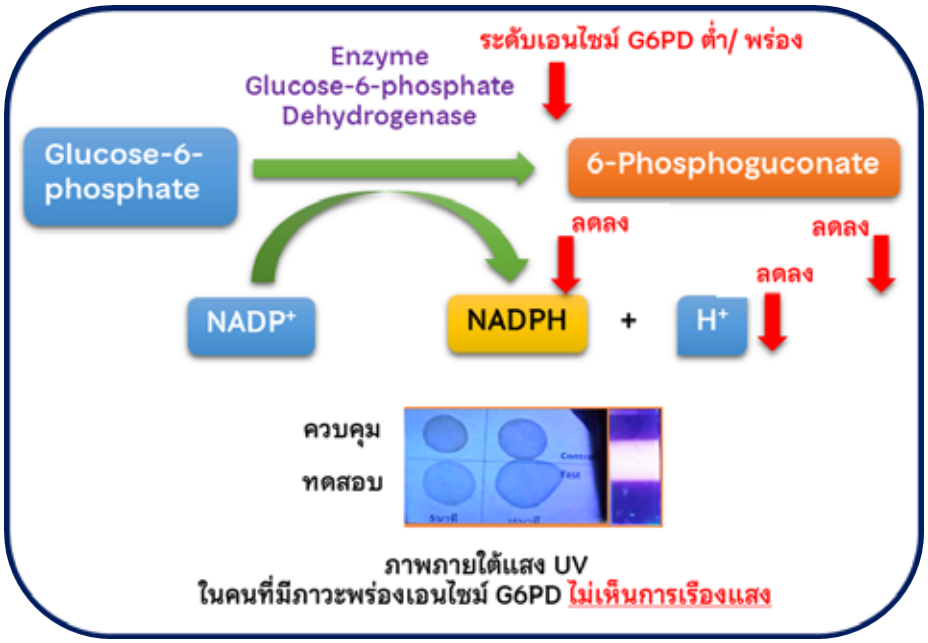
1. การตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธี Fluorescent spot test

หลักการ

เอนไซม์ G6PD เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ glucose-6-phosphate (G-6-P) ให้เปลี่ยนไปเป็น 6-phosphogluconate และรีดิวซ์ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) ให้เป็นรีดิวซ์ฟอร์มของ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) ดังแสดงรูปที่ 2 และ 3 NADPH ที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนกับ G6PD activity สามารถตรวจวัดปริมาณของ NADPH โดยอาศัยคุณสมบัติของ NADPH ในการเรืองแสงสีฟ้าที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตรเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงเหนือม่วง (ultraviolet light) ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร หากหยดเลือดเรืองแสงแสดงว่าเอนไซม์ G6PD ทำงานได้เป็นปกติ แต่หากไม่มีการเรืองแสงแสดงว่าตัวอย่างเลือดนั้นพร่องเอนไซม์ G6PD



รูปที่ 2 การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของกลูโคสซิกฟอสเฟส (G-6-P) ในตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ในคนปกติ



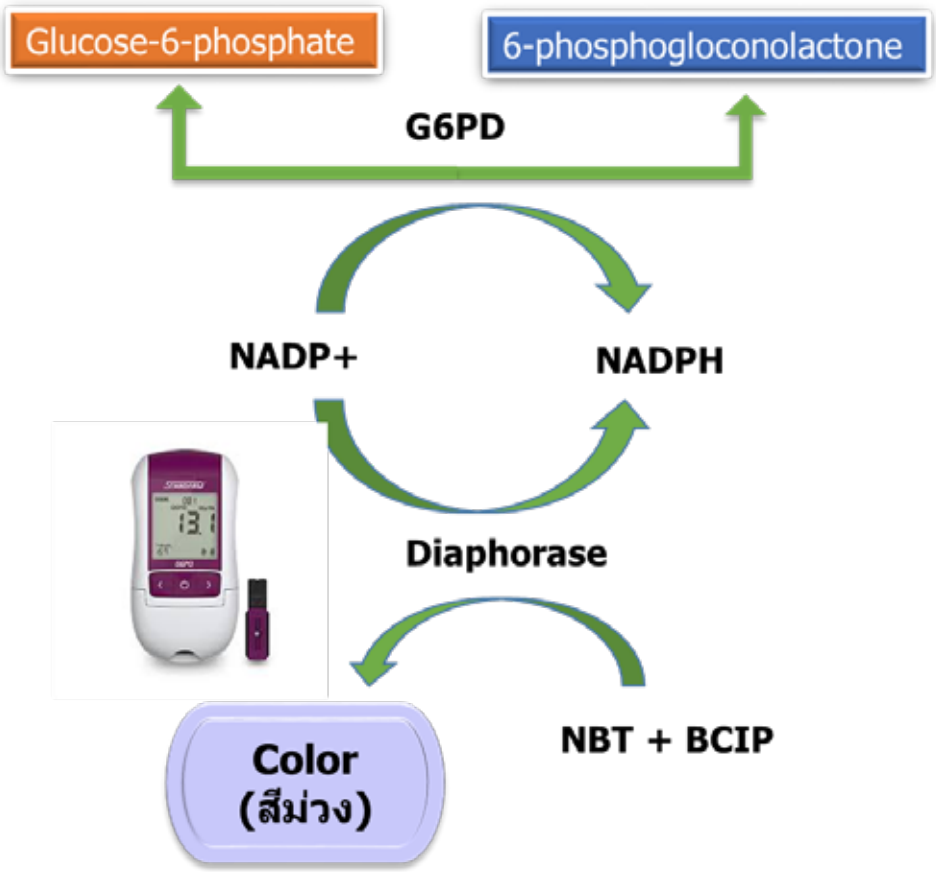
รูปที่ 3 การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของกลูโคสซิกฟอสเฟส (G-6-P) ในตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ในคนที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ มีระดับเอนไซม์ต่ำ ทำให้ปริมาณ NADPH ที่เกิดขึ้นลดลง การเรืองแสงน้อยลงจนไม่สามารถตรวจเห็นการเรืองแสงได้ สำหรับผู้ที่พร่องบางส่วนจะมีระดับเอนไซม์ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาและมีปริมาณ NADPH ที่เกิดขึ้นอาจทำให้เห็นการเองแสงขึ้นจางๆ การอ่านผล และแปลผลทำได้ยากขึ้น

2. การตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธี Biosensor

หลักการ

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ glucose-6-phosphate (G6P) ให้เปลี่ยนไปเป็น 6-phosphogluconate และรีดิวซ์ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) ให้เป็นรีดิวซ์ฟอร์มของ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) NADPH ที่เกิดขึ้น เมื่อทำปฏิกิริยากับ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) และ nitro blue tetrazolium (NBT) โดยปฏิกิริยา diaphorase reaction จะเกิดสีม่วง ดังรูปที่ 4 ความเข้มของสีที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ G6PD activity

SD Biosensor STANDARD™ G6PD test ถูกออกแบบมาให้วัดความเข้มของสีม่วงที่เกิดขึ้นในเชิงปริมาณ โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า G6PD Analyzer และใช้ Code Chip ที่จำเพาะสำหรับแต่ละรอบของการผลิตชุดทดสอบ เครื่อง G6PD Analyzer จะประมวลผลการทดสอบและแสดงค่า G6PD activity และค่าฮีโมโกลบิน สำหรับการแสดงค่า G6PD activity จะเป็นค่าที่เทียบกับปริมาณของฮีโมโกลบิน (Hb) และแสดงผลเป็น G6PD enzymatic activity ต่อ Hb 1 กรัม (U/g Hb)



รูปที่ 4: ปฏิกิริยาในการทดสอบด้วยวิธี SD Biosensor STANDARD G6PD test

การตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD
วิธี Qualitative fluorescent spot test ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป

G6PD-SOP-01

1. วัตถุประสงค์

เพื่ออธิบายขั้นตอนการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธี Qualitative fluorescent spot test ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป “G6PD screening kit for dried blood spots & whole blood samples” ของ R&D Diagnostics Ltd., Greece

2. หลักการและเหตุผล

การตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ที่เป็นวิธีมาตรฐานคือ fluorescent spot test (FST) ซึ่งได้รับการรับรองจาก The International Committee of Standardization in Hematology (ICSH) (Nadarajan *et al*., 2011) วิธีนี้มีความถูกต้องแม่นยำสูงทำได้ง่ายสะดวกและรวดเร็วมีความไวและความจำเพาะร้อยละ 92 -100 และ 98 ตามลำดับ (Jiang *et al*., 2003) ในปัจจุบันมีหลายบริษัทที่ผลิตเป็นน้ำยาสำเร็จรูปในรูปแบบแห้ง นำมาผสมกับน้ำกลั่นตามวิธีการขั้นตอนที่บริษัทผู้ผลิตกำหนดไว้ ก็สามารถใช้งานได้ทันที ในเอกสารนี้เป็นตัวอย่างของน้ำยาที่กองโรคติดต่อนำโดยแมลงเคยใช้ทดสอบแล้วในภาคสนาม ของ ของ R&D Diagnostics Ltd., Greece

3. วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. ชุดตรวจ “Screening kit for dried blood spots & whole blood samples” ของ R&D Diagnostics Ltd., Greece, Catalog No.: SQMMR500 & SQMMR 1250 ประกอบด้วย
   1.1 กระดาษกรอง Gurthie Test Paper, Schleicher & Schuell No. 2992
   1.2 น้ำยาทดสอบ มีส่วนประกอบดังนี้
      - Glucose-6-phosphate 1 mmol/L
      - NADP 0.75 mmol/L
      - GSSG (oxidized glutathione) 0.8 mmol/L
      - Saponin 0.2%
      - Tris (hydroxymethyl)-aminomethane 225 mmol/L, pH 7.8
2. ไมโครปิเปต
3. ไปเปตทิป
4. นาฬิกาจับเวลา
5. 1.5 mL Eppendorf tubes หรือหลอดพลาสติกที่มีคุณสมบัติใกล้เคียง
6. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)
7. Long-wave UV-lamp (365 nm)

4. ข้อควรระวังเพื่อความปลอดภัย

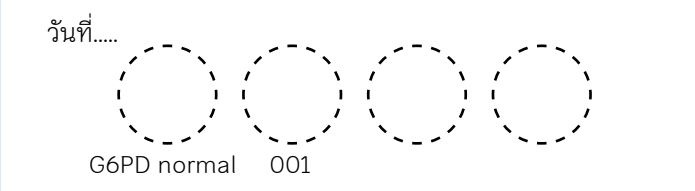
- ปฏิบัติตามข้อกำหนดการควบคุมการแพร่กระจายเชื้อตามหลักสากล ประกอบด้วย สวมใส่อุปกรณ์ป้องกันอันตรายส่วนบุคคลในการปฏิบัติงานทุกครั้ง ได้แก่ ถุงมือ แว่นตานิรภัย หน้ากากอนามัย และเสื้อกาวน์
- น้ำยาทดสอบมีสารกันเสีย sodium azide อยู่ด้วย ระวังไม่ให้น้ำยาทดสอบเข้าปาก หรือสัมผัสผิวหนังและเยื่อเมือกต่าง ๆ ของร่างกาย

5. วิธีการ

5.1 การเก็บเลือดเพื่อใช้ทดสอบ

เลือดที่จะใช้ทดสอบอาจเป็นเลือดที่เจาะจากปลายนิ้วหรือเลือดที่เจาะจากหลอดเลือดดำที่ใส่สารกันเลือดแข็ง heparin, citrate, oxalate หรือ EDTA

1. เลือดที่เจาะจากปลายนิ้ว การเก็บตัวอย่างเลือดมีวิธีการดังนี้
   - เขียนชื่อผู้ป่วยและวัน เดือน ปี ที่ทำ dried blood spot บนกระดาษกรอง
   - หยดเลือดจากปลายนิ้วลงบนกระดาษกรอง ดังรูปที่ 1 รอให้เลือดแห้งที่อุณหภูมิห้อง
   - เลือดที่เก็บบนกระดาษกรองควรรีบดำเนินการตรวจทันที แต่ถ้าไม่สามารถดำเนินการได้ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องที่ไม่ร้อนเกินไป ประมาณ 25^{0}C ถึง 30^{0}C ได้นาน 3 วัน
   - หากไม่สามารถทดสอบได้ทันที ให้เก็บเลือดในตู้เย็นอุณหภูมิ 2^{0}C ถึง 4^{0}C เก็บได้นาน 7 วัน
   - ห้ามแช่เลือดในช่องแช่แข็ง ที่อุณหภูมิติดลบ เช่น -4^{0}C หรือ - 20^{0}C ค่าเอนไซม์ activity จะลดลง



รูปที่ 1: กระดาษกรองสำหรับเก็บหยดเลือดแห้ง (dried blood spot)

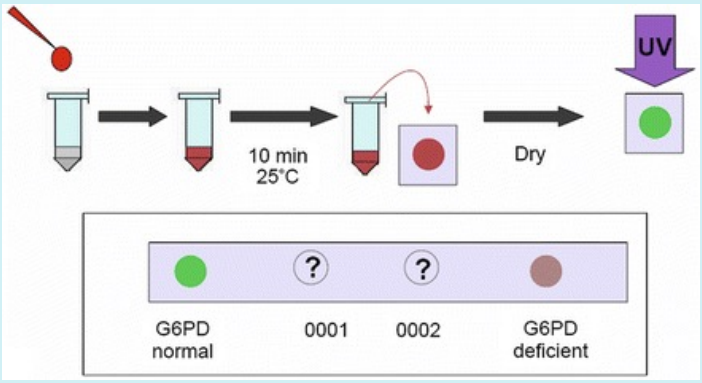
2. เลือดจากหลอดเลือดดำที่ใส่สารกันเลือดแข็ง ให้นำไปทดสอบได้เลยไม่ต้องหยดใส่กระดาษกรอง หากไม่สามารถทดสอบได้ทันที ให้เก็บเลือดในตู้เย็นอุณหภูมิ 2^{0}C ถึง 4^{0}C ได้นานถึง 7 วัน ไม่แนะนำให้แช่เลือดในช่องแช่แข็ง ที่ติดลบ เช่น -4^{0}C หรือ -20^{0}C เนื่องจากค่าเอนไซม์ activity จะลดลง

5.2 การเตรียมน้ำยาตรวจ G6PD สำหรับใช้ทดสอบ จากน้ำยาสำเร็จรูป

1. นำ Dilution buffer (Reagent vial; code RD7001) ปริมาตร 5 มล ใส่ในหลอดที่เป็น freeze dried powder (code 7002) ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex mixer หรือกลับหลอดไปมาจนสารละลายเข้ากันดี
2. แบ่งน้ำยาใส่ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ (micro centrifuge tube) หรือ Eppendorf ขนาด 1.5 มล หลอดละ 100 ไมโครลิตร (µl)
3. ติดฉลากหลอด โดยเขียนชื่อสารละลาย Lot No. วันหมดอายุ และวันที่เตรียม
4. เก็บ ในตู้เย็น 4^{0}C ได้นาน 4 สัปดาห์ หรือเก็บที่ -20^{0}C ได้นาน 2 เดือน

5.3 ขั้นตอนการตรวจด้วยวิธี Fluorescent spot test

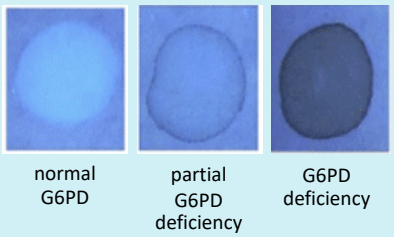
1. นำน้ำยาที่เตรียมไว้ในข้อ 5.2 จำนวน 3 หลอด เขียนฉลากที่ข้างหลอด หลอดที่ 1 เป็น normal G6PD control หลอดที่ 2 เป็นตัวอย่างเลือดผู้ป่วย และหลอดที่ 3 เป็น deficient G6PD control
2. ใช้ที่เจาะรูกระดาษขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. เจาะรูจากหยดเลือดแห้งที่เตรียมไว้ 1 ชิ้น (เลือดมีปริมาตรประมาณ 5 ไมโครลิตร) ใส่ลงในหลอดน้ำยาตามลำดับในข้อ 1 ผสมเลือดให้เข้ากับน้ำยาโดยใช้เครื่อง vortex mixer หรือเขย่าด้วยมือนาน 30 วินาที
3. ถ้าใช้เลือดที่เจาะจากหลอดเลือดดำ ให้ปิเปตเลือดปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดน้ำยา ผสมเลือดให้เข้ากับน้ำยาโดยใช้เครื่อง vortex mixer หรือเขย่าด้วยมือนาน 30 วินาที
4. ตั้งหลอดที่ใส่เลือดแล้วที่อุณหภูมิ 20^{0}C - 30^{0}C หรือที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที
5. เมื่อครบเวลา 10 นาที กลับหลอดไปมาเพื่อให้ส่วนผสมเข้ากันดี แล้วปิเปตส่วนผสมปริมาณ 10 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรองแผ่นใหม่
6. รอกระดาษกรองที่หยดส่วนผสมของเลือดไว้จนแห้ง ใช้เวลาประมาณ 10 -20 นาที จึงนำไปตรวจดูการเรืองแสงฟลูออเรสเซ้นต์ด้วย long-wave UV-lamp ใช้เวลาอย่างน้อย 30 วินาทีในการตรวจการเรืองแสง
7. normal G6PD control และตัวอย่างทดสอบที่มี G6PD ปกติจะพบมีการเรืองแสงฟลูออเรสเซ้นต์เข้ม ส่วน deficient G6PD control และตัวอย่างทดสอบที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD จะไม่พบการเรืองแสง ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2: สรุปขั้นตอนการทดสอบด้วยวิธี Fluorescent spot test (จาก Baird, J.K. 2014)

5.4 การแปลผล

1. Normal G6PD: ตัวอย่างตรวจมีการเรืองแสงฟลูออเรสเซ้นต์เข้ม (ดังรูปที่ 3)
2. Partial G6PD deficiency: ตัวอย่างเรืองแสงจาง ๆ หรือเป็นจุด ๆ
3. G6PD deficiency: ตัวอย่างตรวจไม่แสดงการเรืองแสงฟลูออเรสเซ้นต์
4. ถ้าผลการทดสอบเป็น partial G6PD deficiency ให้ทำการทดสอบซ้ำ และตรวจยืนยันด้วยวิธี Quantitative Biosensor หรือส่งตรวจยืนยันที่ ศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการโรคติดต่อนำโดยแมลง หรือ ห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลที่มีการตรวจด้วยวิธี Quantitative G6PD testing



รูปที่ 3: การแปลผลการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธี Fluorescent spot test

6. ข้อควรระวังที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการปฏิบัติงาน

- ทิ้งขยะติดเชื้อทั้งหมดในถุงขยะติดเชื้อ เข็มเจาะเลือดทิ้งในภาชนะทิ้งขยะติดเชื้อมีคม ดูรายละเอียดใน MM-SOP-14: การจัดการขยะที่เกิดจากการตรวจวินิจฉัยโรคไข้มาลาเรีย

7. แบบฟอร์มรายงานที่เกี่ยวข้อง

- แบบรายงานผลการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ดูภาคผนวกที่ 1
- แบบบันทึกข้อมูลการควบคุมคุณภาพการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธี FST ดูภาคผนวกที่ 2

8. การควบคุมคุณภาพ

- ดูรายละเอียดใน G6PD-SOP-03: การควบคุมคุณภาพการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธี Fluorescent spot test

9. เอกสารมาตรฐานการปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้อง

- MM-SOP-06A: การเจาะเก็บเลือดจากปลายนิ้วและการเตรียมฟิล์มหนาและบาง
- MM-SOP-06B: การเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำและการเตรียมฟิล์มหนาและบางจากเลือดในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็ง
- MM-SOP-14: การจัดการขยะที่เกิดจากการตรวจวินิจฉัยโรคไข้มาลาเรีย

การตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD
วิธี Qualitative fluorescent spot test ด้วยน้ำยาที่เตรียมเอง

G6PD-SOP-02

1. วัตถุประสงค์

เพื่ออธิบายขั้นตอนการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธี Qualitative fluorescent spot test ด้วยน้ำยาที่เตรียมเองโดยศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการโรคติดต่อนำโดยแมลง หรือห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 1 - 12

2. หลักการและเหตุผล

การตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD โดยวิธี Fluorescent Spot Test โดยเตรียมน้ำยาสำหรับตรวจเองจากสารตั้งต้นนี้ อ้างอิงจาก อำพร ไตรภัทร และคณะนี้ได้ทำการดัดแปลงวิธีการตรวจ Fluorescent Spot Test โดยดัดแปลงจากวิธีของ Beutler1966 และ Dow และคณะ 1974 และได้ถูกนำมาใช้อ้างอิงในการปฏิบัติงานในคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และนำมาพัฒนา เพื่อนำไปใช้ในพื้นที่ สำหรับงานในมาลาเรียคลินิกและงานศึกษาวิจัยหาความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD จังหวัดแม่ฮ่องสอนโดยสำนักงานป้องกันควบคุมโรค

3. วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. KH2PO4 เป็นสารเคมีชนิดผง AR grade
2. K2HPO4 เป็นสารเคมีชนิดผง AR grade
3. Saponin S4521 เป็นสารเคมีชนิดผง AR grade
4. D-Glucose 6-phosphate เป็นสารเคมีชนิดของเหลว AR grade
5. Beta-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrate (β-NADP) เป็นสารเคมีชนิดผง AR grade
6. 0.1 N HCl
7. 0.1 N NaOH
8. Filter paper เป็นกระดาษกรองชนิด Standard grade เส้นผ่าศูนย์กลาง 7 ซ.ม. อัตราการไหลผ่าน (flow rate) เป็นแบบ Medium flow เช่น Whatman no. 1
9. หลอดใส่สาร เป็นหลอด micro centrifuge tube หรือ Eppendorf tubes ขนาด 1.5 มล. หรือหลอดพลาสติกที่มีคุณสมบัติใกล้เคียง
10. ไมโครปิเปตขนาด 10 - 200 ไมโครลิตร
11. ไปเปตทิป (pipette tip) ขนาด 20 - 200 ไมโครลิตร
12. Loop เขี่ยเชื้อพลาสติก ขนาด 10 ไมโครลิตร
13. หลอดหยดพลาสติก ขนาด 0.2 ไมโครลิตร
14. นาฬิกาจับเวลา
15. กล่องไฟยูวี สำหรับการอ่านผล (UV Box with Long-wave UV-lamp 365 nm)
16. pH meter

4. ข้อควรระวังเพื่อความปลอดภัย

- ปฏิบัติตามข้อกำหนดการควบคุมการแพร่กระจายเชื้อตามหลักสากล ประกอบด้วย สวมใส่อุปกรณ์ป้องกันอันตรายส่วนบุคคลในการปฏิบัติงานทุกครั้ง ได้แก่ ถุงมือ แว่นตานิรภัย หน้ากากอนามัย และเสื้อกาวน์

5. วิธีการ

5.1 การเตรียมน้ำยาสำหรับใช้ทดสอบ

1. การเตรียมน้ำยาเริ่มต้น

- 10 mM glucose-6-phosphate
  - สารละลาย glucose-6-phosphate (1.14 M) 88 µL
  - น้ำกลั่น 10 mL
- 7.5 mM NADP
  - NADP 0.06 gram
  - น้ำกลั่น 10 mL
- 7.5 mM NADP
  - NADP 0.06 gram
  - น้ำกลั่น 10 mL
- 1% (w/v) Saponin
  - Saponin 0.5 gram
  - น้ำกลั่น 50 mL
- 0.25 M Potassium phosphate buffer pH 7.4
  - Solution A: 0.5 M KH_2PO_4
    - KH_2PO_4 6.8 gram
    - น้ำกลั่น 100 mL
  - Solution B: 0.5 M K_2HPO_4
    - K_2HPO_4 11.4 gram
    - น้ำกลั่น 100 mL

เตรียม 0.25 M Potassium phosphate buffer pH 7.4 โดย ผสม Solution A จำนวน 19 mL และ Solution B จำนวน 81 mL ให้เข้ากัน ปรับให้ได้ pH 7.4 ด้วย 0.1 N HCl หรือ 0.1 N NaOH จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปอีก 100 mL ผสมให้เข้ากัน

2. การเตรียมน้ำยาสำหรับหลอดทดสอบ (reaction mixture for test) 10 ml

- 10 mM glucose-6-phosphate 1 mL
- 7.5 mM NADP 1 mL
- 1% (w/v) Saponin 2 mL
- 0.25 M Potassium phosphate buffer pH 7.4 3 mL
- น้ำกลั่น 3 mL

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่หลอด vial ขนาด 1.5 ml หลอดละ 200 ไมโครลิตร ส่วนผสมนี้สามารถเก็บได้นาน 3 เดือน ที่อุณหภูมิ -20^{0}C

3. การเตรียมน้ำยาสำหรับหลอดควบคุม (reaction mixture for control) 10 ml

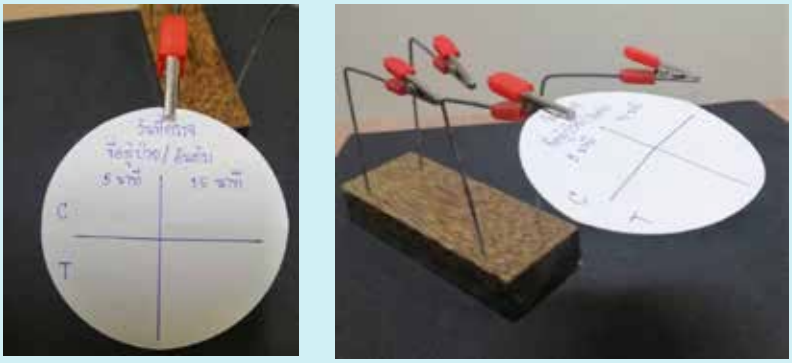
- 10 mM glucose-6-phosphate 1 mL
- 1% (w/v) Saponin 2 mL
- 0.25 M Potassium phosphate buffer pH 7.4 3 mL
- น้ำกลั่น 4 mL

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่หลอด vial ขนาด 1.5 ml หลอดละ 200 ไมโครลิตร ส่วนผสมนี้สามารถเก็บได้นาน 3 เดือน ที่อุณหภูมิ -20^{0}C และเก็บได้นาน 1 เดือนที่อุณหภูมิ 4^{0}C

5.4 ขั้นตอนการตรวจด้วยวิธี Fluorescent spot test

วิธีการทดสอบ G6PD สำหรับที่ปรับให้สามารถทำการทดสอบได้ที่ มาลาเรียคลินิก / มาลาเรียคลินิกชุมชน

1. นำหลอดใส่สารตรวจ G6PD ซึ่งมีน้ำยา reaction mixture for test หลอดทดสอบ (T) มีปริมาตร 200 µl และ reaction mixture for control หลอดควบคุม (C) มีปริมาตร 200 ไมโครลิตร ออกจากตู้เย็น วางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 - 2 นาที เพื่อให้ละลายและมีอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง
2. ในกรณีที่เจาะเลือดจากปลายนิ้ว จะใช้ loop ขนาด 10 ไมโครลิตร แตะที่หยดเลือด ให้เต็ม loop ใส่ในหลอด control และหลอด test หลอดละ 1 loop (คนไข้ 1 ราย จะ ใช้ 2 loop) แต่ถ้าเป็นเลือดที่เจาะจากเส้นเลือด ใส่สารกันเลือดแข็งเช่น EDTA หรือ heparin ให้ใช้ไมโครปิเปต ดูดเลือดใส่ในหลอด control และ test หลอดละ 10 ไมโครลิตร
3. ผสมเลือดและน้ำยาให้เข้ากัน โดยปิดฝาหลอด แล้วพลิกกลับหลอดไปมา หรือจะใช้วิธีดีดที่ก้นหลอด เพื่อผสมเลือดกับน้ำยา ระวังอย่าให้มีฟอง
4. เริ่มจับเวลาทันทีเมื่อผสมเสร็จ
5. ในระหว่างรอจับเวลาให้เตรียมกระดาษกรองที่จะหยดส่วนผสมของเลือดกับน้ำยาเพื่ออ่านผลโดยเขียนตามรูป และให้หนีบไว้ ที่หนีบกระดาษ ตามรูปที่ 1



รูปที่ 1 การเตรียมกระดาษกรองสำหรับหยดส่วนผสมของเลือดเพื่ออ่านผล

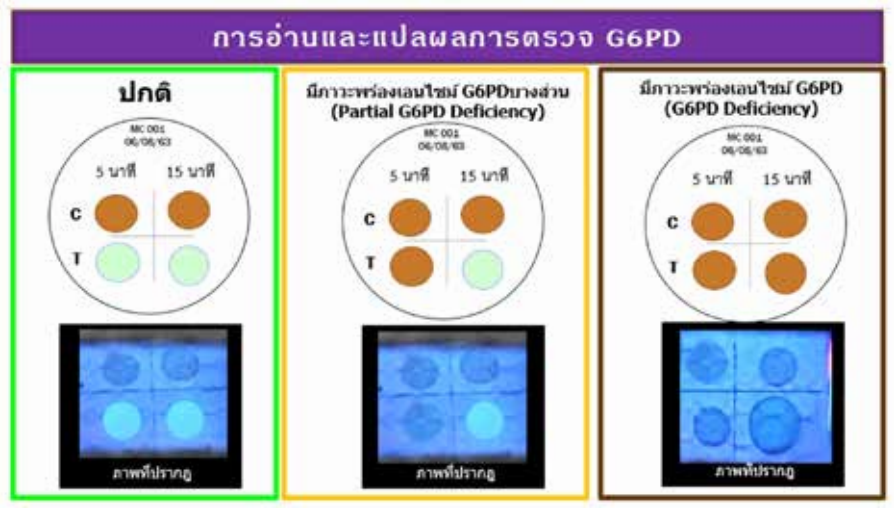
6. เมื่อครบ 5 นาที ให้ดูดเลือดที่ผสมกับน้ำยาในแต่ละหลอด จำนวนหลอดละประมาณ 10 µL หยดลงบนกระดาษกรองที่เตรียมไว้ตำแหน่งที่ 5 นาที ตามรูปที่ 1 ให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 - 2 ซม ในกรณีที่ใช้หลอดหยดขนาด 0.2 มิลลิลิตร (ขนาดเล็ก) ให้ดูดส่วนผสมถึงขีดล่างของปลายหลอด อย่าดูดมากเกินเพราะจะทำให้ขนาดของวงใหญ่เกินและ อาจทำให้วงของตำแหน่งควบคุม กับตำแหน่งทดสอบซ้อนทับกัน

รูปที่ 2 การหยดส่วนผสมลงบนกระดาษกรองเมื่อครบตามกำหนดเวลา

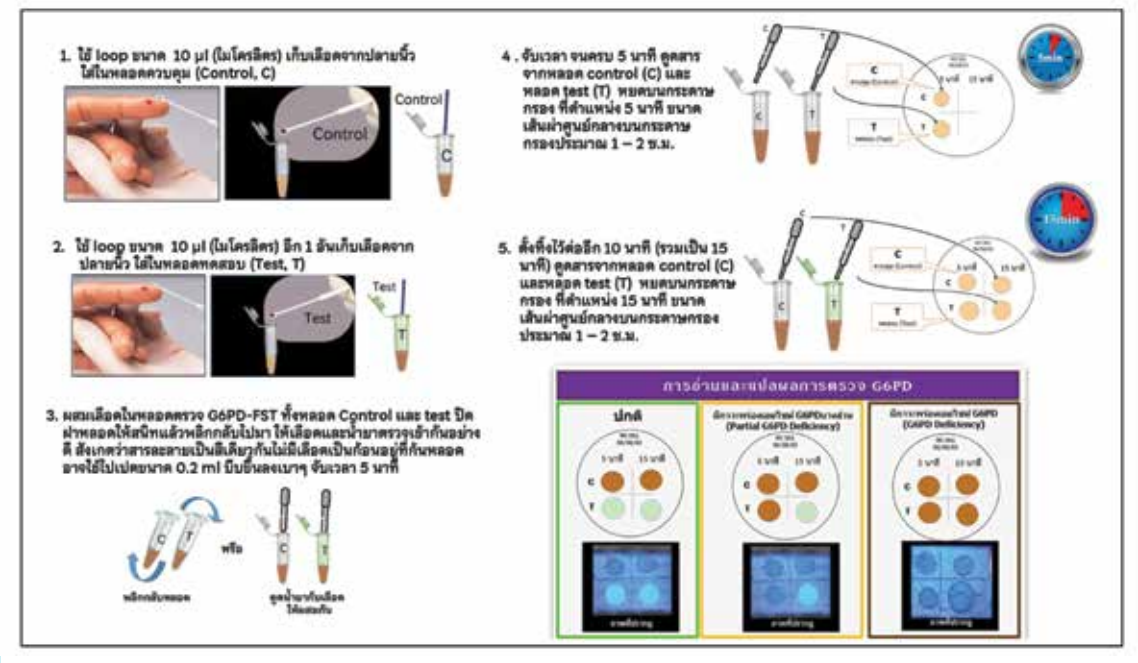
7. จับเวลาต่อไปอีก 10 นาที (เวลารวมนับจากเริ่มหยดเลือดในหลอด control และ test เป็น 15 นาที) เมื่อครบเวลาจึงดูดเลือดที่ผสมกับน้ำยาในแต่ละหลอดหยดลงบนกระดาษกรองประมาณ 10 ไมโครลิตร บนตำแหน่งที่ 10 นาที ให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของหยดประมาณ 1 - 2 ซม รอจนกระดาษกรองแห้งสนิทที่อุณหภูมิห้อง
8. เมื่อกระดาษกรองแห้งสนิทแล้วนำไปส่องดูการเรืองแสงฟลูออเรสเซ้นส์ ในกล่องทึบ UV box ที่มีหลอดไฟ long wavelength UV lamp
9. สรุปขั้นตอนการตรวจดู ในภาคผนวกที่ 1 สรุปขั้นตอนวิธีการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธี FST แบบหน้าเดียว

5.6 การแปลผล

1. ปกติ ไม่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD (Normal G6PD) : พบการเรืองแสงฟลูออเรสเซ้นต์ ทั้งที่ตำแหน่งหยดส่วนผสมของเลือดที่เวลา 5 นาที และเวลา 15 นาที ดังรูปที่ 3
2. มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD บางส่วน (Partial G6PD deficiency): ไม่การเรืองแสงฟลูออเรสเซ้นต์ ที่ตำแหน่งเวลา 5 นาที แต่พบการเรื่องแสงที่ตำแหน่งเวลา 15 นาที
3. มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD (G6PD deficiency) ไม่พบการเรืองแสงฟลูออเรสเซ้นต์ ทั้งที่ตำแหน่งเวลา 5 นาที และที่ตำแหน่งเวลา 15 นาที
4. ถ้าผลการทดสอบ พบว่าที่ตำแหน่งควบคุม (Control) เรืองแสงให้ทำการทดสอบซ้ำ และถ้ายังให้ผลเหมือนเดิมให้ระบุว่าแปลผลไม่ได้ invalid ให้ส่งตรวจยืนยันที่ ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ของสำนักงานป้องกันควบคุมโรค หรือศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการโรคติดต่อนำโดยแมลง



รูปที่ 3 การแปลผลการตรวจคัดกรองด้วยวิธี Fluorescent spot test



รูปที่ 4 สรุปขั้นตอนวิธีการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธี FST (แบบหน้าเดียว)

6. ข้อควรระวังที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการปฏิบัติงาน

- ทิ้งขยะติดเชื้อทั้งหมดในถุงขยะติดเชื้อ เข็มเจาะเลือดทิ้งในภาชนะทิ้งขยะติดเชื้อมีคม ดูรายละเอียดใน MM-SOP-14: การจัดการขยะที่เกิดจากการตรวจวินิจฉัยโรคไข้มาลาเรีย

7. แบบฟอร์มรายงานที่เกี่ยวข้อง

- แบบรายงานผลการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ดูภาคผนวกที่ 1
- แบบบันทึกข้อมูลการควบคุมคุณภาพการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธี FST ดูภาคผนวกที่ 2

8. การควบคุมคุณภาพ

- ก่อนทดสอบต้องตรวจสอบวันหมดอายุของน้ำยาทุกชนิดที่ใช้
- ดูรายละเอียดใน G6PD-SOP-03: การควบคุมคุณภาพการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธี Fluorescent spot test

9. เอกสารมาตรฐานการปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้อง

- MM-SOP-06A: การเจาะเก็บเลือดจากปลายนิ้วและการเตรียมฟิล์มหนาและบาง
- MM-SOP-06B: การเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำและการเตรียมฟิล์มหนาและบางจากเลือดในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็ง
- MM-SOP-14: การจัดการขยะที่เกิดจากการตรวจวินิจฉัยโรคไข้มาลาเรีย

การควบคุมคุณภาพตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD วิธี Qualitative fluorescent spot test

G6PD-SOP-03

1. วัตถุประสงค์

เพื่ออธิบายขั้นตอนการควบคุมคุณภาพการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD และการเตรียมน้ำยาควบคุมคุณภาพ

2. หลักการและเหตุผล

การตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD เป็นการตรวจวัดระดับเอนไซม์ ซึ่งมีความไวต่ออุณหภูมิ น้ำยาที่ใช้ตรวจต้องเก็บรักษาในอุณหภูมิที่เหมาะสมตลอดเวลา ตั้งแต่การเตรียม การขนส่ง และการจัดเก็บก่อนใช้งาน การควบคุมคุณภาพตั้งแต่การตรวจสอบวันหมดอายุ จนถึงการตรวจสอบว่าน้ำยายังคงมีประสิทธิภาพในการใช้งานและให้ผลการตรวจที่ถูกต้อง จึงมีความสำคัญอย่างมากต่อผลการทดสอบ

3. วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. น้ำยาควบคุมคุณภาพ (control reagent) ควรมี control reagent อย่างน้อย 2 ระดับ คือ normal control (G6PD ปกติ) และ deficient G6PD control (พร่อง G6PD) น้ำยาควบคุมคุณภาพ
2. ไมโครปิเปต
3. ไปเปตทิป
4. Eppendorf tubes ขนาด 1.5 มล. หรือหลอดพลาสติกที่มีคุณสมบัติใกล้เคียง
5. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)
6. กล่องไฟ อ่านผล Long-wave UV-lamp (365 nm)

4. ข้อควรระวังเพื่อความปลอดภัย

- ปฏิบัติตามข้อกำหนดการควบคุมการแพร่กระจายเชื้อตามหลักสากล ประกอบด้วย สวมใส่อุปกรณ์ป้องกันอันตรายส่วนบุคคลในการปฏิบัติงานทุกครั้ง ได้แก่ ถุงมือ แว่นตานิรภัย หน้ากากอนามัย และเสื้อกาวน์

5. วิธีการ

5.1 การเตรียมน้ำยาควบคุม

นำยาที่ใช้ควบคุมมาในรูปแบบของ lyophilized form เมื่อจะใช้ให้นำมาเจือจางด้วยบัฟเฟอร์หรือน้ำกลั่นตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด ดังนี้

1. เติมกลั่นหรือน้ำปราศจากไอออน 5 มล.ในขวดใส่ละลายสารควบคุมคุณภาพที่เป็นผงแห้ง (control freeze dried powder)
2. ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนานอย่างน้อย 5 นาที
3. ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) หรือกลับหลอดไปมาจนสารละลายเข้ากันดี
4. แบ่ง control reagent ใส่หลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ (micro centrifuge tube) หรือ Eppendorf ขนาด 1.5 มล. หลอดละ 0.5 มล.
5. ติดฉลากหลอด โดยเขียนชื่อ control, Lot No., วันหมดอายุ และวันที่เตรียม
6. เก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20^{0}C แล้วนำมาใช้ตามจำนวนที่ต้องการตรวจเท่านั้น ห้ามนำมาละลายแล้วเก็บกลับเพื่อใช้ใหม่
7. เก็บสารควบคุมคุณภาพที่เตรียมที่อุณหภูมิ -20^{0}C หรือต่ำกว่า ได้นาน 2 เดือน แต่ถ้าเก็บที่ 4^{0}C มีอายุการใช้งาน 1 สัปดาห์

5.3 การทดสอบน้ำยาตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD

1. นำสารควบคุมคุณภาพ และน้ำยาตรวจ G6PD ที่เก็บไว้ออกมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 10 นาทีเพื่อให้ละลาย
2. ดำเนินการทดสอบโดยทำตามขั้นตอน G6PD-SOP-01 ถ้าต้องการทดสอบน้ำยาตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD จากน้ำยาสำเร็จ ใช้ปริมาตรของน้ำยาควบคุมเท่ากับปริมาตรเลือดที่ใช้ทดสอบ
3. ดำเนินการทดสอบโดยทำตามขั้นตอน G6PD-SOP-02 ถ้าต้องการทดสอบน้ำยาตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD จากน้ำยาที่เตรียมเอง ใช้ปริมาตรของน้ำยาควบคุมเท่ากับปริมาตรเลือดที่ใช้ทดสอบ
4. การอ่านผลจะต้องให้ผลที่สอดคล้องกับน้ำที่เตรียมไว้คือ น้ำยาควบคุมที่ระบุว่า Normal จะต้องเรืองแสง และน้ำยาควบคุมที่ระบุว่า Deficiency จะต้องไม่เรืองแสง

6. ข้อควรระวังที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการปฏิบัติงาน

- ทิ้งขยะติดเชื้อทั้งหมดในถุงขยะติดเชื้อ เข็มเจาะเลือดทิ้งในภาชนะทิ้งขยะติดเชื้อมีคม ดูรายละเอียดใน MM-SOP-14: การจัดการขยะที่เกิดจากการตรวจวินิจฉัยโรคไข้มาลาเรีย

7. แบบฟอร์มรายงานที่เกี่ยวข้อง

- แบบรายงานผลการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ดูภาคผนวกที่ 1
- แบบบันทึกข้อมูลการควบคุมคุณภาพการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธี FST ดูภาคผนวกที่ 2

8. การควบคุมคุณภาพ

- ตรวจสอบอุณหภูมิของตู้เย็นที่จัดเก็บอย่างสม่ำเสมอ
- ทดสอบน้ำยาควบคุมเป็นประจำทุกสัปดาห์ เพื่อให้มั่นใจว่าน้ำยาควบคุมยังให้ผลคงที่ตลอดอายุ

9. เอกสารมาตรฐานการปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้อง

- MM-SOP-14: การจัดการขยะที่เกิดจากการตรวจวินิจฉัยโรคไข้มาลาเรีย

การตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธี STANDARDTM G6PD test (SD Biosensor)

G6PD-SOP-04

1. วัตถุประสงค์

เพื่ออธิบายขั้นตอนการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธี STANDARDTM G6PD test (SD Biosensor)

2. หลักการและเหตุผล

การตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธี Biosensor เป็นการตรวจวัดระดับเอนไซม์ G6PD ในเชิงปริมาณ ซึ่งมีความแม่นยำกว่าการตรวจแบบเชิงคุณภาพ ในปัจจุบันมีชุดตรวจสำเร็จรูป ซึ่งผลิตโดย 2 บริษัท คือ Accessbio inc CareStartTM G6PDBiosensor และ STANDARDTM G6PD (SD Biosensor) แต่ชุดตรวจที่เลือกมาใช้ในงานมาลาเรียในภาคสนาม คือ ชุดตรวจของ STANDARDTM G6PD (SD Biosensor) เป็นวิธีที่สามารถใช้เลือดที่เจาะจากปลายนิ้วหรือจากหลอดเลือดดำ และมีการศึกษาวิจัยสนับสนุนว่าสามารถนำมาใช้ได้ในงานมาลาเรียภาคสนาม

ชุดตรวจ STANDARDTM G6PD test (SD Biosensor) มีคุณสมบัติดังนี้

1. ตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธีวัดการเกิดสี (Colorimetric method)
2. ช่วงค่าปริมาณของ G6PD ที่สามารถวัดค่าได้ อยู่ระหว่าง 0-20 U/g Hb
3. ช่วงค่าปริมาณฮีโมโกลบิน (Hb) ที่สามารถวัดค่าได้ อยู่ระหว่าง 4-25 g/dL
4. จำนวนข้อมูลที่เครื่องตรวจสามารถเก็บรักษาค่าได้เท่ากับ 500 ตัวอย่าง
5. ปริมาณเลือดที่ใช้ทดสอบเท่ากับ 10 µL
6. เวลาที่ใช้ในการตรวจเท่ากับ 2 นาที
7. อุณหภูมิสำหรับเก็บแถบทดสอบอยู่ระหว่าง 2-30^{0}C
8. ช่วงของอุณหภูมิที่เครื่องตรวจสามารถทำงานได้ถูกต้องอยู่ระหว่าง 15-40^{0}C

3. วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

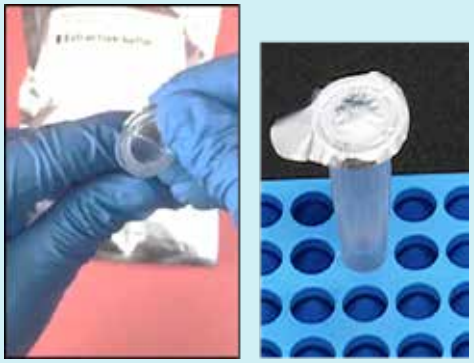
1. เครื่องตรวจ (G6PD analyzer instrument)
2. ชุดตรวจ G6PD test kit ภายใน 1 กล่อง ของชุดตรวจประกอบด้วย
   - แถบทดสอบ (strip) STANDARD G6PD test device จำนวน 25 อันบรรจุแยกอยู่ในซองจะเปิดเมื่อจะใช้งานเท่านั้น
   - บัฟเฟอร์สำหรับการสกัด (extraction buffer) จำนวน 25 หลอด
   - หลอดสำหรับดูดเลือดปริมาตร 10 µL (STANDARD Ezi tube) จำนวน 50 อัน
   - code chip จำนวน 1 อัน
3. อุปกรณ์เจาะเลือด เช่น เข็มเจาะเลือด สำลี แอลกอฮอล์ ดูรายละเอียดใน MM-SOP-06A: การเจาะเก็บเลือดจากปลายนิ้วและการเตรียมฟิล์มหนาและบาง และ MM-SOP-06B: การเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำและการเตรียมฟิล์มหนาและบางจากเลือดในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็ง

4. ข้อควรระวังเพื่อความปลอดภัย

- ปฏิบัติตามข้อกำหนดการควบคุมการแพร่กระจายเชื้อตามหลักสากล ประกอบด้วย สวมใส่อุปกรณ์ป้องกันอันตรายส่วนบุคคลในการปฏิบัติงานทุกครั้ง ได้แก่ ถุงมือ แว่นตานิรภัย หน้ากากอนามัย และเสื้อกาวน์

5. วิธีการ

5.1 การเตรียมการทดสอบ จัดเตรียมวัสดุอุปกรณ์ให้พร้อมก่อนเจาะเลือดผู้ป่วย ดังนี้

1. ตรวจสอบวันหมดอายุของชุดตรวจ และหมายเลข Code chip ต้องตรงกับชุดตรวจ	
2. ก่อนเปิดเครื่อง ให้ใส่ Code chip ที่ด้านข้างของตัวเครื่องตามรูป ต้องกดเข้าให้สนิท Code chip สามารถเสียบค้างไว้ได้ตลอดการใช้งานของชุดตรวจแต่ละกล่อง เมื่อเปลี่ยนชุดตรวจแต่ละกล่องจะต้องเปลี่ยน Code Chip ของกล่องที่เปิดใหม่	
3. เตรียมบัฟเฟอร์สำหรับสกัด (extraction buffer) เปิดฝาหลอดใส่บัฟเฟอร์ และเปิดแผ่นฝาฟรอยด์ออก โดยเปิดเพียงครึ่งเดียว	

5.2 การเจาะเลือดจากปลายนิ้ว

การเจาะเลือดจากปลายนิ้วมีขั้นตอนโดยสรุป ดังนี้ (ดูรายละเอียดวิธีการเจาะเลือดจากปลายนิ้วได้จาก MM-SOP-06A: การเจาะเลือดจากปลายนิ้วและการเตรียมฟิล์มหนาและบาง)

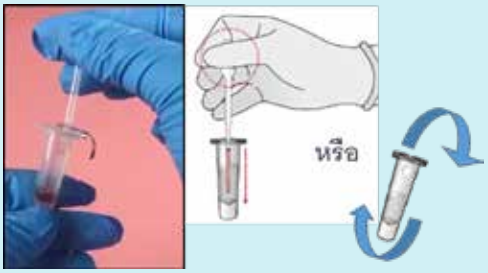
1. นวดนิ้วก่อน แล้วทำความสะอาดนิ้วด้วยสำลีชุบแอลกอฮอล์ 70% หมาดๆ และรอให้แห้ง	
2. เจาะเลือดด้วยเข็มเจาะเลือดใหม่ปลอดเชื้อใช้เข็มเจาะเลือดปราศจากเชื้อ เจาะบริเวณใกล้ปลายนิ้ว	
3. บีบนิ้วที่เจาะเบาๆ เพื่อให้เลือดหยดแรกออก เช็ดเลือดทิ้งด้วยสำลีแห้งสะอาด ระวังอย่าให้มีเศษสำลีติดที่ปลายนิ้ว	

5.3 ขั้นตอนการตรวจด้วยวิธี STANDARDTM G6PD (SD Biosensor)

1. ใช้หลอดเก็บเลือด (Ezi tube+) แตะปลายหลอดที่หยดเลือด ให้เลือดไหลเข้าสู่หลอดหยดจนถึงขีดสีดำ ซึ่งเท่ากับ 10 µL โดยให้จับที่ก้านหลอดดังรูป เลือดจะไหลเข้าโดยอัตโนมัติจนถึงขีดสีดำ

วิธีการจับหลอดเก็บเลือด

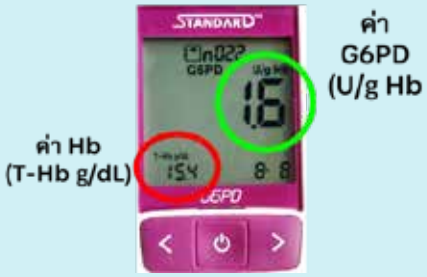
2. บีบเลือดจากหลอด Ezi Tube+ ลงในหลอดบัฟเฟอร์ แล้วบีบหลอดหยดดูดขึ้นลง 8-10 ครั้ง เพื่อผสมสารละลาย แล้วทิ้งหลอดหยดในภาชนะทิ้งขยะติดเชื้อ โดยการผสมอาจใช้วิธีปิดฝาฟรอยด์ให้สนิทแล้วพลิกหลอดเบาผสมเลือดกับบัฟเฟอร์ให้เข้ากันดี



3. เสียบแถบทดสอบสำหรับตรวจ ตรงช่องเสียบแถบ จับส่วนที่เป็นสีเทาหันด้านมีรูกลมขาวขึ้นตามรูป

4. ใช้หลอด Ezi Tube+ อันใหม่ แตะลงบนส่วนผสมของเลือดกับบัฟเฟอร์ในหลอด โดยเอียงหลอดดังรูป ส่วนผสมของเลือดกับบัฟเฟอร์จะไหลเข้าหลอดจนถึงจนถึงขีดสีดำ โดยอัตโนมัติ ห้ามปิดรู และห้ามใช้วิธีบีบหลอด Ezi Tube+ เพื่อดูด

5. เปิดฝาเครื่องตรวจ (G6PD analyzer instrument)

6. บีบสารละลายส่วนผสมของเลือดกับบัฟเฟอร์ลงไปในช่องที่มีแสงไฟกระพริบสีเขียว	
7. เมื่อมีสัญญาลักษณ์ “Clo” ให้ปิดฝาเครื่องลง เครื่องจะเริ่มทำการตรวจวิเคราะห์ โดยนับเวลาถอยหลัง 2 นาที	
8. เมื่อครบเวลา 2 นาที เครื่องจะรายงานผล Hb และ G6PD (U/gHb)	

5.7 การแปลผล

การแปลผลการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD จะแปลผลต่างกันระหว่างเพศชายและเพศหญิง เนื่องจากภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ถ่ายทอดทางพันธุกรรมโดยโครโมโซม X ดังนั้น ลักษณะยีนของเพศหญิงที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD จึงอาจเป็นแบบ homozygous normal alleles, homozygous deficient alleles หรือ heterozygous deficient alleles ในขณะที่เพศชายจะเป็นแบบ hemizygous deficient alleles หรือ hemizygous normal alleles ดังนั้น การแปลผลในเพศชายจะเป็นไปได้เพียง 2 แบบ คือ มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD (ถ้าตัวอย่างมียีนแบบ hemizygous deficient alleles) หรือไม่พร่องเอนไซม์ G6PD (ตัวอย่างมียีนแบบ hemizygous normal alleles) ในขณะที่เพศหญิง การแปลผลจะเป็นไปได้ 3 แบบ คือ G6PD normal (ถ้าตัวอย่างตรวจมียีนแบบ homozygous normal alleles) G6PD partial หรือ intermediate deficiency (ถ้าตัวอย่างมียีนแบบ heterozygous deficient alleles) และ G6PD deficiency (ถ้าตัวอย่างมียีนแบบ homozygous deficient alleles) เกณฑ์การแปลผลการตรวจคัดกรองด้วยชุดตรวจ STANDARDTM G6PD test (SD Biosensor) แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การแปลการตรวจ G6PD STANDARDTM G6PD test (SD Biosensor)

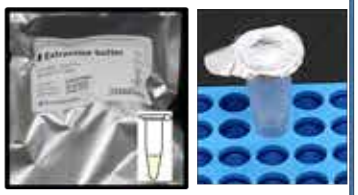
เพศ	ค่า G6PD (U/g Hb)		
	< 4.0 U/g Hb	4.0-6.0 U/g Hb	> 6.0 U/g Hb
เพศชาย	มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD	ปกติ (normal G6PD)	ปกติ (normal G6PD)
เพศหญิง	มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD	มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD บางส่วน (partial หรือ intermediate G6PD deficiency)	ปกติ (normal G6PD)

SD BIOSENSOR STANDARD™ G6PD Test

เตรียมอุปกรณ์และชุดตรวจก่อนทำการทดสอบ

1. ตรวจสอบชุดตรวจ
   - วันหมดอายุของชุดตรวจ
   - หมายเลข Code chip ต้องตรงกับชุดตรวจ

2. ก่อนเปิดเครื่อง ให้ใส่ Code chip ด้านข้างของตัวเครื่อง ตามรูป และต้องกดเข้าให้สนิท



3. . เตรียมบัฟเฟอร์ (Extraction buffer) ให้เปิดฝา โดยฉีกฟรอยด์เปิดครั้งเดียว

การเตรียมตัวอย่างเลือด

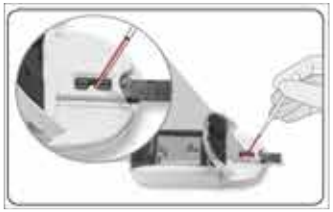
4. จับที่ก้านหลอดเก็บเลือด แตะปลายหลอดที่หยดเลือดที่ปลายนิ้ว เลือดจะไหลขึ้นเองไม่ต้องบีบหลอดเก็บเลือด รอให้ถึงรอยขีดสีดำ (10 ไมโครลิตร)

5. นำเลือดผสมกับ Extraction Buffer แล้วดูดขึ้นลง 8-10 ครั้ง เพื่อให้ตัวอย่างเลือดและน้ำยาผสมเข้ากันอย่างดี และให้เริ่มทดสอบ

การดำเนินการทดสอบวัดระดับเอนไซม์ G6PD

6. ใส่แถบทดสอบทางด้านล่างของตัวเครื่อง ให้เสียบตามปลายที่ลูกศรชี้ที่อยู่บนแถบทดสอบ

7. ใช้ตัวเก็บเลือดอันใหม่ (Sample collector) ดูดเลือดที่ผสมกับบัฟเฟอร์ให้ถึงขีดสีดำ



8. เปิดฝาครอบแถบทดสอบขึ้น แล้วหยดส่วนผสมเลือดบัฟเฟอร์ในช่องวงกลมเล็ก ตามรูป

9. ปิดฝาเครื่องทันที

ขั้นตอนที่ 6 – 9 ต้องทำอย่างรวดเร็วต่อเนื่องภายใน 1 นาที

การอ่านผล

ตัวอย่าง
G6PD = 13.1 U/g Hb
Total Hb = 15.7 g/dL

10. อ่านผลตรวจ รอเป็นเวลา 2 นาที เครื่องรายงานค่า enzyme G6PD หน่วย U/g Hb บนหน้าจอ

การแปลผล

ชาย : น้อยกว่าเท่ากับ 4 IU/g Hb = มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD (G6PD Deficiency) มากกว่า 4.0 IU/g Hb = ปกติ (Normal)

หญิง : น้อยกว่าเท่ากับ 4 IU/g Hb = มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD (G6PD Deficiency) มากกว่า 6.0 IU/g Hb = ปกติ (Normal)
มากกว่า 4.0 – 6.0 IU/g Hb = มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD บางส่วน (Partial G6PD Deficiency หรือ Intermediate)

รูปที่ 1 ภาพขั้นตอนวิธีการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธี STANDARDTM STANDARDTM G6PD test (SD Biosensor) (แบบหน้าเดียว)

6. ข้อควรระวังที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการปฏิบัติงาน

- ไม่ควรให้เครื่องตรวจวิเคราะห์สัมผัสกับแสงแดดและความร้อนโดยตรง เพราะจะทำให้เครื่องเสื่อมคุณภาพเร็ว
- หากเก็บแผ่นตรวจ (strip) ไว้ในตู้เย็น ก่อนใช้งานจะต้องนำ strip มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 10 นาที เพื่อให้ strip มีอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง
- ถ้าใช้เลือดจากปลายนิ้ว ต้องทำทันทีเพื่อไม่ให้เลือดแข็งตัวก่อนการทดสอบ
- การผสมเลือดกับบัฟเฟอร์ ให้ดูดสารละลายขึ้นลงเบา ๆ เพื่อไม่ให้เกิดฟอง
- หลอดดูด Ezi tube จะดูดเลือด หรือส่วนผสมด้วยแรงแคปปิล่ารี ถึงขีดดำโดยอัตโนมัติ เพียงแค่เอียงให้ปลายหลอดแตะที่หยดเลือด หรือส่วนผสมของน้ำยากับเลือด
- ในขณะที่เครื่องตรวจวิเคราะห์กำลังทำงาน ห้ามเคลื่อนย้ายเครื่องตรวจวิเคราะห์ เพราะจะทำให้การประมวลผลผิดพลาดได้
- ทิ้งขยะติดเชื้อทั้งหมดในถุงขยะติดเชื้อ เข็มเจาะเลือดทิ้งในภาชนะทิ้งขยะติดเชื้อมีคม ดูรายละเอียดใน MM-SOP-14: การจัดการขยะที่เกิดจากการตรวจวินิจฉัยโรคไข้มาลาเรีย

7. แบบฟอร์มรายงานที่เกี่ยวข้อง

- แบบรายงานผลการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ดูภาคผนวกที่ 1
- แบบบันทึกข้อมูลการควบคุมคุณภาพการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธี STANDARD™ G6PD test (SD Biosensor) ดูภาคผนวกที่ 3

8. การควบคุมคุณภาพ

- ดูรายละเอียดใน G6PD-SOP-05: การควบคุมคุณภาพการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธี STANDARD™ G6PD test (SD Biosensor)

9. เอกสารมาตรฐานการปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้อง

- MM-SOP-06A: การเจาะเก็บเลือดจากปลายนิ้ว และการเตรียมฟิล์มหนาและบาง
- MM-SOP-06B: การเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำและการเตรียมฟิล์มหนาและบางจากเลือดในหหลอดที่มีสารกันเลือดแข็ง
- MM-SOP-14: การจัดการขยะที่เกิดจากการตรวจวินิจฉัยโรคไข้มาลาเรีย
- Job aid: สรุปขั้นตอนการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธี STANDARD™ G6PD test (SD Biosensor) ดูภาคผนวกที่ 2

การควบคุมคุณภาพการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธี STANDARDTM G6PD test (SD Biosensor)

G6PD-SOP-05

1. วัตถุประสงค์

เพื่ออธิบายขั้นตอนการควบคุมคุณภาพการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธี SD Biosensor STANDARD™ G6PD test (SD Biosensor)

2. หลักการและเหตุผล

G6PD quantitative biosensor หรือ Point-of-care STANDARD™ G6PD test เป็นชุดตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD เชิงปริมาณชนิดใหม่ วิธีการทดสอบไม่ยุ่งยาก สามารถตรวจวัดระดับ G6PD activity ได้พร้อมกับวัดปริมาณฮีโมโกลบิน และคำนวณปริมาณของ G6PD activity เทียบกับค่าฮีโมโกลบิน รายงานในหน่วยของ U/g Hb สามารถใช้เลือดที่เจาะจากปลายนิ้วหรือจากหลอดเลือดดำเพื่อการตรวจคัดกรอง

การควบคุมคุณภาพการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD มีความสำคัญและจำเป็นต้องดำเนินการตามคำแนะนำอย่างถูกต้องเป็นประจำ เพื่อให้ผลการตรวจน่าเชื่อถือ ซึ่งผลการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD มีผลโดยตรงต่อการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียโดยเฉพาะผู้ป่วยมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ เนื่องจากยาไพรมาควินที่ใช้รักษามีผลทำให้เม็ดเลือดแดงแตกในผู้ป่วยที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ดังนั้นก่อนให้ยาไพรมาควินในผู้ป่วยมาลาเรียจึงจำเป็นต้องทราบภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ของผู้ป่วยทุกราย

3. วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. ชุดตรวจ G6PD quantitative Biosensor (Point-of-care STANDARD™ G6PD test; SD Biosensor, Suwon, South Korea)
2. เม็ดสารควบคุมคุณภาพการตรวจ G6PD ชนิด Low G6PD control หรือ Level 1 control สารควบคุมคุณภาพชนิดนี้มีค่า G6PD activity อยู่ระหว่าง 0-3 U/g Hb และค่าฮีโมโกลบิน (Hb) อยู่ระหว่าง 4.0–12.0 g/dL
3. เม็ดสารควบคุมคุณภาพการตรวจ G6PD ชนิด High G6PD control หรือ Level 2 control สารควบคุมคุณภาพชนิดนี้มีค่า G6PD activity อยู่ระหว่าง 6-10 U/g Hb และค่าฮีโมโกลบิน (Hb) อยู่ระหว่าง 13.0-17.0 g/dL

4. ข้อควรระวังเพื่อความปลอดภัย

- ปฏิบัติตามข้อกำหนดการควบคุมการแพร่กระจายเชื้อตามหลักสากล ประกอบด้วย สวมใส่อุปกรณ์ป้องกันอันตรายส่วนบุคคลในการปฏิบัติงานทุกครั้ง ได้แก่ ถุงมือ แว่นตานิรภัย หน้ากากอนามัย และเสื้อกาวน์

5. วิธีการ

การควบคุมคุณภาพการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธี SD Biosensor STANDARD™ G6PD test ในคู่มือมาตรฐานการปฏิบัติงานนี้ ประกอบด้วย 1) การตรวจสอบเครื่องมือวิเคราะห์โดยใช้แถบทดสอบมาตรฐาน (check strip) 2) การตรวจสอบคุณภาพของผลตรวจโดยใช้ code chip และ 3) การตรวจสอบคุณภาพแถบทดสอบโดยใช้สารมาตรฐาน (control reagent)

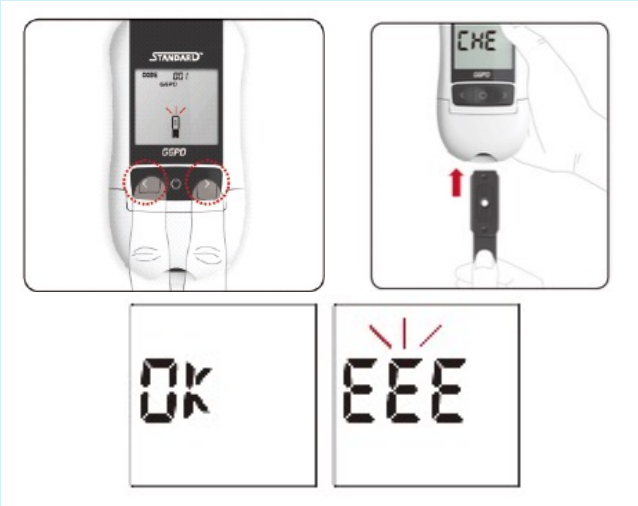
5.1 การตรวจสอบคุณภาพของเครื่องตรวจวิเคราะห์โดยใช้แถบทดสอบมาตรฐาน

การตรวจสอบเครื่องตรวจวิเคราะห์ทำโดยใช้แถบทดสอบมาตรฐาน (check strip) ที่มาพร้อมกับเครื่องวิเคราะห์ผล check strip มีลักษณะคล้ายแถบชุดตรวจแต่เป็นสีเทา ใน 1 เครื่องตรวจวิเคราะห์จะมี check strip เพียง 1 อันเท่านั้น ดังนั้นต้องเก็บรักษาด้วยความระมัดระวัง อย่าให้แตกหัก หรือสูญหาย การทดสอบเครื่องจะทำการทดสอบในกรณี ดังต่อไปนี้

- เปิดใช้งานเครื่องตรวจวิเคราะห์ครั้งแรก
- เปิดชุดน้ำยากล่องใหม่
- ผลการตรวจไม่สอดคล้องกับประวัติที่ผู้ป่วยแจ้งให้ทราบ
- เปลี่ยนถ่านหรือทำความสะอาดเครื่องตรวจวิเคราะห์
- ทำเครื่องตรวจวิเคราะห์ตก
- เครื่องตรวจวิเคราะห์ไม่ได้ถูกใช้งานเป็นประจำ ควรตรวจสอบเครื่องก่อนใช้งาน

วิธีการตรวจสอบเครื่องตรวจวิเคราะห์โดยใช้แถบทดสอบมาตรฐานมีขั้นตอนดังนี้

1. กดเปิดเครื่องตรวจวิเคราะห์ โดยกดปุ่มซ้ายและขวาพร้อมกัน ค้างไว้ 3 วินาที
2. เมื่อหน้าจอเครื่องปรากฏคำว่า “CHE” ให้ใส่แถบทดสอบมาตรฐานที่ด้านล่างของตัวเครื่อง
3. รอให้เครื่องตรวจวิเคราะห์ทำงาน โดยเครื่องจะนับเวลาถอยหลัง 10 วินาที
4. หน้าจอจะปรากฏสัญลักษณ์ “OK” แสดงว่าเครื่องตรวจวิเคราะห์ทำงานได้เป็นปกติ แต่ถ้าเครื่องปรากฏสัญลักษณ์ “EEE” แสดงว่าเครื่องตรวจวิเคราะห์มีปัญหา

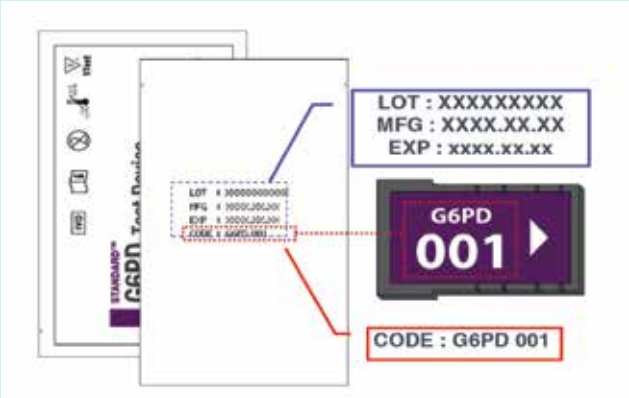


รูปที่ 1: การตรวจสอบเครื่องตรวจวิเคราะห์โดยใช้แถบทดสอบมาตรฐาน

5.2 การตรวจสอบคุณภาพของผลการตรวจโดยใช้ code chip

การตรวจสอบคุณภาพโดยใช้ code ship สำคัญมากต่อการตรวจวิเคราะห์ เพื่อให้ได้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง โดยจะทำทุกครั้งที่ทำการตรวจวิเคราะห์ และเมื่อมีการเปิดชุดทดสอบกล่องใหม่ (ชุดทดสอบ 1 กล่องจะมี 25 แถบทดสอบ) ควรเปลี่ยน code ship ทุกครั้งที่เปลี่ยนกล่องชุดทดสอบ ถึงแม้ว่าจะเป็น code เดียวกัน ตัวเลขของ code chip จะต้องตรงกับตัวเลขบนซองของแถบทดสอบและหน้าจอของเครื่องทุกครั้งที่ทำการตรวจ เนื่องจากการตรวจเป็นการวัดเชิงปริมาณ ดังนั้นจะต้องมีการปรับค่ามาตรฐาน (calibrate) ซึ่ง code chip จะบรรจุข้อมูลค่ามาตรฐานต่าง ๆ ที่ต้องใช้เพื่อทำให้ผลการทดสอบถูกต้องและแม่นยำ การตรวจสอบคุณภาพของผลการตรวจโดยใช้ code chip มีขั้นตอนดังนี้

1. ตรวจสอบวันหมดอายุของแถบทดสอบ
2. ตรวจสอบตัวเลขบนซองบรรจุแถบทดสอบ ต้องตรงกับตัวเลขของ code chip
3. ใส่ code chip ที่ด้านข้างของเครื่องวิเคราะห์ในขณะที่เครื่องปิดอยู่ และต้องกดล็อคให้สนิท



รูปที่ 1: การตรวจสอบเครื่องตรวจวิเคราะห์โดยใช้แถบทดสอบมาตรฐาน

5.3 การตรวจสอบคุณภาพแถบทดสอบโดยใช้สารมาตรฐาน

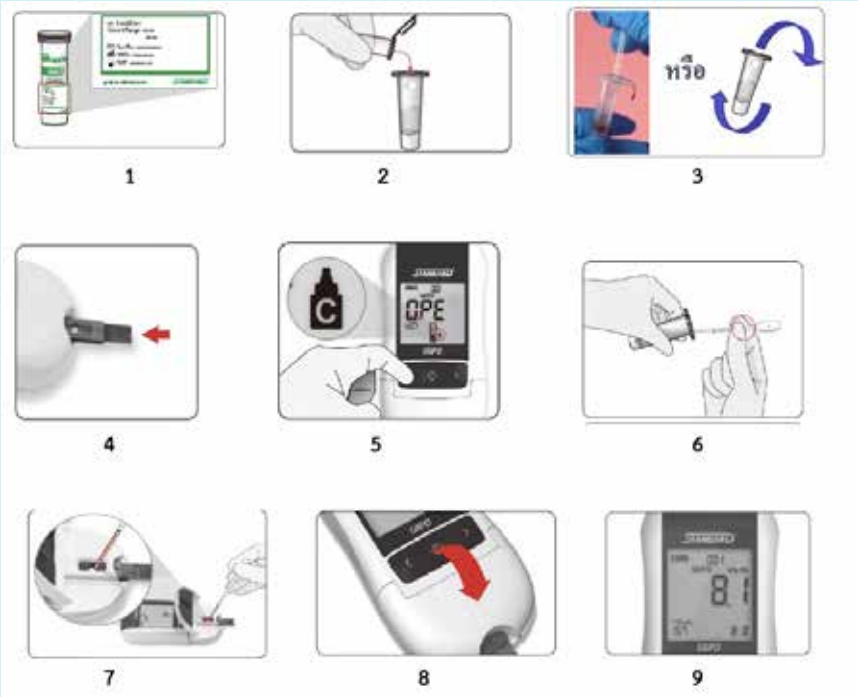
การตรวจสอบคุณภาพแถบทดสอบ (test strip) โดยใช้สารมาตรฐาน (control reagent) เป็นการตรวจสอบว่าชุดตรวจยังสามารถใช้งานได้ ไม่เสื่อมคุณภาพ และให้ผลการตรวจที่ถูกต้อง แม่นยำ การตรวจสอบคุณภาพโดยใช้สารมาตรฐานจะทำในกรณีดังต่อไปนี้

1. เปิดใช้ชุดตรวจกล่องใหม่ หรือชุดตรวจเปิดใช้งานนานแล้ว ยังไม่หมดอายุ แต่ไม่แน่ใจในประสิทธิภาพ
2. ต้องนำชุดตรวจไปใช้งานค้นหาผู้ป่วยเชิงรุก ต้องตรวจผู้ป่วยจำนวนมาก
3. การฝึกอบรมและการประเมินความสามารถ ความเชี่ยวชาญ และความถูกต้องในการตรวจของผู้ปฏิบัติงาน (competency test)

การตรวจสอบคุณภาพแถบทดสอบโดยใช้สารมาตรฐานมีขั้นตอนดังนี้

1. ตรวจสอบวันหมดอายุของสารมาตรฐานโดยดูที่ข้างขวดบรรจุสารมาตรฐาน
2. เทเม็ดสารมาตรฐานลงในหลอดบัฟเฟอร์ (extraction buffer)
3. ผสมสารมาตรฐานกับบัฟเฟอร์ให้เข้ากันโดยใช้วิธีกลับหลอดไปมาหลาย ๆ ครั้ง หรือใช้วิธีดูดสารละลายขึ้นลงโดยใช้ dropper
4. ใส่แถบทดสอบที่ด้านล่างของเครื่องวิเคราะห์ กดล็อคให้สนิท

5. กดปุ่มซ้ายค้างไว้ 3 วินาที เครื่องวิเคราะห์จะมีสัญลักษณ์ “C” ปรากฏ
6. ใช้หลอดดูด Ezi tube+ ดูดสารละลายมาตรฐานให้ถึงขีดสีดำ
7. เปิดฝาครอบแถบทดสอบขึ้น หยดสารละลายมาตรฐานลงในช่องวงกลมเล็ก
8. ปิดฝาครอบแถบทดสอบทันที
9. รอเวลาให้เครื่องวิเคราะห์ทำงาน ใช้เวลา 2 นาที อ่านผลบนจอภาพของเครื่องวิเคราะห์
10. ตรวจสอบค่าที่อ่านได้ ต้องได้ค่าเท่ากับค่าของสารมาตรฐานที่ใช้



รูปที่ 3: ขั้นตอนการตรวจสอบคุณภาพของแถบทดสอบโดยใช้สารมาตรฐาน

5.4 สาเหตุของความคลาดเคลื่อนของเครื่องวิเคราะห์ผลและวิธีการแก้ไข

ลำดับ	รูปภาพ	สาเหตุ	การแก้ไข
1		ค่า Hemoglobin น้อยกว่า 4 g/dl	ให้ตรวจยืนยันผลการทดสอบ
2		ค่า Hemoglobin มากกว่า 25 g/dl	ให้ตรวจยืนยันผลการทดสอบ
3		Low Battery	แบตเตอรี่ใกล้หมด แต่สามารถใช้งานได้อีกประมาณ 50 test
4		Replace Battery	ให้เปลี่ยนแบตเตอรี่ทันที
5		แถบทดสอบชำรุด หรือการใส่แถบทดสอบไม่ถูกต้อง	ให้ใส่แถบทดสอบอันใหม่
6		ใส่ตัวอย่างทดสอบไม่เพียงพอ	เปลี่ยนแถบทดสอบและใส่ตัวอย่างทดสอบตามปริมาณที่กำหนด
7		แถบทดสอบหมดอายุการใช้งาน	เปลี่ยนแถบทดสอบ ตรวจสอบแถบที่ทดสอบที่ยังมีอายุการใช้งานได้
8		อุณหภูมิห้องสูงหรือต่ำเกินช่วง 15-40°C	ปรับอุณหภูมิห้องให้เหมาะสม
9		การสื่อสารข้อมูลผิดพลาด (communication error)	ปิดและเปิดเครื่องใหม่

ลำดับ	รูปภาพ	สาเหตุ	การแก้ไข
10		การสื่อสารข้อมูลผิดพลาด (communication error)	ปิดและเปิดเครื่องใหม่
11		ฝาเครื่องเปิดขณะทดสอบ	ปิดฝาเครื่องให้สนิท
12		ไม่มีตัวอย่างขณะทดสอบ	ให้ใส่แถบทดสอบอันใหม่ และใส่ตัวอย่างทดสอบ
13		ความผิดพลาดเกี่ยวกับ code chip	ตรวจสอบ code chip ว่ามีเลขรหัสตรงกับ test strip หรือไม่
14		ความผิดพลาดของเครื่องวิเคราะห์ (internal error of the analyzer)	ปิดและเปิดเครื่องใหม่

6. ข้อควรระวังที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการปฏิบัติงาน

- ไม่ควรให้เครื่องตรวจวิเคราะห์สัมผัสกับแสงแดดและความร้อนโดยตรง รวมถึงความชื้นด้วย
- หากเก็บแผ่นตรวจ (strip) ไว้ในตู้เย็น ก่อนใช้งานจะต้องนำ strip มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 10 นาที เพื่อให้ strip มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง
- ในขณะที่เครื่องตรวจวิเคราะห์กำลังทำงาน ห้ามเคลื่อนย้ายเครื่องตรวจวิเคราะห์

7. แบบฟอร์มรายงานที่เกี่ยวข้อง

- แบบรายงานผลการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ดูภาคผนวกที่ 3
- แบบบันทึกข้อมูลการควบคุมคุณภาพการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธี STANDARD™ G6PD test (SD Biosensor) ดูภาคผนวกที่ 5

8. การควบคุมคุณภาพ

- การจัดเก็บน้ำยาควบคุมให้ตรวจสอบอุณหภูมิของตู้เย็นที่จัดเก็บ และวันหมดอายุของน้ำยาควบคุมเป็นประจำ พร้อมทั้งลงบันทึกในสมุดบันทึก

9. เอกสารมาตรฐานการปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้อง

- G6PD-SOP-03: การตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธี STANDARD™ G6PD test (SD Biosensor)
- Job aid: ภาพขั้นตอนวิธีการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธี STANDARD™ G6PD test (SD Biosensor) (แบบหน้าเดียว) ดูภาคผนวกที่ 2

เอกสารอ้างอิง

พิมพ์ลักษณ์ เจริญขวัญ. (15 สิงหาคม 2564). G6PD deficiency and other hereditary hemolytic anemia. ในราชวิทยาลัยกุมารแพทย์แห่งประเทศไทย (บรรณาธิการ), *Hematology* (หน้า 124-132) สืบค้นจาก http://thaipediatrics.org>Media>media-2018

อำพร ไตรภัทร (2546) การตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD. ใน กุลนภา ฟู่เจริญ กนกวรรณ แสนไชยสุริยา บรรณาธิการ การทดสอบทางห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับความผิดปกติของเม็ดเลือดแดง. พิมพ์ครั้งที่ 3 โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2546 หน้า 105-113

Alam, M.S., Kibria, M.G., Jahan, N., Thriemer, M.S., Douglas, N.M., Phru, C.S., et.al. (2018). Field evaluation of quantitative point of care diagnostics to measure glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **PLOS ONE**, Retrieved October 24, 2020, from https://doi.org/ 10.1371/journal.pone.0206331.

Beutler, E. (1996). A series of new screening procedures for pyruvate kinase deficiency, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and glutathione reductase deficiency. **Blood**, 28, 553-562.

Baird, J.K., Satyagraha, A.W., Bancone, G. (2014). Glucose-6-phosphat dehydrogenase deficiency and primaquine hemolytic toxicity. Encyclopedia of Malaria, DOI 10.1007/978-1-4614-8757-9_102-1. Retrieved October 26, 2020, from https://link.springer.com/referenceworkentry/ 10.1007%2F978-1-4614-8757-9_102-1

Carter, R. and Mendis, K.N. (2002). Evolutionary and histological aspects of the burden of malaria. *Clinical Microbiology Reviews,* 15(4), 564-94. DOI: 10.1128/CMR.15.4.564-569.2002.

Cappellini, M.D. and Fiorelli, G. (2008). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet, 371*(9606), 64-74. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60073-2.

Dow, P.A., Petteway, M.B., Alperi, J.B. (1974). Simplified method for G6PD screening using blood collected on filter paper. **American Journal Pathology**, 61, 333-336.

Flatz G, Cornelius Pik, Sundharagiati B. Malaria and hæmoglobin e in Thailand (1964). The Lancet. 284(7356):385-7.

Instructions for use (package insert). STANDARD™ G6PD test. Cat No. 02GA10: STANDARD™ G6PD Analyzer, and Cat No. 02G6S10: STANDARD™ G6PD test (25ea).

Instructions for use (package insert). R&D DIAGNOSTICS LTD, SQMMR500 & SQMMR1250, Greece.

Jiang, J., Ma, X., Song, C., Lin, B., Cao, W., Wu, S., & Hsiao, K. J. (2003). Using the fluorescence spot test for neonatal screening of G6PD deficiency. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health**, 34 Suppl 3, 140-142.

Nadarajan, V., Shanmugam, H., Sthaneshwar, P., Jayaranee, S., Sultan, K. S., Ang, C., & Arumugam, S. (2011). Modification to reporting of qualitative fluorescent spot test results improves detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient heterozygote female newborns. **International Journal of Laboratory Hematology Hematology**, 33(5), 463-470. doi: 10.1111/j.1751-553X.2011.01309.x

Nadarajan, V., Shanmugam, H., Sthaneshwar, P., Jayaranee, S., Sultan, K. S., Ang, C., & Arumugam, S. (2011). Modification to reporting of qualitative fluorescent spot test results improves detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient heterozygote female newborns. **International Journal of Laboratory Hematology Hematology**, 33 (5), 463-470. doi: 10.1111/j.1751-553X.2011.01309.x

Nuchprayoon I, Louicharoen C, Charoenvej W. (2008). Glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations in Mon and Burmese of southern Myanmar. **Journal of Human Genetic**. 53(1), 48-54.

Louicharoen C, Patin E, Paul R, Nuchprayoon I, et al. (2009) Positively selected G6PD-Mahidol mutation reduces Plasmodium vivax density in Southeast Asians. **Science**. 326(5959):1546-9.doi: 10.1126/science.1178849.

Pal, S., Bansil, P., Bancone, G., Hrutkay, S., Kahn, M., Gomsawun, G., et.al. (2018). Evaluation of a novel quantitative test for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: bringing quantitative testing for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency closer to the patient. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 100(1), 213-221.

Pengboon, P., Thamwarokun, A., Changsri, K., Kaset, C., & Chomean, S. (2019). Evaluation of quantitative biosensor for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity detection. **PloS One**, 14(12), e0226927. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226927

San-ae, S., Nokkong, C., and Nopparatana, C., (2015) The Improvement of Fluorescent Spot Testing for Diagnosis of Enzyme G6PD Deficiency. **Journal Medical Technology Association Thailand**, Vol. 43 No. 3. 5359-5367

WHO Working Group. (1989). Glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficiency. *Bulletin of the World Health Organization, 67*, 601-11.

World Health Organization. (2018). Guide to G6PD deficiency rapid diagnostic testing to support *P. vivax* radical cure. Retrieved October 24, 2020, from https://www.who.int/malaria/ publications/ atoz/ 9789241514286/en/.